

# Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

М.Н. Шаптуренко<sup>1</sup>, Т.В. Печковская<sup>1</sup>, С.И. Вакула<sup>1</sup>, А.В. Якимович<sup>2</sup>, Ю.М. Забара<sup>2</sup>, Л.В. Хотылева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Республиканское унитарное предприятие «Институт овощеводства», Минская область, Минский район, пос. Самохваловичи, Беларусь

Капуста белокочанная как перекрестноопыляющаяся культура характеризуется высоким уровнем внутривидовой гетерогенности, что обуславливает трудности при создании генетически однородного материала и поддержании его чистоты. Одним из наиболее эффективных инструментов оценки генетического полиморфизма являются микросателлиты, которые относятся к высокополиморфным маркерам растительных геномов. Среди них наибольший интерес представляют EST-SSR, которые непосредственно связаны с экспрессирующимися областями и широко используются для анализа генетического разнообразия и структуры популяций. В связи с этим было проведено изучение эффективности использования трансферабельных EST-SSR-маркеров для межсортовой дифференциации и типирования индивидуальных растений *B. oleracea* var. *capitata*. В результате дана характеристика информативности 15 микросателлитных локусов. Определены эффективные мультиаллельные маркеры Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc, BoPC15 с высоким уровнем информационного содержания (PIC > 0,7), которые могут успешно использоваться для анализа меж- и внутрисортного полиморфизма *B. oleracea* var. *capitata*, включая типирование индивидуальных растений. На основе оценки аллельного состава SSR-локусов установлена генетическая структура селекционной коллекции капусты белокочанной и показано, что большинство экспериментальных форм, несмотря на различное происхождение, имеют общую предковую генетическую основу. Определены доноры редких аллелей, которые могут служить источником ценных генетических сегрегаций для селекционного улучшения капусты белокочанной. Показано, что межсортовой полиморфизм, выраженный в аллельном разнообразии изученных SSR-локусов, в значительной мере облегчает сортовую идентификацию и типирование индивидуальных растений при селекции. Полученная информация является основой для селекционного отбора генетически выровненного материала, а также дивергентных комбинаций скрещивания при селекции на гетерозис.

Ключевые слова: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; EST-SSR-маркеры; генетический полиморфизм.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шаптуренко М.Н., Печковская Т.В., Вакула С.И., Якимович А.В., Забара Ю.М., Хотылева Л.В. Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *capitata* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):51-56. DOI 10.18699/VJ16.133

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shapturenko M.N., Pechkovskaya T.V., Vakula S.I., Jakimovich A.V., Zabara Yu.M., Khotyleva L.V. Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):51-56. DOI 10.18699/VJ16.133

ORIGINAL ARTICLE

Received 10.07.2015 г.

Accepted for publication 17.11.2015 г.

© AUTHORS, 2016

✉ e-mail: m.shapturenko@igc.by

## Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

M.N. Shapturenko<sup>1</sup>, T.V. Pechkovskaya<sup>1</sup>, S.I. Vakula<sup>1</sup>, A.V. Jakimovich<sup>2</sup>, Yu.M. Zabara<sup>2</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology of NAS, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Institute of Vegetable Growing, Minsk oblast, Minsk region, Samokhvalovichy, Belarus

*Brassica oleracea* var. *capitata* L. is characterized by a high level of intraspecific heterogeneity due to some biological features that cause difficulties or breeding creating genetically homogenous forms and maintaining their genetic purity. Microsatellites (SSR) are highly polymorphic markers of plant genomes and represent one of the most effective tools for assessing genetic polymorphism. Among microsatellites, EST-SSR are most interesting, because they are directly linked to the expressed sequences and for that reason are widely used for analysis of genetic diversity and population structure. In this work, we studied the effectiveness of the use of transferable EST-SSR markers for both analyzing white cabbage diversity and genotyping pure lines. As a result, 15 microsatellite loci were characterized for the information content, allelic frequencies and heterogeneity levels. The effective multiallelic markers (Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc, BoPC15) with high information content (PIC > 0.7) that could be successfully used for analysis of inter- and intravarietal polymorphism in *B. oleracea* var. *capitata* were identified. It has been shown that intervarietal polymorphism expressed as the allelic diversity of EST-SSR loci greatly facilitates varietal identification and typing of individual plants for breeding purposes. Based on the SSR-evaluation and subsequent clustering, the genetic structure of the breeding collection was identified, which showed that most experimental forms, in spite of different origin, have a common ancestral genetic basis. The identified donors of rare alleles could potentially be a source of valuable genetic segregation for further *B. oleracea* breeding improvement.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; EST-SSR markers; genetic polymorphisms.

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *alba* DC; CC,  $2n = 2x = 18$ ) является одной из наиболее важных овощных культур, благодаря широкой адаптационной способности, высокой урожайности и питательной ценности. Коммерческое производство капусты белокочанной ориентировано на выращивание гибридов F<sub>1</sub>, что позволяет получить максимальный экономический эффект за счет феномена гетерозиса (Fang et al., 2005). Селекция гибридов F<sub>1</sub> базируется на использовании физиологической самонесовместимости и MS (male-sterile) систем и предполагает наличие генетически выровненного (линейного) исходного материала. Тем не менее, ввиду высокой внутривидовой гетерогенности, связанной с биологическими особенностями этой культуры, существует проблема создания генетически однородного материала и поддержания его чистоты (типичности) (Liwang et al., 2007; Ye et al., 2013).

Традиционная оценка селекционных форм, основанная на данных полевого испытания, позволяет отобрать образцы, выровненные по срокам созревания, размеру и форме кочана. Тем не менее генетическая компонента изменчивости, обусловленная гетерозиготностью особей по разным аллелям, как правило, остается за пределами такой оценки. Следовательно, возможности семейственного отбора так же, как и контроль типичности наследуемого в поколениях генетического материала, в значительной мере ограничены.

Доступные к настоящему времени методические подходы к анализу варибельности ДНК способны облегчить создание генетически однородных форм за счет отбора индивидуальных растений с установленным профилем амплифицированных ДНК фрагментов, а также обеспечить подбор дивергентных пар скрещивания перспективной межлинейной комбинации при селекции на гетерозис.

Удобным и технологичным методом ДНК-скрининга является микросателлитный (Simple Sequence Repeat, SSR) анализ, который эффективно используется для картирования, выявления сцепления и закономерностей наследования. Микросателлиты относятся к tandemно повторяющимся последовательностям ДНК, которые широко представлены в геноме растений и животных, включая кодирующие и некодирующие области (Zhang et al., 2004; Senan et al., 2014). У растений SSR-последовательности предпочтительно связаны с нетранслируемыми областями транскрибируемых регионов (Morgante et al., 2002). До недавнего времени микросателлиты рассматривались как «мусор» (т.е. элементы, не несущие существенной генетической информации), возникающий в результате ошибок репликации (Bhargava, Fuentes, 2010). С развитием геномики накоплено достаточно доказательств, подтверждающих генетические и фенотипические эффекты tandemных повторов, которые проявляют различные свойства в геномных областях с разной функциональностью (Katti et al., 2001; Kapil et al., 2014).

Микросателлитные маркеры выявляют большое разнообразие аллелей для отдельного локуса, поскольку события, обуславливающие вариацию в количестве повторов, являются частыми и обратимыми (Kashi, King, 2006). В некоторых случаях отмечается существование более

10 аллелей для одного маркера (Reif et al., 2006). Эта информация может быть полезна, так как обеспечивает эффективный способ отслеживания аллелей в популяции и позволяет дифференцировать генотипы при использовании относительно небольшого числа маркеров.

В настоящем исследовании проведено изучение генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокочанной и оценена эффективность использования микросателлитных (SSR) маркеров для анализа генетического полиморфизма и типирования *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

## Материалы и методы

Объектом исследования служила селекционная коллекция образцов капусты белокочанной, полученных на основе коммерческих сортов различного эколого-географического происхождения: Альфредо (Alf) и Ротонда (Rot) голландской селекции; Арктика (Ark) и Семко юбилейный (Sem) российской селекции; Гранда (Gran), Роксана (Rok), Сулейка (Sul), Увертюра (Uver) и Халиф (Khal) а также линии L251, L264, L407, L573, L574, L575, L576, L577, L578, L580, L583, L661, L728, L783, L860, L962 немецкой селекции; линии Gr, Pl9 белорусской селекции.

ДНК выделяли из этиолированных проростков в трехкратной повторности при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (#K0512, Fermentas) согласно инструкции. Каждая повторность представлена материалом, полученным из 3–9 растений. Препараты ДНК разводили до конечной концентрации 10 нг/мл<sup>-1</sup> в деионизированной воде и хранили при температуре +4 °С.

Для оценки аллельного состава микросателлитных локусов использовали маркеры, разработанные на основе экспрессирующихся последовательностей (Expressed Sequence Tag, EST) (Tonguc, Griffiths, 2004; Louarn et al., 2007) для межвидовой дифференциации представителей рода *Brassica*. Амплификацию проводили на оборудовании «Biometra» (Германия) в стандартном режиме. Рассматривали возможность применимости и эффективности использования (трансферабельности) отобранных маркеров для дифференциации *B. oleracea* var. *capitata* L.

Анализ флюоресцентно меченых SSR-фрагментов выполнен на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением стандарта молекулярного веса S450 (Синтол, Россия). Полученные данные анализировали при помощи пакета прикладных программ GeneMapper 4.1.

Оценку аллельного состава SSR-локусов осуществляли на основе бинарных матриц. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала методом UPGMA выполняли с использованием программы DARwin 5.0 (vers. 1.3b). Генетическую структуру определяли при помощи анализа главных компонент (PCA). Оптимизацию иерархической структуры коллекции проводили путем подсчета ΔK (где K – число групп высшей иерархии) в программе Structure 2.3.4. (Pritchard et al., 2009). Анализ частот SSR-локусов и информационного содержания соответствующих маркеров выполнен при помощи приложения GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012).

## Результаты

### Аллельный состав и генетическая вариация SSR-локусов

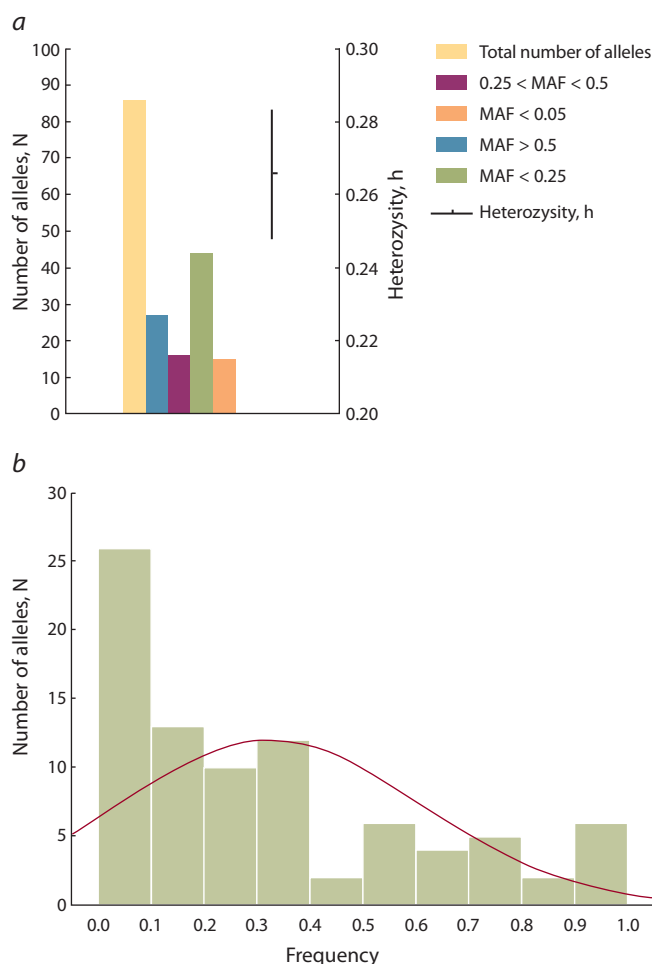
При изучении генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокачанной, представленной 27 образцами различного происхождения, использовали 15 пар микросателлитных маркеров. В результате ДНК-типирования рассмотрено 86 аллелей в 15 SSR-локусах. Уровень наблюдаемого полиморфизма составил 97,9 %. Фактический размер фрагментов варьировал по отношению к теоретически ожидаемому, за небольшим исключением. Количество рассмотренных аллелей на locus достигало 2–11, и в среднем составило 5,7 на один locus. Также отмечено значительное варьирование частот SSR-аллелей (рис. 1, таблица). Наблюдаемые частоты минорных аллелей (MAF – Minor Alleles Frequencies) были сдвинуты к  $MAF < 0,32$  (рис. 1, б).

На долю редких ( $MAF < 0,05$ ) пришлось около 14,9 % от общего числа аллелей, которые были выявлены в локусах: *BoDCTD8* (174 п. н.), *BoIAB15TF* (218, 240, 293 п. н.), *BoIAB20TR* (204 п. н.), *BoTHL1* (140 п. н.), *PLD2* (243, 247, 254 п. н.), *REM1b* (172 п. н.), *BoPLD1* (302 п. н.), *BoAB11* (169 п. н.), *BoCalc* (140 п. н.), *PC15* (159 п. н.). Тогда как наиболее распространенные ( $MAF > 0,5$ ) составили 26,9 %. Размер фрагментов *BoDel9* (262 п. н.), *BoIAB15TF* (302 п. н.), *BoIAB20TR* (197, 314 п. н.), *BoCalc* (242 п. н.), *BoTHL1* (149 п. н.), *BoPLD2* (188 п. н.), *Rem1b* (163 п. н.) соответствовал теоретически ожидаемому. Частоты преобладающих аллелей ( $MAF > 0,5$ ) в значительной степени варьировали между локусами с различным уровнем полиморфизма. Так, например, аллель 1401 п. н. локуса *BoCalc*, выявляющего восемь различных аллельных вариантов, имеет частоту 0,037, тогда как аллель 188 п. н. наименее варибельного локуса *BoPLD2* представлен с частотой 0,98.

Индекс информативности (PIC) анализируемых SSR-локусов ранжировался от 0,193 (для *BoIAB15TF*) до 0,866 (для *BoIAB20TR*) и в среднем достигал 0,64 (таблица). Уровень гетерогенности варьировал от 0,071 до 0,436 и имел среднее значение  $0,276 \pm 0,016$ , подтверждая существование полиморфизма во всех исследуемых SSR-локусах. Наиболее информативными ( $PIC > 0,7$ ) оказались локусы *BoDCTD1*, *BoIAB20TR*, *BoPC34*, *BoCALa*, *BoPLD1*, *BoCALc*, *BoPC15*, которые также характеризовались высокими значениями индекса Шеннона (I) и числа эффективных аллелей (Ne). Уровень информационного содержания PIC находился в тесной зависимости ( $r = 0,77, p < 0,001$ ) от количества выявляемых аллелей (рис. 2). Для локусов, обнаруживающих шесть и более аллелей, значения PIC преимущественно были выше в сравнении с остальными маркерами.

### Генетическая дифференциация коллекции *Brassica oleracea* L.

При изучении генетической гетерогенности капусты белокачанной на основе полиморфизма EST-SSR рассчитаны генетические дистанции (GD) между образцами. Величина GD варьировала от 0,089 (Khal, Rot) до 0,573 (Sul, P19) со средним уровнем 0,333.



**Fig. 1.** Overall frequencies of alleles in the white cabbage collection: a, quantitative characterization; b, frequency distribution.

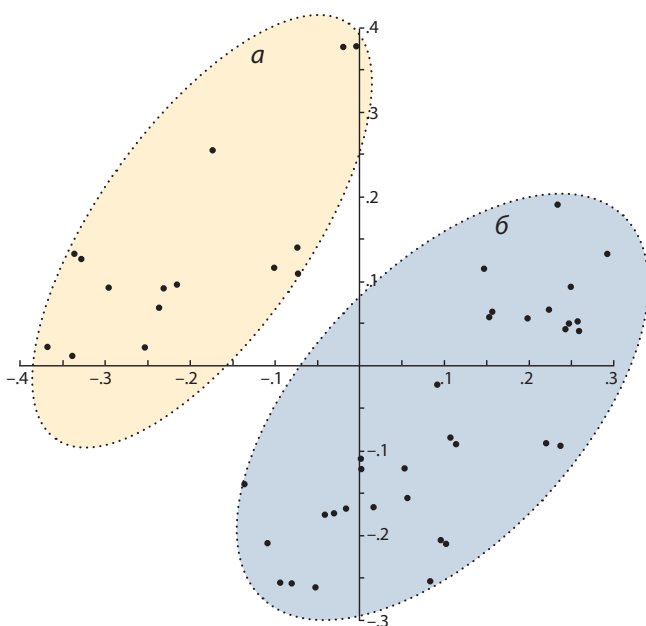
Исследование генетической структуры коллекции *B. oleracea* var. *capitata* L. на основе алгоритма STRUCTURE позволило предположить, что наиболее правильной с точки зрения логарифмической функции правдоподобия будет дифференциация при  $K = 2$ . Анализ главных компонент (PCA), основанный на подсчете частот SSR-аллелей, подтвердил дифференциацию экспериментальных форм на две группы подобия (рис. 2). В результате при вычленении основных влияющих факторов в различные координатные плоскости соотнесены группы образцов: (а) L576, L407, L577, L578, L264, L573, L860, L575, L574, L728, L783, L962, L583, L661, Alf, Rok, L580, Gran, P19 и (б) Khal, Rot, Sul, Ark, Gr, Uver, L251, Sem.

Установленные в ходе PCA-анализа группы соответствуют двум основным субкластерам классификационного дерева, построенного на основе алгоритма Nei для выявления топологической дифференциации и внутрисортного полиморфизма методом UPGMA (рис. 3). Максимальная величина межкластерных дистанций GD достигает 0,573. Согласно иерархической дифференциации, в I субкластер выделены две группы генетической общности: (а) L661, Gran, P19, Rok, Alf, L573, L580, L783,

Characterization of SSR markers

Acc. no. in GenBank/NCBI	Marker name	Gene source	Repeated motif	Annealing temperature, °C	Number of alleles	Allele size, bp	I	h	PIC
AF180355	BoABI1	isolate B265 ABI1 protein (ABI1) gene	(tc) <sub>16</sub>	59.5	4	160–173	0.353	0.214	0.554
CC956699	BoLAB20TR	genomic clone BolAB20	(cac) <sub>9</sub>	56.0	11	161–338	0.500	0.332	0.866
CC969507	BoLAB15TF	genomic clone BolAB15	(ct) <sub>5</sub>	56.0	4	218–302	0.158	0.071	0.193
U67451	BoAP1	homeotic protein boi1AP1 (Boi1AP1) mRNA	(at) <sub>9,1</sub>	59.5	3	140–156	0.554	0.375	0.554
AF241115	BoCALa	isolate HRI/CGN 5688 cauliflwer gene	(at) <sub>5</sub> (ta) <sub>6</sub>	59.5	9	204–234	0.404	0.252	0.803
AF241115	BoCALb	isolate HRI/CGN 5688 cauliflwer gene	(ta) <sub>6,1</sub>	59.5	5	188–242	0.424	0.264	0.614
AF241115	BoCALc	isolate HRI/CGN 5688 cauliflwer gene	(taa) <sub>3,1</sub> (at) <sub>7,1</sub> (at) <sub>3</sub>	59.5	8	135–270	0.434	0.282	0.785
AF23069	BoDEL9	stearoyl-ACP desaturase (DELTA9-BO-1) gene	(ctt) <sub>3</sub> (ct) <sub>6</sub> (cttg) <sub>6</sub>	59.5	2	252–262	0.337	0.221	0.355
AF458409	BoDCTD1	deoxycytidine deaminase (DCTD1), mRNA	(aga) <sub>6</sub>	58.0	8	141–174	0.445	0.284	0.782
AF113918	BoPLD1	phospholipase D1 (PLD1) gene	(ct) <sub>7</sub> (at) <sub>7,1</sub>	56.0	7	258–302	0.436	0.275	0.748
AF113919	BoPLD2	phospholipase D2 (PLD2) gene	(at) <sub>6</sub> (gt) <sub>5</sub>	56.0	6	160–254	0.284	0.177	0.601
X92955	BoPC15	mRNA for pollen coat protein	(tttta) <sub>2</sub> (ata) <sub>7</sub>	56.0	6	161–184	0.495	0.329	0.784
X94979	BoPC34	mRNA for pollen coat protein (clone bopc34)	(atg) <sub>5</sub>	59.5	4	127–136	0.501	0.349	0.714
AF051772	BoREM1b	reproductive meristem gene 1 (REM1) mRNA	(gaa) <sub>5</sub>	58.0	5	153–172	0.424	0.267	0.633
AF273844	BoTHL1	thioredoxin-h-like protein 1 (THL1) mRNA	(ctt) <sub>7</sub>	56.0	4	140–149	0.349	0.214	0.520

Designations: I, Shannon's biodiversity index; h, heterozygosity index; PIC, polymorphic information content.



**Fig. 2.** Principal component analysis of white cabbage structure based on SSR evaluation. a and b, groups of distribution.

L583, L962; (б) L264, L574, L728, L575, L407, L578, L577, L576, L860. Здесь величина генетических дистанций (GD) варьирует от 0,137 до 0,444, в зависимости от топологии ветвления.

Восемь образцов (Khal, Rot, Sul, Ark, Gr, Uver, L251, Sem) с величиной межкластерных расстояний 0,102–0,346

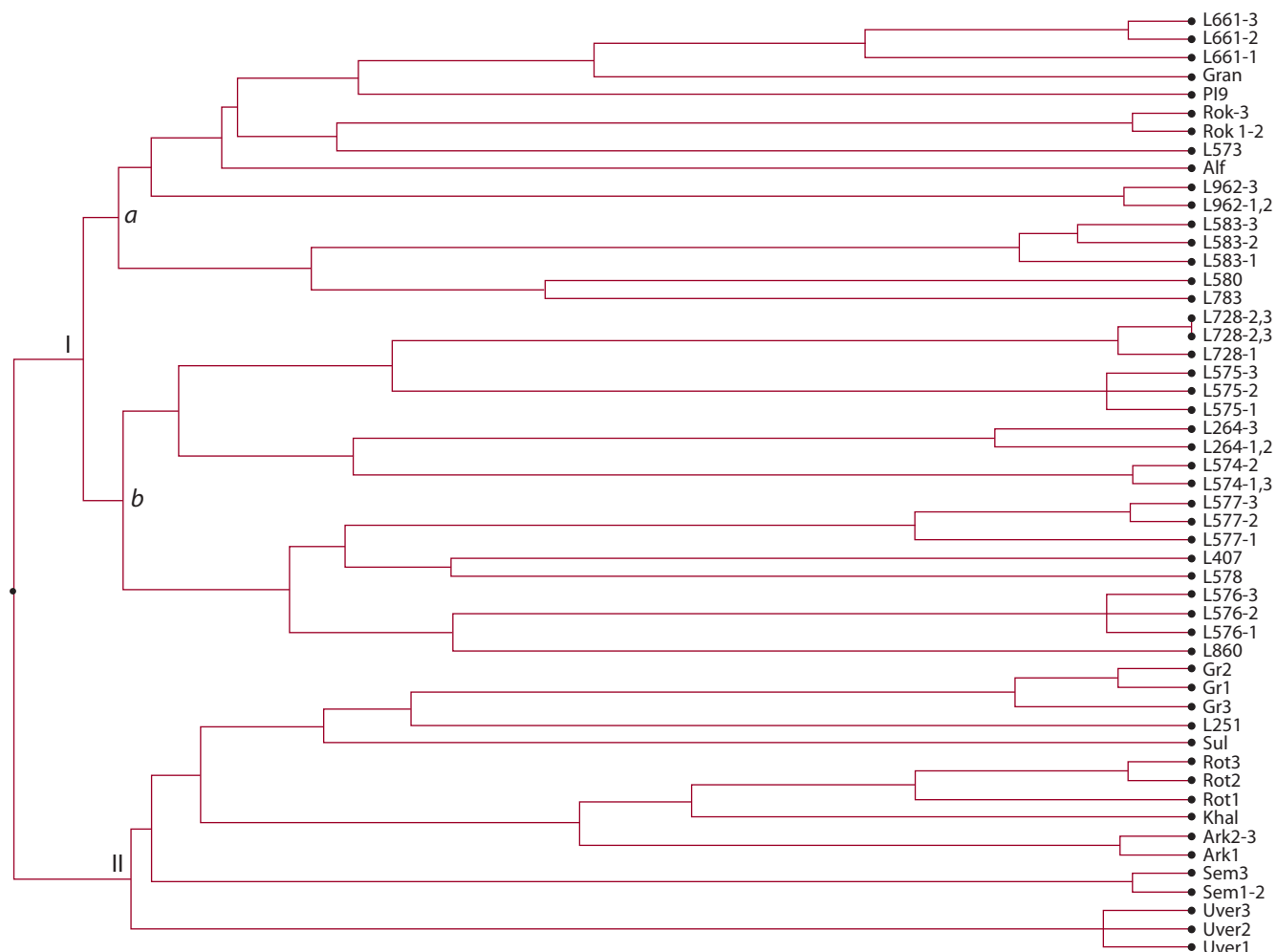
образуют II субкластер. Наибольшая генетическая общность характеризует Khal и Rot. Образцы Uver и Sem топологически выделены отдельными ветвями, что обусловлено наличием у них уникальных сочетаний SSR-аллелей.

**Обсуждение**

Идентификация и характеристика различных генетических ресурсов имеют большое значение для отбора и типирования селекционных форм. Одним из наиболее эффективных инструментов оценки генетического полиморфизма являются микросателлиты, которые относятся к высокополиморфным маркерам растительных геномов. Среди них особый интерес представляют EST-SSR, которые непосредственно связаны с экспрессирующимися областями и широко используются для анализа генетического разнообразия и структуры популяций. Тем не менее многие исследования показали, что EST-SSR менее вариабельны, чем микросателлиты в некодирующих регионах (Cho et al., 2000; Eujay et al., 2002). В этом исследовании мы использовали 15 пар EST-SSR для изучения разнообразия и генетической дифференциации селекционной коллекции капусты белокочанной. Все оцененные локусы характеризовались высокой информативностью: 13 из 15 маркеров имели уровень PIC > 0,5, что позволило установить специфичные SSR-профили для каждого из исследуемых образцов. Полученные данные согласуются с результатами S. Louagn с коллегами (2007), которые использовали 11 пар «трансфербельных» SSR со сходным уровнем PIC для сортовой идентификации *B. oleracea*.

По результатам изучения аллельного состава SSR-локусов коллекции капусты белокочанной наиболее информативными оказались маркеры Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34,





**Fig. 3.** Topological differentiation of the white cabbage collection by UPGMA.  
a, b, groups of genetic similarity; I, II, subclusters.

BoPLD1, BoCalc, BoPC15, которые позволяют проводить как межсортовую, так и межлинейную дифференциацию *B. oleracea* var. *capitata*, включая типирование индивидуальных растений.

Высокое разнообразие экспериментальных форм свидетельствует о широкой генетической основе селекционной коллекции, которая преимущественно представлена образцами, полученными на основе сортов зарубежной селекции различного эколого-географического происхождения (Россия, Германия, Голландия). Межсортовой полиморфизм, выраженный в аллельном разнообразии изученных SSR-локусов, в значительной мере облегчает сортовую идентификацию и типирование индивидуальных растений при селекции.

Таким образом, наши результаты подтверждают, что EST-SSR могут успешно использоваться не только для оценки внутривидового разнообразия *B. oleracea*, но также для анализа меж- и внутрисортовой гетерогенности.

При изучении внутрисортового полиморфизма показано, что наиболее выровненными по аллельному составу SSR-локусов являются Gran, P19, Alf, L580, L783, L407, L578, L860, L573, L251 и Khal. Остальные образцы выявляют гетерогенность, которая, вероятно, связана с

высоким полиморфизмом исходных форм, вследствие чего для получения генетически выровненного поколения целесообразно провести семейственный отбор.

В результате исследования определены доноры редких аллелей: линии Gr, Alf, P19, Rot, Rok, L583, L578, L577, L573, L407, которые необходимо сохранять для поддержания разнообразия базовой коллекции, а также включать в гибридизацию с целью выделения ценных генетических сегрегаций.

Сгруппированные в I и II субкластеры образцы (рис. 3), несмотря на различное происхождение, с высокой вероятностью имеют общую предковую генетическую основу. Это может быть связано с использованием на ранних этапах селекции европейского региона ограниченного числа выдающихся генотипов. А. Belaj с коллегами (2003) в своих исследованиях отмечали, что в селекционных программах различных центров используются генетически идентичные элитные линии, но под разными названиями, что объясняет близкое родство сортов различного происхождения (Belaj et al., 2003).

Информация о топологической дифференциации коллекции капусты белокочанной, полученная в результате кластерного анализа, является основой для селекционного

отбора генетически выровненного материала, а также дивергентных комбинаций скрещивания при селекции на гетерозис.

## Acknowledgments

This study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, project B15-151.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Belaj A., Satovich Z., Ismaili H., Panajoti D., Rallo L., Trujillo I. RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. *Euphytica*. 2003;130:387-395. DOI 10.1023/A:1023042014081
- Bhargava A., Fuentes F.F. Mutational dynamics of microsatellites. *Mol. Biotechnol.* 2010;44(3):250-266. DOI 10.1007/s12033-009-9230-4
- Cho Y.G., Ishii T., Temnykh S., Chen X. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2000;100:713-722. DOI 10.1007/s001220051343
- Eujay I., Sorrells M.E., Baum M., Wolters P., Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;104:399-407. DOI 10.1007/s001220100738
- Fang Zh., Liu Y., Lou P., Liu G. Current trends in cabbage breeding. *J. New Seeds*. 2005;6(2/3):75-107. DOI 10.1300/J153v06n02\_05
- Kapil A., Rai P.K., Shanker A. ChloroSSRdb: a repository of perfect and imperfect chloroplastic simple sequence repeats (cpSSRs) of green plants. Database. Online J. of Biological Databases and Curation. 2014. DOI 10.1093/database/bau107
- Kashi Y., King D.G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet.* 2006;22:253-259. DOI http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.00
- Katti M.V., Ranjekar P.K., Gupta V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2001;18:1161-1167. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003903
- Liu L., Liu G., Gong Y. Evaluation of genetic purity of F<sub>1</sub> hybrid seeds in cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR markers. *Hortscience*. 2007;42(3):724-727. (<http://hortsci.ashspublishings.org/content/42/3/724.full>)
- Louarn S., Torp A.M., Holme I.B., Andersen S.B., Jensen B.D. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* L. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2007;54:1717-1725. DOI 10.1007/s10722-006-9181-6
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 2002;30:194-200. DOI 10.1038/ng822
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012;28:2537-2539.
- Pritchard M., Wen W., Falush D. Documentation for Structure Software: Version 2.3. Department of Human Genetic, Department of Statistics. University of Chicago USA, 2009. DOI <http://pritchardlab.stanford.edu/home.html>
- Reif J.C., Warburton M.L., Xia X.C., Hoisington D.A., Crossa J., Taba S., Muminovic J., Bohn M., Frisch M., Melchinger A.E. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:177-185. DOI 10.1007/s00122-006-0283-5
- Senan S., Kizhakayil D., Sasicumar B., Sheeja Th. Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Not. Sci. Biol.* 2014;6(1):1-13. (<http://notulaeobiologicae.ro/index.php/nsb/article/viewFile/9199/7883>)
- Tonguc M., Griffiths Ph.D. Genetic relationships of Brassica vegetables determined using database derived simple sequence repeats. *Euphytica*. 2004;137:193-201. DOI 10.1023/B:EUPH.0000041577.84388.43
- Ye Sh., Wang Y., Huang D., Li J., Gong Y., Xu L., Liu L. Genetic purity testing of F<sub>1</sub> hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Sci. Hortic.* 2013;155:92-96. DOI 10.1016/j.scienta.2013.03.016
- Zhang L., Yuan D., Yu Sh., Li Zh., Cao Y., Miao Zh., Qian H., Tang K. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*. 2004;20(7):1081-1086. DOI 10.1093/bioinformatics/bth043