

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.113:575.2

ГЕНОМНЫЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ
К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ У *Brassica rapa* L.

© 2020 г. А. В. Амосова^а, Т. Е. Саматадзе^а, Г. В. Мозгова^б, В. Н. Кипень^б, А. Г. Дубовская^с,
А. М. Артемьева^с, О. Ю. Юркевич^а, С. А. Зошук^а, В. А. Лемеш^б, О. В. Муравенко^а, *

^аИнститут молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бИнститут генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

^сВсероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: olgmur1@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 05.03.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Возделывание хозяйственно ценного вида *Brassica rapa* L. в регионах рискованного земледелия требует получения сортов, устойчивых к низким температурам. Механизм низкотемпературного стрессового ответа представляет собой сложную сеть процессов, которая затрагивает экспрессию многих генов, включая рибосомные, а также коррелирует с хромосомной изменчивостью растений. В представленной работе методами FISH- и ПЦР-анализа впервые проведено изучение внутривидовой изменчивости хромосом по числу и локализации кластеров 45S и 5S рДНК генов, а также комплекса молекулярных маркеров холодоустойчивости у озимых сортов *B. rapa*, районированных в регионах рискованного земледелия. В результате исследования выявлены SSR-маркеры (Na10-CO3, BrgMS5339-1) и SCAR-маркеры (BoCCA1-F/BoCCA1-1R1, BoCCA1-F/BoCCA1-2R1), пригодные для диагностики устойчивых и восприимчивых к холоду генотипов *B. rapa*. У масличных и листовых сортов обнаружено большое число маркеров холодоустойчивости и высокий уровень полиморфизма по распределению на хромосомах кластеров 45S и 5S рДНК, в том числе наличие гетероморфных вариантов хромосом. У кормовых сортов выявлены менее устойчивые к холоду генотипы и меньше полиморфных вариантов хромосом с сайтами рДНК. Таким образом, показано, что наименее устойчивые генотипы обладают меньшим хромосомным полиморфизмом по распределению кластеров рибосомных генов и наоборот. Полученные результаты могут представлять интерес для практической селекции при выведении новых, устойчивых к низким температурам сортов *B. rapa*.

Ключевые слова: *Brassica rapa* L., холодоустойчивость, SSR-маркеры, аллели, SCAR-маркеры, FISH, 45S рДНК, 5S рДНК, хромосомный полиморфизм

DOI: 10.31857/S0026898420040035

ВВЕДЕНИЕ

Brassica rapa L. (Brassicaceae) – широко распространенный вид семейства капустных, который включает в себя разнообразные хозяйственно ценные листовые и корнеплодные культуры масличного, овощного и кормового назначения [1]. Считается, что геномы предковых форм *B. rapa* ($2n = 2x = 20$, геном AA) и родственного вида *Brassica oleracea* L. (капуста огородная) ($2n = 2x = 18$, геном CC) стали природными донорами аллополиплоидного генома еще одной хозяйственно ценной культуры – рапса *Brassica napus* L. ($2n = 4x = 38$, геном AACC) [2, 3]. В ходе эволюции и доместика-

ции появилось большое число морфотипов вида *B. rapa*, которые возделывают в районах с различными климатогеографическими условиями [1, 4–6]. Культивация *B. rapa* в регионах рискованного земледелия требует получения и использования сортов и форм, устойчивых к низким температурам, что считается одним из определяющих факторов успешного роста, развития и высокой продуктивности сельскохозяйственной культуры.

Механизм низкотемпературного стрессового ответа представляет собой сложную сеть процессов, которая изменяет метаболизм и экспрессию генов растений [7, 8]. Факторы транскрипции и

Сокращения: FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*; QTL (Quantitative Trait Loci) – локусы количественных признаков; SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) – маркер – фрагмент геномной ДНК в одном генетически определенном локусе, который идентифицируется с помощью ПЦР-амплификации с использованием пары специфических олигонуклеотидных праймеров; SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats) – ДНК-маркеры, основанные на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома.

эффекторные гены, участвующие в реакции растений на холодостресс, в совокупности называются холодорегулируемыми генами (COR, cold-regulated) [9]. В настоящее время гены COR выделены и идентифицированы у нескольких видов растений, в том числе у видов, родственных *B. rapa*: *Arabidopsis thaliana* и *B. napus* [10–12]. Показано, что эти гены могут индуцироваться и другими факторами абиотического стресса, в том числе обезвоживанием и засолением почвы [13, 14]. У устойчивых растений при холодострессе активируется синтез криопротекторов [15] и фосфатидной кислоты, которая входит в состав липидов клеточных мембран [16–18]. Обнаружено, что при высоком содержании малонового диальдегида (MDA, malondialdehyde) в мембранах растений происходит ускорение перекисного окисления липидов, в результате чего снижается устойчивость растения к холоду [19]. У рапса, *B. napus*, выявлена отрицательная корреляция относительной проводимости мембран с устойчивостью к холоду [20]. Обнаружено, что у *B. rapa* степень повреждения растений отрицательными температурами также коррелирует с содержанием MDA и относительной проводимостью мембран, а также выявлены ДНК-маркеры, основанные на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома (SSR-маркеры): Na10-CO3, BrGMS4511 и BrGMS397, – пригодные для диагностики устойчивых и восприимчивых к холоду генотипов [21]. При оценке устойчивости к холоду *B. napus* по SSR-маркерам идентифицировано три локуса количественных признаков (QTL, Quantitative Trait Loci): qSPADYL-6, qSPADYS-6 и qMADYS-6, – ассоциированных с содержанием MDA и расположенных в одной области группы сцепления – LG6. BLAST-анализ показал, что последовательности маркеров, сцепленных с этими QTL, коллинеарны с последовательностями ДНК хромосомы A08 у *B. rapa* [22]. Также у *B. napus* выявлены два гена, *BnaA08g05330D* и *BnaA08g15470D*, кодирующие COR-белки, связанные с формированием холодостойких генотипов. Кроме того, обнаружено высокое сходство последовательностей генов COR у *B. napus* с генами *Bra039858* и *Bra01579* у *B. rapa* [22].

В регуляции многих физиологических и метаболических процессов растений важную роль играют циркадные ритмы. Показано, что ассоциированный с циркадными ритмами белок CCA1 (транскрипционный фактор семейства MYB), участвует в позитивной регуляции холодострессового ответа растений путем индукции экспрессии генов *CBF* (C-repeat-binding factor), что определяет различия сельскохозяйственных культур по степени устойчивости к низким температурам [23]. У *B. oleracea* в гене *BoCCA1* обнаружены многочисленные инсерции, делеции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и установлены последовательности фрагментов геномной ДНК в этом локусе, которые

идентифицируют с помощью ПЦР (SCAR-маркеры, Sequence Characterized Amplified Region), что позволяет выявлять их наличие в двух аллелях гена (*BoCCA1-1* и *BoCCA1-2*), ассоциированных с устойчивостью и восприимчивостью растений к низким температурам [24].

Воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды могут проявляться на уровне структурно-функциональной организации хроматина и коррелируют с хромосомной изменчивостью растений [25]. Одним из самых нестабильных геномных регионов является рДНК [26]. У некоторых видов растений (*A. thaliana*, *Phaseolus vulgaris*, виды рода *Capsicum* и др.), произрастающих в разных природно-климатических условиях, выявлены значительные различия в размере генома из-за вариации числа копий 45S рДНК [27–29]. Показано также, что хромосомное распределение и число кластеров 45S и 5S рДНК, а также транскрипционная активность рибосомных генов у особей одного и того же вида растений может меняться под влиянием различных факторов окружающей среды [30–33]. У видов рода *Brassica* выявлен внутривидовой полиморфизм по хромосомной локализации кластеров 45S и 5S рДНК [34–38]. В кариотипах озимых сортов рапса обнаружена сортовая специфичность сочетаний полиморфных вариантов хромосом и особенности хромосомного распределения 45S и 5S рДНК [39, 40].

Вместе с тем комплексного изучения хромосомной изменчивости рибосомных генов и молекулярных маркеров холодоустойчивости среди различных подвидов полиморфного вида *B. rapa* с широким ареалом распространения не проводилось. Такие исследования могут предоставить новые сведения о формировании геномных механизмов стрессового ответа в процессе эволюции и селекции.

Целью работы было изучение внутривидовой изменчивости хромосомного распределения кластеров генов 45S и 5S рДНК, а также комплекса молекулярных SSR- и SCAR-маркеров холодоустойчивости у масличных, листовых и кормовых озимых сортов *B. rapa*, районированных в регионах рискованного земледелия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом исследования служили образцы восьми морозостойких сортов *Brassica rapa* L. из разных мест произрастания (табл. 1). Семена получены из коллекции ФИЦ Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия.

Митотические хромосомные препараты готовили из корневой меристемы проростков семян с использованием ДНК-интеркалирующего агента 9-аминоакридина (9-АМА) по методу, разрабо-

танному ранее для растений с хромосомами небольших размеров [41].

Для проведения FISH-анализа использовали следующие пробы ДНК:

1) рГа71, содержащую 18S-5.8S-26S (45S) последовательность рДНК мягкой пшеницы длиной 9 т.п.н. [42];

2) рГа794, содержащую последовательность 5S рДНК пшеницы длиной 420 п.н. [43].

Эти пробы ДНК метили (прямое мечение) флуорохромами SpectrumAqua и SpectrumRed (“Abbott Molecular”, Германия) с использованием метода ник-трансляции в соответствии с протоколами фирмы-производителя.

Процедуру FISH с комбинацией меченных проб 45S и 5S рДНК, а также отмывку хромосомных препаратов проводили по ранее описанному методу [44].

После процедуры FISH хромосомные препараты окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндо́л), растворенным в среде Vectashield в конечной концентрации 0.1 мкг/мл (“Vector Laboratories”, Великобритания).

Хромосомные препараты анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX61 (“Olympus”, Япония), соединенного с монохромной CCD-камерой (“Roper Scientific, Inc. Cool Snap”, США). Полученные изобра-

жения обрабатывали с использованием стандартного программного обеспечения Adobe Photoshop 10.0 (“Adobe”, США). Для каждого сорта анализировали не менее пяти растений и 15 метафазных пластинок. Идентификацию хромосомных пар в кариотипах проводили на основе анализа размеров и морфологии хромосом, а также распределения хромосомных маркеров в соответствии с цитологической номенклатурой, предложенной ранее [45].

Геномную ДНК выделяли из 100–300 мг свежих листьев индивидуальных растений образцов *B. rapa* с помощью набора реактивов для выделения и очистки ДНК Genomic DNA Purification Kit согласно инструкции фирмы-производителя (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию ДНК и степень ее очистки определяли с использованием спектрофотометра Implen Nano Photometer N50 (“Implen”, Германия). Для оценки генетической гетерогенности исследовали не менее 15 индивидуальных растений каждого сорта.

Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с локуспецифическими парами праймеров, фланкирующими участки последовательностей генов, детерминирующих различия в устойчивости к пониженным отрицательным температурам и устойчивости к замораживанию у семейства Brassicaceae.

ПЦР проводили на амплификаторе SimpliAmp Thermal Cycler (“Applied Biosystems”) со следующими условиями реакции амплификации для

Таблица 1. Список изученных сортов *B. rapa* из разных мест произрастания

№	Номер по каталогу ВИР	Название вида	Название сорта	Страна происхождения
1	к-45	Капуста полевая <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg. (syn. <i>Brassica campestris</i> L.; <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>campestris</i> (L.) A.R. Clapham)	Gruber	Финляндия
2	к-44	Капуста полевая <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg. (syn. <i>Brassica campestris</i> L.; <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>campestris</i> (L.) A.R. Clapham)	Rapido	Финляндия
3	к-371	Капуста полевая <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg. (syn. <i>Brassica campestris</i> L.; <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>campestris</i> (L.) A.R. Clapham)	Злата	Россия
4	к-109	Капуста полевая <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg. (syn. <i>Brassica campestris</i> L.; <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>campestris</i> (L.) A.R. Clapham)	Латвийская	Латвия
5	к-1406	Репа кормовая – турнепс , <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> Metzg.	Brunstadnepe	Норвегия
6	к-1405	Репа кормовая – турнепс , <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> Metzg.	Ova Daehnfeldt	Дания
7	к-242	Репа листовая форма комацуна , <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> var. <i>komatsuna</i> Makino	Goseki Late	Япония
8	к-217	Репа листовая форма сирона , <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> f. <i>shirona</i> Kitam	Okute Oosaka Shirona	Япония

ДНК-маркеров (табл. 2): 5 мин при 95°C; 35 циклов: 15 с при 95°C, 30 с при температуре отжига (см. табл. 2, колонка T_a), 45 с при 72°C; и 10 мин при 72°C.

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер Taq Turbo (“Евроген”, Россия): 2.5 mM MgCl₂, 0.40 мкМ каждого праймера, 0.1 мкМ каждого dNTPs, 0.04 ед. HS Taq ДНК-полимеразы (“Евроген”) и 50–100 нг суммарной ДНК.

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 2.0%-ном агарозном геле с добавлением раствора бромида этидия до конечной концентрации 0.5 мкг/мл при напряжении 100 В в течение 60 мин. Результаты электрофореза документировали с использованием системы E-Box CX5 (“Vilber”, Германия), программное обеспечение E-Box CX5 TS Edge 18.01.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структурные варианты хромосом

В результате проведенного FISH-анализа проб 45S и 5S рДНК в кариотипах изученных образцов *V. rapa* обнаружено от 8 до 12 кластеров 45S рДНК и 6–10 кластеров 5S рДНК (табл. 3, рис. 1). При визуальном анализе выявлена вариабельность по размерам (интенсивности сигналов гибридизации) кластеров 45S и 5S рДНК на хромосомах 1, 2, 3, 4 и 5 (табл. 3, рис. 1). Кроме того, обнаружен

полиморфизм по числу кластеров 45S рДНК на хромосомах образцов масличного сорта Rapido к-44 (8–9–10 сайтов) и листового сорта Okute Oosaka Shirona к-217 (10–11–12 сайтов). В кариотипах образца масличного сорта Латвийская к-109 обнаружен полиморфизм по числу кластеров 5S рДНК (6–7–8). В кариотипе одного растения образца масличного сорта Gruber к-45 выявлена перестройка (изохромосома) одного из гомологов пары хромосомы 3. Кроме того, обнаружены дополнительные кластеры 45S и 5S рДНК в кариотипах образца листового сорта Goseki Late к-242 (хромосома 9L), а также сайт 45S рДНК у образца листового сорта Okute Oosaka Shirona к-217 (хромосома 7L). Следует заметить, что в кариотипах образцов масличных сортов Rapido к-44, Gruber к-45, Латвийская к-109 и листового сорта Okute Oosaka Shirona к-217 идентифицированы как гомоморфные, так и гетероморфные сочетания гомологов хромосом 3, 4 и 7 (табл. 3, рис. 1). В кариотипах кормовых сортов Brunstadnere к-1406 и Ova Daehnfeldt к-1405 внутрисортной полиморфизм по размерам и локализации кластеров 45S и 5S рДНК не выявлен. Между собой кариотипы этих сортов различались только размерами кластеров 45S рДНК на длинном плече хромосом 2 и 4.

SSR-анализ

При анализе с использованием SSR-маркера Na10-CO3 выявлен амплифицируемый фрагмент

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные для амплификации генетических маркеров

Генетический маркер	Последовательность, 5' → 3'	T_a , °C	Ссылка
Na 10-CO3	F: 5'-TTGGGTGTCTTTGTTACCCC-3' R: 5'-ACCGAGAAGACTGATACGGG-3'	58.0	[46]
CB10578	F: 5'-TGTCCACTCACTCTCTTTGTT-3' R: 5'-AGGCTAAGTTGAAGTGCAAG-3'	56.0	[46]
BrgMS653	F: 5'-AGGAAGGAAATTGTGATTGCTC-3' R: 5'-TGTAAGAGAGGTGTGGATTTGC-3'	57.0	[47]
BrgMS609	F: 5'-ATGGCTGTGAACCTGTGATGTG-3' R: 5'-CGGATGTTGGAAAGATGAGATT-3'	59.0	[47]
BrgMS5339	F: 5'-CTACCTGAAGATGACCCAGACG-3' R: 5'-GCATACAAACCTCGTCCTAAGC-3'	60.0	[47]
BoCCA1 (F/1R1)	F: 5'-TGCCTTGAGGCTTTACGGTAGAG-3' R: 5'-CTGAGCAGTTGTCTTCTGCAGA-3'	60.0	[24]
BoCCA1 (F/2R1)	F: 5'-TGCCTTGAGGCTTTACGGTAGAG-3' R: 5'-CAGTCCGGTCTTTCTAGGATAAGGG-3'	60.0	[24]
BoCCA1 (1F2/1R2)	F: 5'-AACGTCTCTGTACATGCTCCTC-3' R: 5'-CCATTCTCTTGCCTCTCCACCAAAG-3'	62.0	[24]
BoCCA1 (2F2/2R2)	F: 5'-GGACAAGGTCTCTATCAGATGCTCCTA-3' R: 5'-CTGCCTCAACATCATCACTACTCGAA-3'	62.0	[24]

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный праймер.

Таблица 3. Распределение кластеров рДНК на хромосомах изученных сортов *V. gara*

Образец	Хромосомы с 4S (/двойным сайтом рДНК)	Хромосомы с 5S рДНК	Хромосомы с колокализованными сайтами 4S (/двойным сайтом) + 5S рДНК, с указанием полиморфных или перестроенных вариантов хромосом				Общее число хромосом с 4S/5S рДНК (сортовые особенности)
			1 L ПЦ/ПК + ПК	3 L ПЦ/ПК + ПК	4 L ПЦ/ПК + МД	5 S ЯОР	
Rapido к-44	К/К	10 S СТ	К/К + 0	К/К + К	К/0 + 0 0/0 + 0	К + С	8–9–10/6 (гетероморфизм по 4S рДНК на хромосоме 4)
Латвийская к-109	К/0	С	К/К + 0	К/К + С	К/К + С К/К + 0	К + С	10/6–7–8 (гетероморфизм по 5S рДНК на хромосоме 4)
Злата к-371	К/М	С	С/К + С	С/С + С	0/0 + 0	К + К	8/8
Gruber к-45	К/С	С	С/К + 0	С/С + К i С/С + К	0/0 + 0	К + С	8/6 (гетероморфизм, изохромосома 3L)
Ova Daehnfeldt к-1406	К/С	С	К/К + 0	К/К + К	С/С + 0	К + С	10/6
Brunstadnepe к-1405	К/К	С	К/К + 0	К/К + К	К/К + 0	К + С	10/6
Goseki Late к-242	К/С	С	С/К + С	К/К + К	С/К + С	К + С	12/10 (на хромосоме 9L дополнительные сайты 4S и 5S рДНК)
Okute Oosaka Shitona к-217	К/С	С	С/К + С	К/К + К	К/К + С	К + С	10–11–12/8 (на хромосоме 7L дополнительный сайт 4S рДНК, гетероморфизм)

Примечание. Размеры сайтов рДНК: К – крупный; С – средний; М – мелкий. Расположение сайтов рДНК на хромосоме: L, S – длинное, короткое плечо хромосомы; ПЦ/ПК/МД/СТ/ЯОР – перикентромерный/проксимальный/медианный/субтеломерный/ядрышкообразующий район. Изохромосома – i.

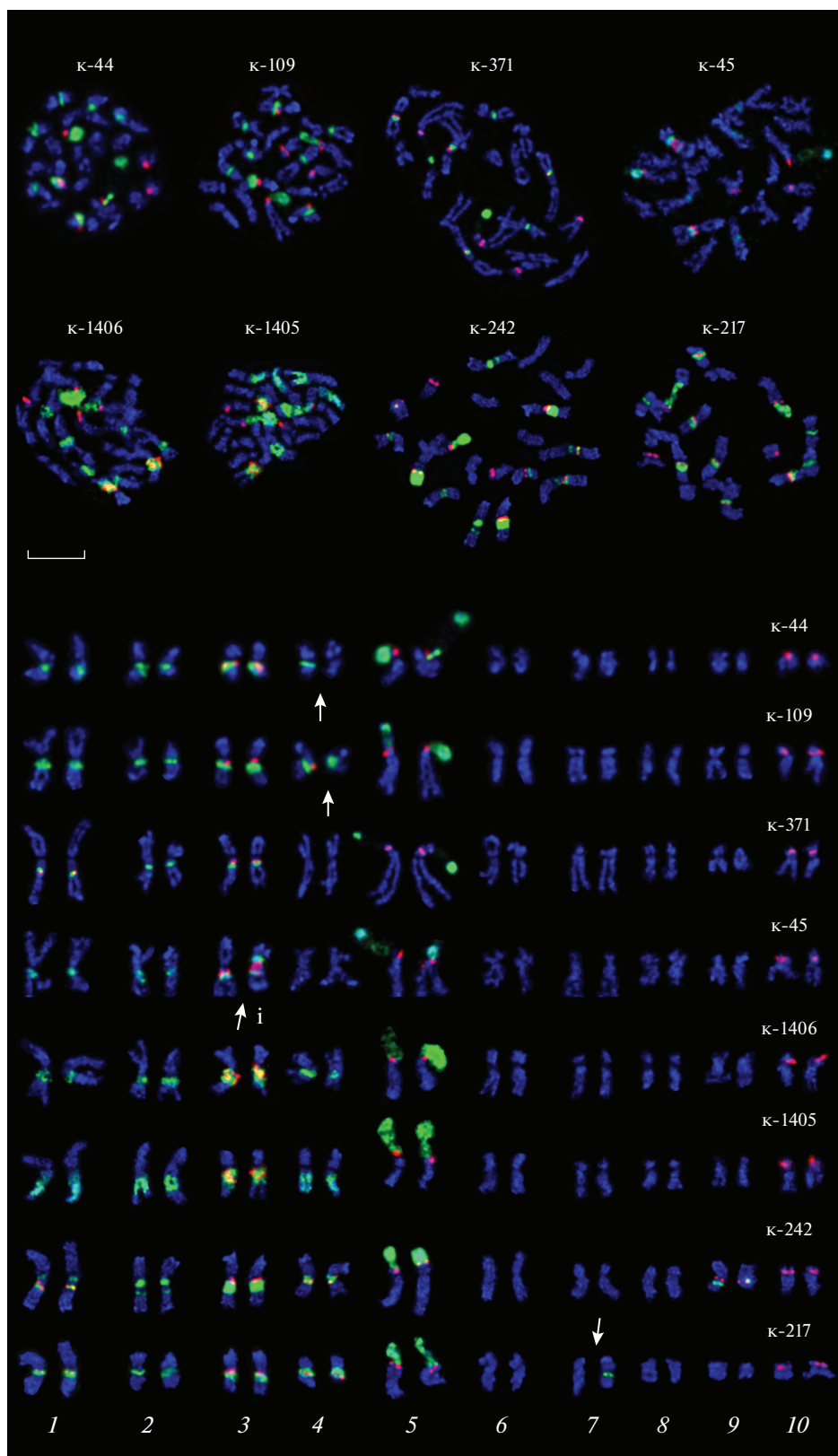


Рис. 1. Кариотипы изученных сортов *B. rapa*. Кариограммы и метафазные пластинки образцов после проведения процедуры FISH с пробами 45S (зеленые сигналы) и 5S (красные сигналы) рДНК. Стрелки указывают на гетероморфные сочетания гомологов хромосом; *i* – изохромосома. Масштабный отрезок – 5 мкм.

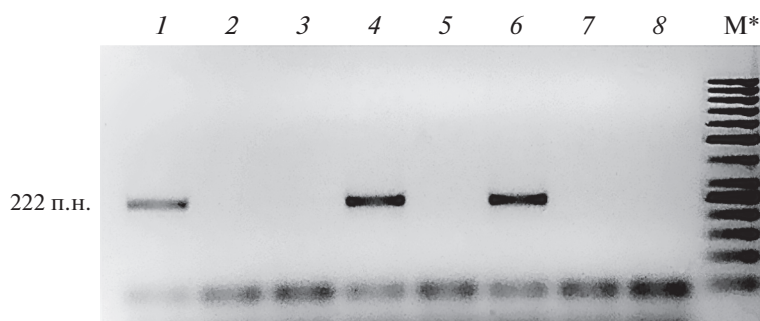


Рис. 2. Электрофоретическое разделение ампликонов для SSR-маркера Na10-CO3. Генотипы сортов *B. rapa*: 1 – Rapido, 2 – Gruber, 3 – Латвийская, 4 – Злата, 5 – Okute Oosaka Shirona, 6 – Goseki Late, 7 – Ova Daehnfeldt, 8 – Brunstadnepe. M* – маркер длин ДНК (здесь и далее).

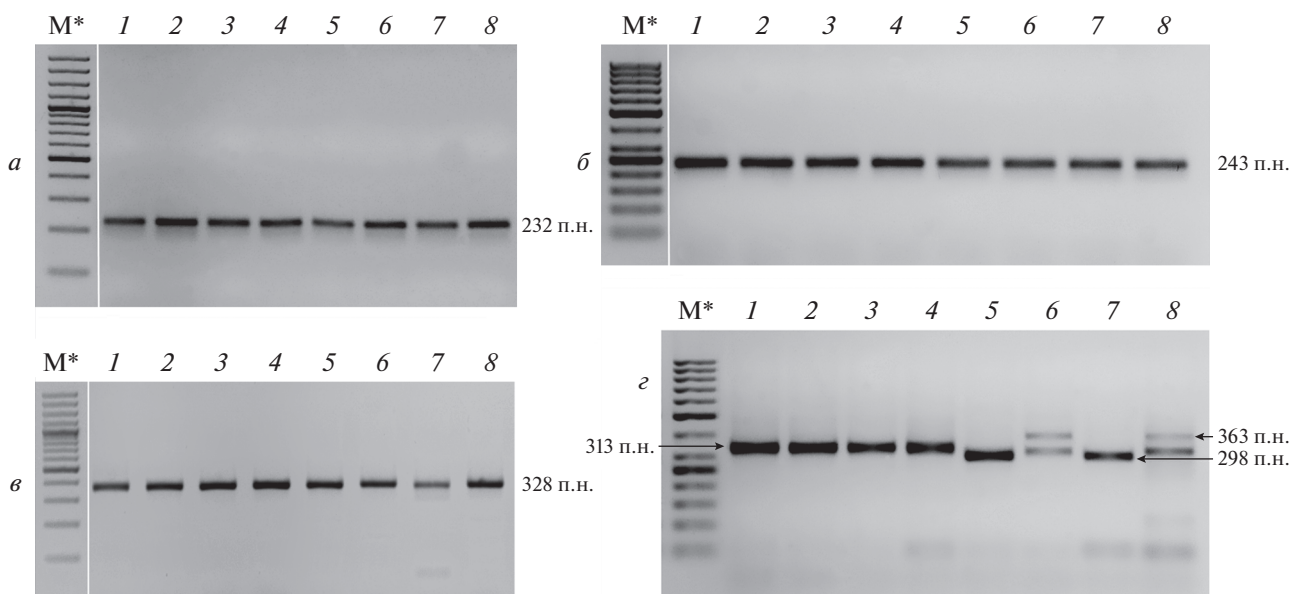


Рис. 3. Электрофоретическое разделение ампликонов для SSR-маркера: CB10578-1 (а), BrgMS653-2 (б); BrgMS609-1 (в), BrgMS5339 (г). Генотипы сортов *B. rapa*: 1 – Rapido, 2 – Gruber, 3 – Латвийская, 4 – Злата, 5 – Okute Oosaka Shirona, 6 – Goseki Late, 7 – Ova Daehnfeldt, 8 – Brunstadnepe.

размером 222 п.н. у масличных сортов Rapido к-44 и Злата к-371, а также у листового сорта Goseki Late к-242. У остальных сортов (масличных сортов Gruber к-45 и Латвийская к-109, листового сорта Okute Oosaka Shirona к-217 и двух кормовых сортов Brunstadnepe к-1406 и Ova Daehnfeldt к-1405) эта последовательность не обнаружена (рис. 2).

Исследован полиморфизм SSR-маркеров CB10578-1, BrgMS653-2, BrgMS609-1 и BrgMS5339-1 из группы сцепления LG6 *B. napus*, ассоциированных с QTL-областями qSPADYL-6, qSPADYS-6 и qMDAYS-6. Установлено, что SSR-маркеры CB10578-1, BrgMS653-2 и BrgMS609-1 электрофоретически мономорфны, поэтому дифференцировать по ним изученные сорта *B. rapa* не представлялось возможным (рис. 3а–в). Для SSR-маркера BrgMS5339-1, фланкирующего области qSPADYS-6

и qMDAYS-6, определены полиморфные фрагменты. Последовательность размером 313 п.н. детектировали у масличных сортов Gruber к-45, Rapido к-44, Злата к-371 и Латвийская к-109. У листового сорта Goseki Late к-242 и кормового сорта Brunstadnepe к-1406 идентифицированы полиморфные фрагменты размером 313 п.н. и 363 п.н., а у листового сорта Okute Oosaka Shirona к-217 и кормового сорта Ova Daehnfeldt к-1405 – последовательность размером 298 п.н. (рис. 3г).

Анализ с помощью SCAR-маркеров

У всех исследованных масличных и листовых сортов ПЦР-анализ с использованием праймеров BoCCA1-F/BoCCA1-1R1 выявил фрагмент размером 987 п.н., соответствующий аллелю *BoCCA1-1*,

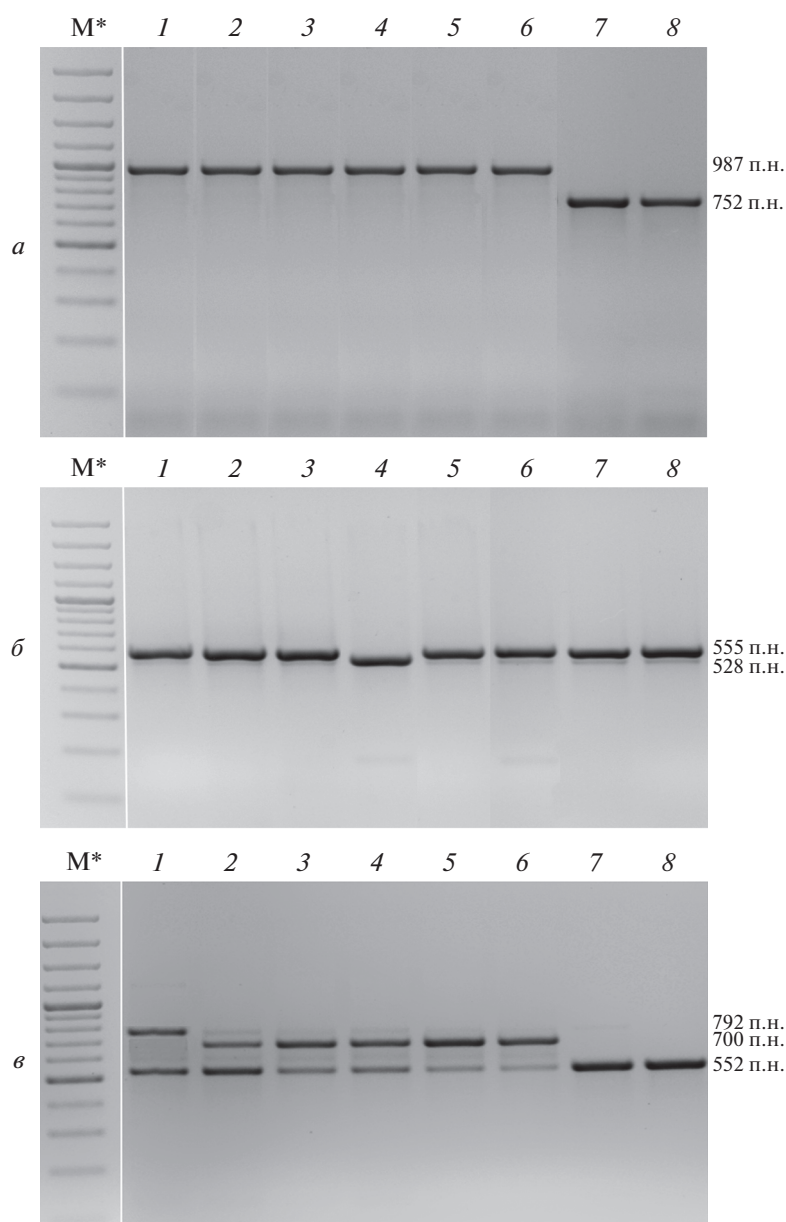


Рис. 4. Электрофоретическое разделение ампликонов для аллеля *BoCCA1-1* (F/1R1) (а), *BoCCA1-1* (1F2/1R2) (б), *BoCCA1-2* (F/2R1) (в). Генотипы сортов *B. rapa*: 1 – Rapido, 2 – Gruber, 3 – Латвийская, 4 – Злата, 5 – Okute Oosaka Shirona, 6 – Goseki Late, 7 – Ova Daehnfeldt, 8 – Brunstadnepe.

который связан с формированием холодоустойчивости у *B. oleracea* и *B. napus*. Для сортов репы кормовой Ova Daehnfeldt к-1405 и Brunstadnepe к-1406 идентифицирован фрагмент размером 752 п.н., который соответствовал аллелю *BoCCA1-2*, характерному для восприимчивых к холоду форм *B. napus* (рис. 4а). ПЦР-анализ с праймерами *BoCCA1-1F2/BoCCA1-1R2* выявил у масличного сорта Злата к-371 амплифицируемый фрагмент размером 528 п.н., а для остальных изученных сортов *B. rapa* фрагмент размером 555 п.н. (рис. 4б).

В результате ПЦР-анализа с праймерами *BoCCA1-F/BoCCA1-2R1* последовательность ал-

леля *BoCCA1-2* обнаружена у всех исследованных масличных и листовых сортов. Так, у масличного сорта Rapido к-44 выявлен фрагмент размером 792 п.н.; у масличных сортов Gruber к-45, Латвийская к-109, Злата к-371 и листовых сортов Okute Oosaka Shirona к-217 и Goseki Late к-242 – размером 700 п.н. У всех этих сортов также идентифицирован фрагмент размером 552 п.н., а у кормовых сортов репы Ova Daehnfeldt к-1406 и Brunstadnepe к-1405 детектировали только этот фрагмент (рис. 4в). При использовании праймеров *BoCCA1-2F2/BoCCA1-2R2* у всех изученных сортах выявлен фрагмент размером 531 п.н.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В регионах рискованного земледелия экстремальные погодные условия представляют серьезную проблему для сельского хозяйства, что вызывает необходимость получения новых сортов, устойчивых к абиотическому и в частности к холодовому стрессу [13, 48]. Установлено, что растения отвечают на холодовой стресс путем индукции экспрессии факторов транскрипции, регулирующих гены даунстрим, что обеспечивает им устойчивость к низким температурам. [49]. В этом случае белки CBF распознают и связываются с последовательностью CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element) в промоторе многих COR-генов, таким образом регулируя транскрипцию генов даунстрим [50]. Показано, что при холодовом стрессе у растений белок STCH4 (sensitive to chilling 4) модулирует процессинг рРНК и, будучи фактором биогенеза рибосом, модулирует их формирование и запускает процесс устойчивости к холоду путем стимуляции трансляции белков CBF, необходимых для выживания растений при низких температурах [51]. Семейство генов рРНК занимает большую часть ядерного генома и отличается, с одной стороны, высокой степенью сохранности последовательностей и функций, а с другой – широким диапазоном варибельности по числу копий (CNV) и их локализации в геноме [26]. Показано, что число копий рДНК может варьировать как между видами, так и внутри видов [28, 42, 52, 53]. Например, в геноме *L. usitatissimum* число лабильных последовательностей ДНК, таких как гены рРНК, может изменяться в зависимости от условий окружающей среды [54, 55]. При абиотическом (холодовом) стрессе в геноме *Solanum tuberosum* CNV наблюдали для генов, связанных с адаптацией и устойчивостью растений; причем в этот процесс было вовлечено около 30% генома, в том числе рДНК [56]. Понятно, что это привело к высокой гетерогенности генома.

В результате проведенного нами FISH-анализа с использованием зондов 45S и 5S рДНК выявлен значительный полиморфизм по числу и распределению кластеров рибосомных генов на хромосомах озимых сортов *B. rapa*, районированных в регионах рискованного земледелия. Как правило, в кариотипах *B. rapa* кластеры 45S рДНК локализованы на парах хромосом 1, 2, 3, 4 и 5, а кластеры 5S рДНК – на парах хромосом 1, 3, 4, 5 и 10, причем на четырех парах хромосом (1, 3, 4 и 5) сайты 45S и 5S рДНК обычно расположены совместно [38, 45]. Сходное распределение кластеров рДНК наблюдали на хромосомах изучаемых нами кормовых сортов, за исключением отсутствия сигналов 5S рДНК на хромосомах 1 и 4. Кроме того, эти сорта были наименее полиморфными по локализации кластеров рДНК на хромосомах среди всех изученных нами сортов. У масличных сортов часто

встречался гетероморфизм гомологов по локализации кластеров 45S и 5S рДНК, а у масличного сорта Gruber к-45 была обнаружена изохромосома по длинному плечу хромосомы 3 с удвоением всех сайтов рДНК. У изученных листовых сортов, как и у масличных сортов, мы наблюдали гетероморфизм гомологов по локализации сайтов рДНК, а также редкие полиморфные варианты наличия кластеров 45S и 5S рДНК на хромосоме 9 и 45S рДНК на хромосоме 7. Ранее подобная локализация сайтов рДНК на хромосомах 7 и 9 не была описана для *B. rapa* и других видов рода *Brassica*, содержащих А-субгеном [38, 45]. Наличие полиморфизма по числу и активности рибосомных генов считается одним из генетических показателей, отражающих устойчивость к абиотическому стрессу. Известно, что большое число генов, участвующих в различных функционально значимых клеточных механизмах, в том числе холодоустойчивости, тесно связаны с экспрессией рРНК [51, 56, 57]. При изучении популяций некоторых видов хвойных растений обнаружено влияние стрессовых факторов среды на уровень внутривидового полиморфизма по числу копий рДНК [58, 59], а также на изменение числа локусов 45S и 5S рДНК, выявляемое в кариотипах методом FISH [60, 61]. Изменение числа локусов 45S рДНК в зависимости от мест произрастания популяций наблюдали в кариотипах и других видов растений, в том числе *Phaseolus vulgaris* [27] и видов рода *Capsicum* [29]. Внутривидовая изменчивость числа сайтов 45S и 5S рДНК обнаружена в кариотипах сортов озимого и ярового рапса, адаптированных к определенным климатическим зонам [39]. В результате проведенного нами исследования показано, что в кариотипах изученных масличных, листовых и кормовых озимых сортов *B. rapa* повышен уровень хромосомного полиморфизма по числу и распределению сайтов рибосомных генов. Таким образом, подтверждена отмеченная другими авторами адаптивная значимость этого показателя.

Ранее отмечено, что в формировании устойчивости *B. rapa* и родственных видов *B. oleracea* и *B. napus* к низким температурам задействовано множество генов, запускающих ответ на холодовой стресс [21, 22, 24]. Для анализа сортов *B. rapa* мы использовали различные молекулярные маркеры, выявляющие холодоустойчивость генотипов у всех трех родственных видов. Так, Huang и др. [21] идентифицировали SSR-маркер Na10-CO3, ассоциированный с пониженным содержанием MDA и относительной проводимостью клеточной мембраны у растений *B. rapa*. Этот ДНК-маркер позволял достоверно дифференцировать устойчивые и неустойчивые к холоду растений F2 популяции *B. rapa*, полученной от скрещивания холодостойкого сорта Longyou 6 и не устойчивого к холоду сорта Tianyou 4. Использование маркера Na10-CO3 позволило нам обнаружить последовательность раз-

мером 222 п.н., определяющую устойчивость к пониженным температурам, только у двух масличных сортов и одного листового сорта. У кормовых сортов устойчивость по этому маркеру не обнаружена. Учитывая, что кормовую репу традиционно выращивают в районах рискованного земледелия, нами подтверждено, что устойчивость и чувствительность к холодовому стрессу обеспечивается комплексом генов.

Нами исследован полиморфизм четырех маркерных микросателлитных локусов из группы сцепления LG6 *B. napus*, сцепленных с QTL, ассоциированными с холодостойкостью. Ранее установлено, что гены устойчивости к пониженным температурам могут располагаться в области 1.069–15.652 М на хромосоме A08. Выявлено два гена, *BnaA08g05330D* и *BnaA08g15470D*, кодирующих COR-белки, и установлено, что эти гены определяют формирование холодостойких генотипов у *B. napus*. Замечено высокое сходство последовательностей генов COR *B. napus* с генами *Bra039858* и *Bra01579* *B. rapa* [22]. Нами установлено, что три SSR-маркера: CB10578-1, BrgMS653-2 и BrgMS609-1 – мономорфны и не дифференцируют изученные сорта *B. rapa*. Для SSR-маркера BrgMS5339-1 идентифицированы полиморфные фрагменты размером 313 п.н. и 363 п.н. у листового сорта Goseki Late к-242 и кормового сорта Brunstadnere к-1406. У всех исследованных масличных сортов детектировали только последовательность размером 313 п.н. Используя этот маркер, мы обнаружили один фрагмент размером 298 п.н. у листового сорта Okute Oosaka Shirona и кормового сорта Ova Daehnfeldt. Можно предположить, что выявленные различия по длине фрагментов связаны с микроделециями, инсерциями или точечными мутациями в геномах изученных сортов.

Известно, что циркадные ритмы влияют на многие физиологические и метаболические процессы у растений. Белок CCA1 играет важную роль в фитохромзависимой индукции фотосинтетических генов и регуляции циркадных ритмов. В условиях воздействия пониженных температур CCA1 определяет различия растений по степени устойчивости к холоду [23]. У *B. oleracea* обнаружены два аллеля гена *BoCCA1*: *BoCCA1-1* (тип BN106, ассоциированный с морозостойкостью) и *BoCCA1-2* (тип BN106, определяющий чувствительность растений к отрицательным температурам) [24]. Учитывая близкое родство геномов *B. rapa* и *B. oleracea*, мы провели поиск гомеологичных аллелей гена *BoCCA1* у изученных сортов.

Ранее показано, что пары праймеров *BoCCA1-F/BoCCA1-1R1* и *BoCCA1-1F2/BoCCA1-1R2* позволяют выявлять последовательности, связанные с формированием холодостойкости у *B. oleracea* и *B. napus*. Первая пара праймеров фланкирует аллель *BoCCA1-1* и позволяет амплифицировать

фрагмент размером 987 п.н. у устойчивых к холоду форм *B. oleracea* и *B. napus* [24, 40]. Кроме того, у восприимчивых к холоду форм *B. napus* эта пара праймеров также выявляет фрагмент размером 752 п.н., который соответствует размеру последовательности аллеля *BoCCA1-2* [40]. Вторая пара праймеров позволяет амплифицировать фрагмент размером 555 п.н. у устойчивых к холоду форм *B. oleracea* [24]. Проведенный нами ПЦР-анализ с использованием пары праймеров *BoCCA1-F/BoCCA1-1R1* позволил выявить у изученных масличных и листовых сортов аллель *BoCCA1-1*, характерный для холодостойких форм (фрагмент размером 987 п.н.). Заметим, что только у сортов репы кормовой амплифицировался фрагмент размером 752 п.н., характерный для чувствительных к холоду форм и соответствующий аллелю *BoCCA1-2*. Учитывая тот факт, что размеры амплифицируемых фрагментов у изученных сортов *B. rapa* соответствовали размерам гомеологичных фрагментов у *B. oleracea* и *B. napus*, использование пары праймеров *BoCCA1-F/BoCCA1-1R1* можно считать перспективным для эффективного выявления SCAR-маркера, дифференцирующего аллели *BoCCA1-1* и *BoCCA1-2* у *B. rapa*. Третья пара праймеров, *BoCCA1-1F2/BoCCA1-1R2*, выявляла у изученных сортов фрагмент размером 555 п.н., характерный для устойчивых к холоду форм *B. oleracea* [24]. Однако размеры амплифицируемых фрагментов практически не отличались у изучаемых сортов *B. rapa*, что не позволило нам дифференцировать сорта по этой последовательности.

Известно, что пары праймеров *BoCCA1-F/BoCCA1-2R1* и *BoCCA1-2F2/BoCCA1-2R2* могут выявлять последовательности, характерные для восприимчивых к холоду генотипов *B. oleracea* и *B. napus*. Первая пара, фланкирующая аллель *BoCCA1-2*, позволяет амплифицировать у восприимчивых к холоду образцов фрагмент размером 792 п.н., а вторая пара определяет фрагмент размером 531 п.н. [24, 40]. Использование первой пары праймеров позволило нам выявить аллель *BoCCA1-2* у всех изученных масличных и листовых сортов; при этом, у масличного сорта Rapido к-44 обнаружен фрагмент размером 792 п.н., соответствующий аналогичному фрагменту у *B. napus*, а у масличных сортов Gruber к-45, Латвийская к-109, Злата к-371 и листовых сортов Okute Oosaka Shirona к-217 и Goseki Late к-242 – фрагмент меньшего размера (700 п.н.). Также у всех этих сортов выявлен фрагмент размером 552 п.н. Ранее в последовательности гена *CCA1* выявили многочисленные делеции, инсерции и точечные мутации [24]. Из чего можно предположить, что у ряда сортов *B. rapa* произошла делеция в последовательности аллеля *BoCCA1-2*, но это пока только гипотеза. Использование второй пары праймеров, *BoCCA1-2F2/BoCCA1-2R2*, позволило нам

выявить у всех масличных, листовых и кормовых сортов последовательность размером 531 п.н., которая также связана с чувствительностью образцов к холоду [24, 40]. Одинаковый размер фрагмента, амплифицируемого этими праймерами, не представляет возможности дифференцирования изучаемых сортов по этому параметру.

Таким образом, в представленной работе определены пары праймеров, выявляющие полиморфные фрагменты ДНК, которые позволяют дифференцировать генотипы *B. rapa* по устойчивости и восприимчивости к низким температурам и выявлять аллели *BoCCA1-1* и *BoCCA1-2*, ассоциированные с этими особенностями генотипов.

В результате проведенного нами сравнительного анализа полученных результатов показано, что для кормовых сортов — у них выявлено наименьшее число полиморфных вариантов хромосом с сайтами 45S и 5S рДНК — характерны наименее устойчивые к холоду генотипы. У масличных и листовых сортов *B. rapa* обнаружено наибольшее число маркеров, связанных с холодоустойчивостью; при этом в кариотипах этих сортов выявлен высокий уровень полиморфизма по числу и локализации на хромосомах кластеров рДНК, в том числе наличие гетероморфных вариантов хромосом.

Таким образом, в результате комплексного изучения хромосомной изменчивости рибосомных генов и молекулярных маркеров холодоустойчивости, проведенного среди масличных, листовых и кормовых сортов высокополиморфного вида *B. rapa*, обнаружено, что наименее устойчивые генотипы обладают меньшим хромосомным полиморфизмом по числу и хромосомной локализации кластеров рибосомных генов и наоборот. Полученные в настоящей работе результаты могут представлять интерес для практической селекции при выведении новых, устойчивых к низким температурам сортов *B. rapa*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-54-00027 Бел_а), а также в рамках договора с Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований (№ Б18Р-108 от 30.06.2018 г. “Комплексное изучение формирования морозостойкости на уровне геномов у рапса и сурепицы”) и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 0120136 3824).

Статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемьева А.М., Чесноков Ю.В., Клоке Э. (2008) Генетическое разнообразие и внутривидовые филогенетические взаимоотношения культур вида *Brassica rapa* L. по результатам анализа микросателлитов. *Информ. вестник ВОГУС*. **12**, 608–619.
2. Nagaharu U., Nagaharu N. (1935) Genome analysis of *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *J. Japan. Bot.* **7**, 389–453.
3. Lu K., Wei L., Li X., Wang Y., Wu J., Liu M., Zhang C., Chen Z., Xiao Z., Jian H., Cheng F., Zhang K., Du H., Cheng X., Qu C., Qian W., Liu L., Wang R., Zou Q., Ying J., Xu X., Mei J., Liang Y., Chai Y.-R., Tang Z., Wan H., Ni Y., He Y., Lin N., Fan Y., Sun W., Li N.-N., Zhou G., Zheng H., Wang X., Paterson A.H., Li J. (2019) Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement. *Nat. Commun.* **10**(1), 1154.
4. Bailey L.H. (1940) Certain noteworthy *Brassic*es. *Genets Herb.* **4**(9), 318–330.
5. Olsson G. (1954) Crosses within the campestris group of the genus *Brassica*. *Hereditas*. **40**, 398–418.
6. Синская Е.Н. (1969) *Историческая география культурной флоры*. Ленинград: Наука.
7. Tomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 571–599.
8. Cook G. (2004) *Genetically Modified Language. The Discourse of Arguments for GM Crops and Food*. London, UK: Routledge.
9. Thomashow M.F. (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* **118**, 1–7.
10. Cui B.M., Li Y.X., Le J.H., Zheng M.G., Bao H.F. (2003) Cloning and sequence analysis of *COR15a* gene from *Arabidopsis thaliana*. *J. Shihezi University.* **7**, 87–89.
11. Zhong K.Y., Ye M.S., Hu X.W., Guo J.C. (2006) Role of the transcription factors CBF in plant cold tolerance. *Yi Chuan.* **28**, 249–254.
12. Zhang T.G., Mao Y.S., Chen Q.Q., Zhou K., Sun W.C. (2016) Cloning and expression analysis of *COR15*-like gene in *Brassica campestris* ‘Longyou 6’. *Acta Agric. Bo-reali-Occident. Sin.* **25**, 707–714.
13. Mickelbart M.V., Hasegawa P.M., Bailey-Serres J. (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 237–251.
14. Zhu J.K. (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell.* **167**, 313–324.
15. Ananga A.O., Cebert E., Ochieng J.W., Kumar S., Kambiranda D., Vasanthaiah H., Tsolova V., Senwo Z., Konan K., Anike F.N. (2012) Prospects for transgenic and molecular breeding for cold tolerance in canola (*Brassica napus* L.). In: *Oilseeds*. Ed. Akpan U.G. Croatia: InTech, 1–32.
16. Smolenska-Sym G., Kacperska A. (1994) Phosphatidylinositol metabolism in low temperature-affected winter oilseed rape leaves. *Physiol. Plant.* **91**, 1–8.
17. Smolenska-Sym G., Kacperska A. (1996) Inositol 1,4,5-triphosphate formation in leaves of winter oil seed rape plants in response to freezing tissue water potential and abscisic acid. *Physiol. Plant.* **96**, 692–698.

18. Testerink C., Munnik T. (2005) Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* **10**, 368–375.
19. Lin Y., Guo W., Xu Z., Jia Z. (2012) Cold resistance and changes in MDA and soluble sugar of leaves of *Ligustrum lucidum* Ait in winter. *Chin. Agric. Sci. Bull.* **25**, 68–72. https://www.oriprobe.com/journals/zgnxtb/2012_25.html
20. Huang H.L., Cao Z.Y., Tang B., Ning Z.L., Cui Z.B., Zhou Y.P. (2014) Electrical conductivity analysis of 17 rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties' cold resistance. *Hunan Agric. Sci.* **21**, 1–3.
21. Huang Z., Zhang X., Jiang S., Qin M., Zhao N., Lang L., Liu Y., Tian Z., Liu X., Wang Y., Zhang B., Xu A. (2017) Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* L. *Breed. Sci.* **67**, 213–220.
22. Huang Z., Zhao N., Qin M., Xu A. (2018) Mapping of quantitative trait loci related to cold resistance in *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.* **231**, 147–154.
23. Green R.M., Tobin E.M. (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 4176–4179.
24. Song H., Yi H., Han C.-T., Hur Y. (2018) Allelic variation in *Brassica oleracea* CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (*BoCCA1*) is associated with freezing tolerance. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **59**, 423–434.
25. Cattivell L., Baldi P., Crosatti C., Di Fonzo N., Faccioli P., Grossi M., Mastrangelo A.M., Pecchioni N., Stanca A.M. (2002) Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. *Plant Mol. Biol.* **48**, 649–665.
26. Kobayashi T. (2008) A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus – rDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays.* **30**, 267–272.
27. Pedrosa-Harand A., de Almeida C.C., Mosiolek M., Blair M.W., Schweizer D., Guerra M. (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor. Appl. Genet.* **112**, 924–933.
28. Long Q., Rabanal F.A., Meng D., Huber C.D., Farrow A., Platzer A., Zhang Q., Vilhjalmsson B.J., Korte A., Nizhynska V., Voronin V., Korte P., Sedman L., Mandáková T., Lysak M.A., Seren Ü., Hellmann I., Nordborg M. (2013) Massive genomic variation and strong selection in *Arabidopsis thaliana* lines from Sweden. *Nat. Genet.* **45**, 884–890.
29. Scaldaferrero M.A., da Cruz M.V., Cecchini N.M., Moscone E.A. (2016) FISH and AgNor mapping of the 45S and 5S rRNA genes in wild and cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Genome.* **59**, 95–113.
30. Cullis C.A. (1979) Quantitative variations of ribosomal RNA genes in flax genothrophs. *Heredity.* **42**, 237–246.
31. Sobol' M.A. (2001) Role of the nucleolus in plant cell response to environmental physical factors. *Tsitol. Genet.* **35**, 72–84.
32. Boulon S., Westman B.J., Hutten S., Boisvert F.-M., Lamond A.I. (2010) The nucleolus under stress. *Mol. Cell.* **40**, 216–227.
33. Goryachkina O.V., Badaeva E.D., Muratova E.N., Zelenin A.V. (2013) Molecular cytogenetic analysis of Siberian *Larix* species by fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Syst. Evol.* **299**, 471–479.
34. Kamisugi Y., Nakayama S., O'Neil C.M., Mathias R.J., Trick M., Fukui K. (1998) Visualization of the *Brassica* self-incompatibility S-locus on identified oilseed rape chromosomes. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1081–1087.
35. Schrader O., Budahn H., Ahne R. (2000) Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 665–669.
36. Snowdon J., Friedt W. (2004) Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breed.* **123**, 1–8.
37. Hasterok R., Wolny E., Hosiawa M., Kowalczyk M., Kulak-Ksiazczyk S., Ksiazczyk T., Heneen W.K., Maluszynska J. (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Ann. Bot.* **97**, 205–216.
38. Zheng J.S., Sun C.Z., Xiao D., Zhang S.N., Bonnet G., Hou X.L. (2015) Karyotype variation and conservation in morphotypes of non-heading Chinese cabbage. *Plant Syst. Evol.* **301**, 1781–1791.
39. 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. (2014) Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers. *J. Genet.* **93**, 133–143.
40. Мозгова Г.В., Хоружий Н.Е., Амосова А.В., Пиллюк Я.Э., Белявский В.М., Лемеш В.А., Муравенко О.В. (2019) Генетический полиморфизм рапса (*Brassica napus*) в связи с морозостойкостью. *Молекулярная и прикладная генетика.* **26**, 34–44.
41. Muravenko O.V., Amosova A.V., Samatadze T.E., Popov K.V., Poletaev A.I., Zelenin A.V. (2003) 9-aminoacridin: an efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis. *Cytometry A.* **51**, 52–57.
42. Gerlach W.L., Bedbrook J.R. (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1869–1885.
43. Gerlach W.L., Dyer T.A. (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **8**, 4851–4865.
44. Muravenko O.V., Yurkevich O.Yu., Bolsheva N.L., Samatadze T.E., Nosova I.V., Zelenina D.A., Volkov A.A., Popov K.V., Zelenin A.V. (2009) Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetica.* **135**, 245–255.
45. Amosova A.V., Zemtsova L.V., Yurkevich O.Yu., Zhidkova E.N., Shostak N.G., Muravlev A.A., Artemyeva A.M., Samatadze T.E., Zoshchuk S.A., Muravenko O.V. (2017) Genomic changes in generations of synthetic rapeseed-like allopolyploid grown under selection. *Euphytica.* **213**, 217–229.
46. Piquemal J., Cinquin E., Couton F., Rondeau C., Seignoret E., Doucet I., Perret D., Villeger M.J., Vincourt P., Blanchard P. (2005) Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* **111**, 1514–1523.

47. Xu J., Qian X., Wang X., Li R., Cheng X., Yang Y., Fu J., Zhang S., King G.J., Wu J., Liu K. (2010) Construction of an integrated genetic linkage map for the A genome of *Brassica napus* using SSR markers derived from sequenced BACs in *B. rapa*. *BMC Genomics*. **11**, 594.
48. Porter J.R., Semenov M.A. (2005) Crop responses to climatic variation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **360**, 2021–2035.
49. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* **12**, 444–451.
50. Zhao C., Lang Z., Zhu J.K. (2015) Cold responsive gene transcription becomes more complex. *Trends Plant Sci.* **20**, 466–468.
51. Yu H., Kong X., Huang H., Wu W., Park J., Yun D.J., Lee B.H., Shi H., Zhu J.K. (2020) STCH4/REIL2 confers cold stress tolerance in *Arabidopsis* by promoting rRNA processing and CBF protein translation. *Cell Reports*. **30**, 229–242.
52. Rogers S.O., Bendich A.J. (1987) Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* **9**, 509–520.
53. Bustamante F.O., Rocha L.C., Torres G.A., Davide L.C., Mittelman A., Techio V.H. (2014) Distribution of rDNA in diploid and polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and fragile sites in 45S rDNA regions. *Crop Sci.* **54**, 617–625.
54. Oh T.J., Cullis C.A. (2003) Labile DNA sequences in flax identified by combined sample representational difference analysis (csRDA). *Plant Mol. Biol.* **52**, 527–536.
55. Cullis C.A. (2005) Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. *Ann. Bot.* **95**, 201–206.
56. Hardigan M.A., Crisovan E., Hamilton J.P., Kim J., Laimbeer P., Leisner C.P., Manrique-Carpintero N.C., Newton L., Pham G.M., Vaillancourt B., Yang X., Zeng Z., Douches D.S., Jiang J., Veilleux R.E., Buell C.R. (2016) Genome reduction uncovers a large dispensable genome and adaptive role for copy number variation in asexually propagated *Solanum tuberosum*. *Plant Cell*. **28**, 388–405.
57. Li B., Kremling K.A.G., Wu P., Bukowski R., Romy M.C., Xie E., Buckler E.S., Chen M. (2018) Co-regulation of ribosomal RNA with hundreds of genes contributes to phenotypic variation. *Genome Res.* **28**, 1555–1565.
58. Govindraju D.R., Cullis C.A. (1982) Ribosomal DNA variation among populations of *Pinus rigida* Mill. (pitch pine) ecosystem. I. Distribution of copy numbers. *Heredity*. **69**, 133–140.
59. Bobola M.S., Smith D.E., Klein A.S. (1992) Five major nuclear chromosome repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 125–137.
60. Bogunić F., Muratović E., Ballian D., Siljak-Yakovlev S., Brown S. (2007) Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Environ. Exp. Bot.* **59**, 354–360.
61. Bogunić F., Siljak-Yakovlev S., Muratović E., Ballian D. (2011) Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. *Plant Biol.* **13**, 194–200.

GENOMIC MARKERS ASSOCIATED WITH COLD-HARDINESS IN *Brassica rapa* L.

A. V. Amosova¹, T. E. Samatadze¹, G. V. Mozgova², V. N. Kipen², A. G. Dubovskaya³, A. M. Artemyeva³,
O. Yu. Yurkevich¹, S. A. Zoshchuk¹, V. A. Lemesh², and O. V. Muravenko¹. *

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

³Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, 190000 Russia

*e-mail: olgmur1@yandex.ru

Brassica rapa L. is a valuable and widespread species, but its cultivation in the risk farming areas requires development of high quality cold-hardy varieties. Mechanisms of cold stress regulation in plants involve expression of numerous genes including ribosomal ones, and relate to plant chromosome variability. In the present study, with the use of FISH- and PCR-based methods, the investigation of intraspecific chromosomal polymorphism on number and localization of 45S and 5S rDNA clusters and also variability of molecular markers associated with cold-hardiness was performed for the first time within winter *B. rapa* cultivars from the risk farming areas. Our study identified the SSR-markers (Na10-CO3, BrgMS5339-1) and SCAR-markers (BoCCA1-F/BoCCA1-1R1, BoCCA1-F/BoCCA1-2R1) which can be used as a diagnostic for determination of cold-resistant and cold-susceptible genotypes of *B. rapa*. In oilseed and leaf cultivars, we revealed more molecular markers associated with cold-hardiness and a higher level of polymorphism on chromosomal distribution of 45S and 5S rDNA including chromosome heteromorphism, if compared with to the fodder cultivars. Thus, the genotypes which were least resistant to cold possessed lowest level of chromosomal polymorphism on distribution of 45S and 5S rDNA clusters and vice versa. Our findings could be useful for the development of new cold-tolerant *B. rapa* varieties.

Keywords: *Brassica rapa* L., cold-resistance, SSR-markers, alleles, SCAR-markers, FISH, 45S rDNA, 5S rDNA, chromosomal polymorphism