

## АНАЛИЗ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ВИДА *BRASSICA OLERACEA* L. (КАПУСТА ОГОРОДНАЯ)

А.М. Артемьева<sup>1</sup>, Э. Клоке<sup>2</sup>, Ю.В. Чесноков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНУ ГНЦ РФ ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия, e-mail: akme11@yandex.ru; yu.chesnokov@vir.nw.ru;

<sup>2</sup> Институт садовых и овощных культур, Кведлинбург, Германия, e-mail: E.Klocke@BAFZ.de

Для выявления генетического разнообразия и анализа филогенетических связей некоторых диких видов рода *Brassica* L. с неясным таксономическим положением и разновидностей вида *Brassica oleracea* L. (капуста огородная) были использованы RAPD- и SSR-маркеры. Оценены 53 образца различного коллекционного статуса: дикие виды рода, местные формы, староместные и современные селекционные сорта представителей рода *Brassica* из коллекции ВНИИ растениеводства. Использовали 19 праймеров серии ОРА для RAPD анализа и 10 пар праймеров, синтезированных также Oregon Technologies, для анализа микросателлитов. Найдены специфичные дескрипторы для В- и С-геномов. С использованием генетических дистанций по М. Nei и W. Li (1979) и R. Sokal и С. Michener (1958) построены дендрограммы, отражающие взаимосвязи между образцами различного таксономического уровня. Установлен высокий уровень полиморфизма видов рода *Brassica* и разновидностей капусты.

**Ключевые слова:** *Brassica oleracea* L., RAPD, SSR, молекулярные маркеры, филогения.

### Введение

Род *Brassica* включает экономически важные овощные, масличные, кормовые культуры и является одним из важных объектов генетических исследований в мире.

Происхождение, эволюция и филогенетические отношения 6 представителей рода *Brassica*, входящих в треугольник N.U (треугольник *Brassica*): *B. nigra* (L.) Koch. (BB,  $2n = 2x=16$ ), *B. oleracea* (CC,  $2n = 2x=18$ ), *B. rapa* (AA,  $2n = 2x=20$ ), *B. napus* L. (AACC,  $2n = 4x=38$ ), *B. juncea* (L.) Czern. (AABB,  $2n = 4x=36$ ), *B. carinata* A. Braun (BBCC,  $2n = 4x=34$ ), в целом определены. N.U (1935) предложил графическое изображение филогенетических взаимоотношений между этими видами, при которых аллотетраплоидные виды образуют стороны треугольника и расположены между слагающими их диплоидными видами, образующими вершины треугольника.

Однако систематическое положение отдельных видов рода, а также внутривидовых таксонов, в том числе капусты огородной *B. oleracea*,

является предметом дискуссии (Gomez-Campo, 1999; Specht, Diederichsen, 2001; Gladis, Hammer, 2003). Так, крупнейший современный систематик *Brassicaceae* L. С. Gomez-Campo (1999) включил в секцию *Brassica* капусту огородную *B. oleracea*, абиссинскую капусту *B. carinata*, а также родственные капусте огородной средиземноморские виды ( $n = 9$ , геном С), из которых предполагается интрогрессия генов в вид *B. oleracea*. Это виды *B. cretica* Lam., *B. incana* Ten, *B. rupestris* Rafin, *B. macrocarpa* Guss., *B. montana* Pourret, *B. villosa* Raimondo and Mazzola, *B. insularis* Moris., *B. hilarionis* Post., *B. botteri* Vis. В то же время Т. Gladis и К. Hammer (2003) включают их в вид *B. oleracea* в ранге подвидов. Существует неясность в положении близких таксонов, ранее описанных как виды, *B. alboglabra* Bailey и эндемика Крыма *B. taurica* Tzvel. В настоящее время исследователи чаще включают *B. alboglabra* в вид *B. oleracea*, а *B. taurica* в вид *B. incana* в ранге разновидностей (Snogerup, 1980; Specht, Diederichsen, 2001).

Что касается систематического положения внутривидовых таксонов вида *B. oleracea*, то

современные систематики соглашаются, что невозможно придать широковариабельным, возникшим за короткое в историческом отношении время в результате доместики культуры ранг подвидов и предлагают остановиться на понятиях «разновидность» и «группа разновидностей», однако различным образом формируют эти группы (Gomez-Campo, 1999; Gladis, Hammer, 2003). Гипотетичны центры происхождения различных типов культурных капуст, пути их распространения, эволюционная схема развития отдельных капустных культур и близких типов внутри каждой культуры. Так, предполагается, что культурные листовые капусты *B. oleracea* convar. *acephala* и convar. *fruticosa* произошли в Западном Средиземноморье непосредственно от дикой *B. oleracea* ssp. *oleracea* (syn. *B. oleracea* var. *sylvestris* L.), и convar. *acephala* дала начало португальской полукочанной капусте (Тронхуда) var. *costata* (Dias, Monteiro, 1994), от которой произошла собственно кочанная капуста *B. oleracea* convar. *capitata*. В то же время предковая форма различных типов листовых капуст является спорной: I. Divaret и G. Thomas (1998) выделяют в качестве таковой мозговую капусту *B. oleracea* convar. *acephala* var. *medullosa*, а К.М. Song с коллегами (1988) – древовидную *B. oleracea* convar. *acephala* var. *viridis*, в то время как тысячеголовая *B. oleracea* convar. *fruticosa* var. *ramosa* всеми выделяется в отдельную группу. S. Snogerup (1980) и I. Divaret и G. Thomas (1998) считают, что цветная капуста *B. oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis* и брокколи *B. oleracea* convar. *botrytis* var. *italica* представляют другую линию эволюции и в отличие от остальных капуст возникли в Восточном Средиземноморье, в то время как по мнению Т.В. Лизгуновой (1984) они сформировались в культуре непосредственно от *B. cretica* или при ее гибридизации с *B. oleracea*. Автор использовала морфолого-географический метод и разработала эколого-географическую классификацию капусты, хотя считала культурные разновидности отдельными видами, входящими в сложный комплекс *Brassica* aggr. *oleracea*.

Для маркирования геномов растений, выявления филогенетических связей на межвидовом и межпопуляционном уровнях и уточнения таксономического статуса отдельных видов

и родов широко используются методы молекулярно-биологического анализа геномов, которые отражают уникальный для каждого индивидуума полиморфизм нуклеотидных последовательностей – RFLP, RAPD, SSR, AFLP и др. Исследования семейства Brassicaceae с использованием молекулярно-генетических маркеров были осуществлены рядом авторов (обзоры: Snowdon, Friedt, 2004; Анискина и др., 2005; Warwick, Sauder, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Показано, что триба Brassiceae происходит от гексаплоидного предка с геномом, подобным геному *Arabidopsis thaliana*. Дивергенция Arabideae и Brassiceae произошла примерно 13–17 млн лет назад ((Lysak *et al.*, 2007). Выделены две эволюционные ветви рода *Brassica*: *B. nigra* (В геном) и *B. rapa* (А)/ *B. oleracea* (С), которые генетически обособились 7,9 млн лет назад (Warwick *et al.*, 2005). Геном А произошел от уже сформированного генома С 3,3–4 млн лет назад. У *B. oleracea* в отличие от родственных диких видов выявлен только один гаплотип, что не подтверждает многочисленных событий доместики (Allender *et al.*, 2007). Некоторые авторы считают, что молекулярная систематика лучше отражает филогенетическое положение членов рода, чем классическая морфологическая (Murren *et al.*, 2002; Negi, Sabharwal, 2004). Основываясь на ранее опубликованных молекулярных исследованиях, I. Al-Shehbaz с соавт. (2006) предложили объединение нескольких родов трибы Brassiceae (*Sinapis*, *Diplotaxis*, *Erucastrum* и *Hirshfeldia*) с *Brassica*. Однако С.Д. Bailey с соавт. (2006) считают, что для убедительного обоснования серьезных изменений сложившейся таксономии необходимо накопление молекулярных данных, характеризующих как можно большую часть генома, в сочетании с традиционным анализом морфологических признаков.

В то же время в работах ряда авторов не найдено четких различий между разновидностями *B. oleracea* по результатам RAPD- и SSR-анализов, хотя отмечена тенденция к группировке образцов на дендрограммах в соответствии с ботаническими разновидностями (Divaret, Thomas, 1998; Tonguç, Griffiths, 2004; Louarn, 2007).

В настоящей работе поставлены следующие задачи: 1) оценить возможности RAPD и SSR

различать виды, группы разновидностей, разновидности в роде *Brassica*; 2) прояснить вопрос о совпадении систематического положения образцов, выявляемого методами маркирования ДНК, и морфолого-географической классификацией капусты *B. oleracea* L.

### Материал и методы

**Растительный материал.** Материал включал 53 образца, в том числе 6 образцов местных форм, 25 староместных и 17 современных сортов 6 основных культивируемых видов *Brassica* (геномы А, В, С, АВ, АС, ВС), 4 образца дикорастущих видов рода *Brassica*, а также синтетическую форму *B. composita* ( $n = 27$ , геном АВС) (табл. 1). Вид *B. oleracea* представлен в исследованиях 37 образцами белокочанной, краснокочанной, португальской, савойской, листовой, брюссельской, цветной капусты и кольраби. Дикий вид *B. souliei* ( $n = 11$ , геном S) был взят как отдельная группа. Ботанические названия даны по С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001).

**Выделение ДНК.** ДНК была экстрагирована из молодых листьев и апексов по методике Д.Б. Дорохова и Э. Клоке (1997). С учетом того, что используемые образцы представляют собой сорта-популяции, была составлена выборка, объединяющая ДНК, полученную из 18 индивидуальных растений каждого образца, в равных количествах.

**Амплификация ДНК при RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) анализе.** Для амплификации ДНК с использованием ПЦР анализа были протестированы 20 десятимерных олигонуклеотидных праймеров набора А Oregon Technologies (Аламеда, Калифорния, США) (ОРА 1 – ОРА 20) и 19 из них использованы для RAPD-анализа. Из отобранного набора только праймер ОРА 6 не давал различимых полос-ампликонов на электрофореграмме.

ПЦР проводилась в объеме 12,5  $\mu$ л, включая 1  $\times$  инкубационный буфер, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ М каждого dNTP, 1 pmol/ $\mu$ л праймера, 0,25 единиц *Taq* ДНК-полимеразы (Qbiogene, Германия) и 20 ng геномной ДНК. Для амплификации использовали амплификатор Perkin Elmer (Applied Biosystems, США), запрограммированный на 45 циклов: денатурация при 94 °С 3 мин, отжиг праймера при 36 °С 1 мин, расширение при

72 °С 2 мин и при 94 °С 0,3 мин – 45 циклов и конечное расширение при 72 °С в течение 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2 %-м агарозном геле в 0,5  $\times$  TBE буфере, визуализировали окрашиванием в этидиум-бромиде и документировали.

**Амплификация ДНК при SSR (Simple Sequence Repeats) анализе.** Для амплификации ДНК были использованы 10 олигонуклеотидных пар праймеров, синтезированных Oregon Technologies и протестированных в исследованиях вида *B. oleracea*. Праймеры описаны в табл. 2 (Szewc-McFadden *et al.*, 1996; Uzunova, Ecke, 1999; Lowe *et al.*, 2002).

ПЦР проведена в смеси объемом 12,5  $\mu$ л, включающей 1  $\times$  инкубационный буфер, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ М каждого dNTP, по 1 pmol/ $\mu$ л каждого праймера, 1,0 единиц HOT Prime ДНК-полимеразы (Qbiogene, Германия) и 20 ng геномной ДНК. Амплификация осуществлена в ДНК амплификаторе (BioRad, Германия), запрограммированном на 45 циклов: цикл 1 – первичная денатурация при 95 °С 15 мин, цикл 2 – при 94 °С 2 мин, цикл 3 – при 94 °С 1 мин, отжиг праймеров при 65 °С 30 сек. Температуру понижали на 1 °С каждые 2 цикла до достижения финальной температуры отжига 55 °С. Расширение проводили при 72 °С 45 сек (20 циклов). Цикл 4 – при 94 °С 1 мин, отжиг при 55 °С 30 сек, расширение при 72 °С 45 сек (20 циклов). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле в 0,5  $\times$  TBE буфере, визуализировали окрашиванием в этидиум-бромиде и документировали.

**Обработка экспериментальных данных.** RAPD-полосы на электрофореграмме определены в качестве доминантных маркеров и описаны при построении бинарной матрицы как (1) при присутствии и (0) при отсутствии с использованием программы Gene Profiler 4.05 Windows, Genotyping and DNA Fragment Analysis software (Scanalytics Inc., США). Использованы четко различающиеся полосы размером от 200 до 2800 пн. При оценке данных SSR-анализа использованы фрагменты размером от 50 до 350 пн, которые были рассмотрены как кодоминантные маркеры.

Коэффициенты (индексы) подобия при оценке результатов RAPD рассчитаны с использованием генетической дистанции по М. Nei

Таблица 1

Состав проанализированных образцов видов рода *Brassica* L.

Вид	Подвид/группа разновидностей/ разновидность	№ кат. ВИР	Название	Происхождение	№ на дендрограмме
<i>B. oleracea</i> L. (геном С) – капуста огородная	convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> – белокочанная	1395	Марнополско	Болгария	097
		1428	Каширка 202	Россия	009
		1837	Ликуришка 498/15	Россия	011
		2027	Грузинская	Грузия	106
		2070	Ладожская ДС	Россия	005
	convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>rubra</i> – краснокочанная	111	Kissendrup	Дания	014
		121	Каменная головка	Россия	016
		187	Orig. Langedijker Frührot	Нидерланды	017
		189	Turnovske	Чехия	018
	convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>sabauda</i> L. – савойская	232	Вертю 1340	Россия	019
		271	Hammer krauser dunkelgruner	Германия	020
		294	Wiener gruner niedriger früher krauser	Германия	021
		303	Среднелетняя	Германия	022
		306	Butterkopf	Нидерланды	023
	convar. <i>acephala</i> (DC.) Alef. var. <i>gongyloides</i> L. – кольраби	9	Blanc hatif	Франция	
10		Violet hatif	Франция	025	
121		Исполинский синий	Нидерланды	026	
258		Местная	Грузия	028	
285		Dreienbrunner	Австрия	027	
convar. <i>fruticosa</i> (Metzg.) Alef. var. <i>ramosa</i> DC. – листовая тысячеголовая	84	Chou branchu du Poitou	Франция	032	
convar. <i>acephala</i> (DC.) Alef. var. <i>viridis</i> L. – листовая древовидная	83	Chou cavalier	Франция	031	
convar. <i>acephala</i> (DC.) Alef. var. <i>medullosa</i> Thell. – листовая мозговая	203	Green marrow stem kale	Великобритания	033	
convar. <i>acephala</i> (DC.) Alef. var. <i>sabellica</i> L. – листовая курчаволистная	262	Dwarf green curled	Нидерланды	034	
	268	Winter hoher gruner extra krauser	Германия	035	
	302	Tall Scotch Curled	Канада	037	
convar. <i>gemmifera</i> (DC.) Gladis var. <i>gemmifera</i> DC. – брюссельская	111	Amager	Германия	029	
	149	Rosella	Германия	030	
convar. <i>botrytis</i> (L.) Alef. var. <i>botrytis</i> L. – цветная	531	Московская консервная	Россия	039	
	580	Precocissimo Gigante di Napoli	Италия	038	
	663	МОВИР-74	Россия	040	
	679	Адлерская зимняя	Россия	044	

## Окончание таблицы 1

Вид	Подвид/группа разновидностей/ разновидность	№ кат. ВИР	Название	Происхождение	№ на дендрограмме
		681	Гарантия	Россия	041
		754	Avans Osena	Дания	043
		762	Mishmar Ha'emek	Израиль	042
		1011	Адлерская весенняя	Россия	045
	convar. <i>costata</i> (DC.) Gladis – португальская	297	Tronchuda	Дания	012
		2570	Tronchuda Portuguesa	Португалия	013
<i>B. alboglabra</i> Bailey (геном С)	syn. convar. <i>botrytis</i> (L.) Alef. var. <i>alboglabra</i> (Bail.) Sun – китайская листовая капуста	232 вр. 567		Япония Лаос	046 047
<i>B. taurica</i> Tzvel. (геном С)	капуста крымская	353		Украина	119
<i>B. incana</i> Ten. (геном С)		вр. 2		Италия	122
<i>B. rapa</i> L. (геном А) – репа	ssp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt – капуста пекинская	111	Nozaki early	Япония	041
<i>B. napus</i> L. (геном АС) – рапс	ssp. <i>oleifera</i> Metzg. f. <i>annua</i> Thell. – однолетний	5208	Westar	Канада	140
			Lisora	Германия	141
			Викинг	Россия	125
	ssp. <i>oleifera</i> Metzg. f. <i>biennis</i> Thell. – двулетний	4351	Местный	Новая Зеландия	126
	ssp. <i>napobrassica</i> (L.) Hanelt – брюква	737	Местная	Россия	143
<i>B. nigra</i> (L.) Koch (геном В) – горчица черная	ssp. <i>nigra</i>	2633	Местная	Россия	127
<i>B. carinata</i> A. Braun (геном ВС) – капуста абиссинская		10	Местная	Эфиопия	130
<i>B. juncea</i> (L.) Czern. (геном АВ) – горчица сарептская	ssp. <i>tsaisai</i> Mao	274	542 Shinkoku	Япония	144
<i>B. composita</i> (геном АВС)		4		Россия	120
<i>B. fruticulosa</i> Cug. (геном F) – средиземноморская капуста		вр. 1		Италия	121
<i>B. souliei</i> (Batt) Batt (геном S)		вр. 662		Ирак	124

Таблица 2

## Список пар праймеров для SSR-анализа

SSR	5'Праймер	Повторяющийся мотив	3'Праймер
B.n.12A	GCCGTTCTAGGGTTTGTGGGA	(GA) <sub>11</sub> (AAG) <sub>4</sub>	GAGGAAGTGAGAGCGGGAAATCA
B.n.19A	CACAGCTCACACCAAAACAACCTAC	(GA) <sub>8</sub>	CCCCGGGTTCGAAATCG
B.n.25C2	AAACCTCCTCAAAAACCCCTAAACG	(GA) <sub>10</sub>	TCCCCTCTTTCCTCTCTCTAGGC
B.n.26A	TAAACTTGTGACGACGCCGTTATC	(GA) <sub>13</sub>	CCCGTAAATCAAGCAAATGG
B.n.38A	TGGTAACTGGTAACCGACGAAAATC	(TG) <sub>11</sub>	ACGCTGTCTTCAGGTCCCACTC
B.n.40C1	CCCCTCTTTGATTCTCCTCCGA	(GA) <sub>10</sub>	CGTGGTATGTTGGTATTGGGTCGT
Ni2-F02	F-TGCAACGAAAAAGGATCAGC	(CT) <sub>29</sub>	R-TGCTAATTGAGCAATAGTGATTCC
0109-A06	F-TGTGTGAAAGCTTGAACAG	(GA) <sub>15</sub>	R-TAGGTATTTTTTGTTCACCG
0109-A03	F-CTGGTTTTCTCCTTCATCAG	(GA) <sub>40</sub>	R-CTGTGTAGCTTTTAGTCTTT
pMR 183	GAAATCATTCATGCTCTGA	(TG) <sub>11</sub>	GTAAAAATCCCAATCAATGG

и W. Li (1979), результатов SSR – по R. Sokal, C. Michener, (1958). Кластерный анализ выполнен методом UPGMA с использованием программы TREECON для Windows, включая bootstrap-анализ (версия 1.36).

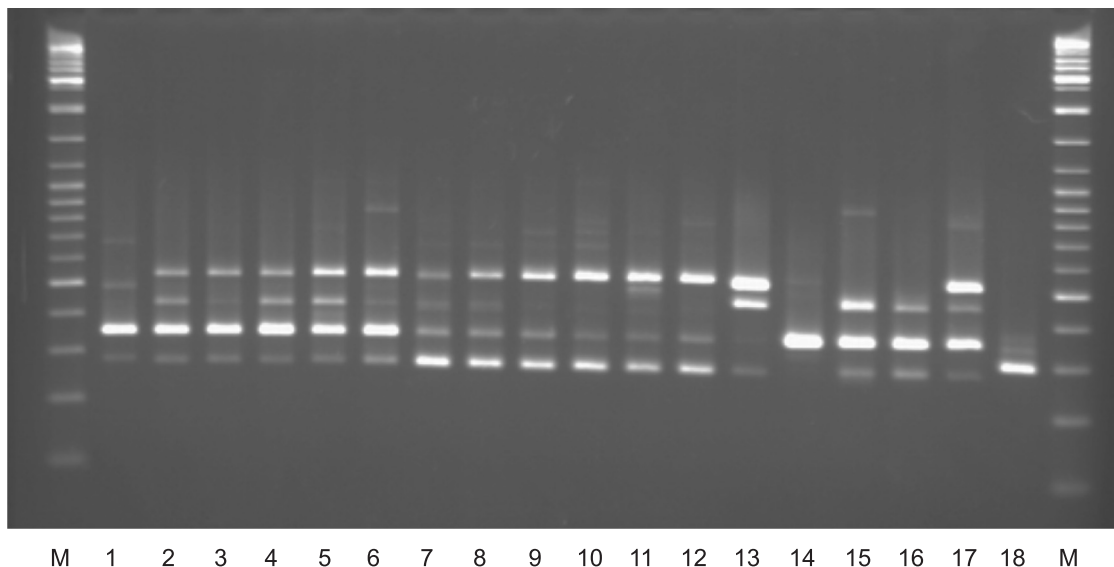
## Результаты

**Взаимоотношения видов внутри рода *Brassica*.** Проведенное изучение образцов видов рода *Brassica* методами RAPD- и SSR-анализа показало ожидаемый высокий уровень полиморфизма внутри рода: наблюдали 379 RAPD- и 110 SSR-полиморфных фрагментов. Все пары праймеров при SSR и 19 праймеров при RAPD позволили идентифицировать анализируемые образцы. Кроме того, были найдены специфичные дескрипторы для В- и С-геномов. Так, при RAPD-анализе праймер ОРА 09 генерировал дескриптор для генома С размером 550 пн (рис. 1), праймер ОРА 03 – 750 пн, ОРА 16 – 1000 пн. Пара праймеров Ni2-F02 при SSR-анализе продуцировала хорошо различимые специфичные маркеры для В-генома размером 216–218 пн (рис. 2).

На рис. 3 представлены дендрограммы, построенные для образцов всех проанализированных видов рода *Brassica* по результатам RAPD- и SSR-анализа. Сравнение дендрограмм показывает, что оба метода оценки генетического полиморфизма коррелируют друг с другом. Образец дикого вида *B. fruticulosa* (геном F, ранее геном

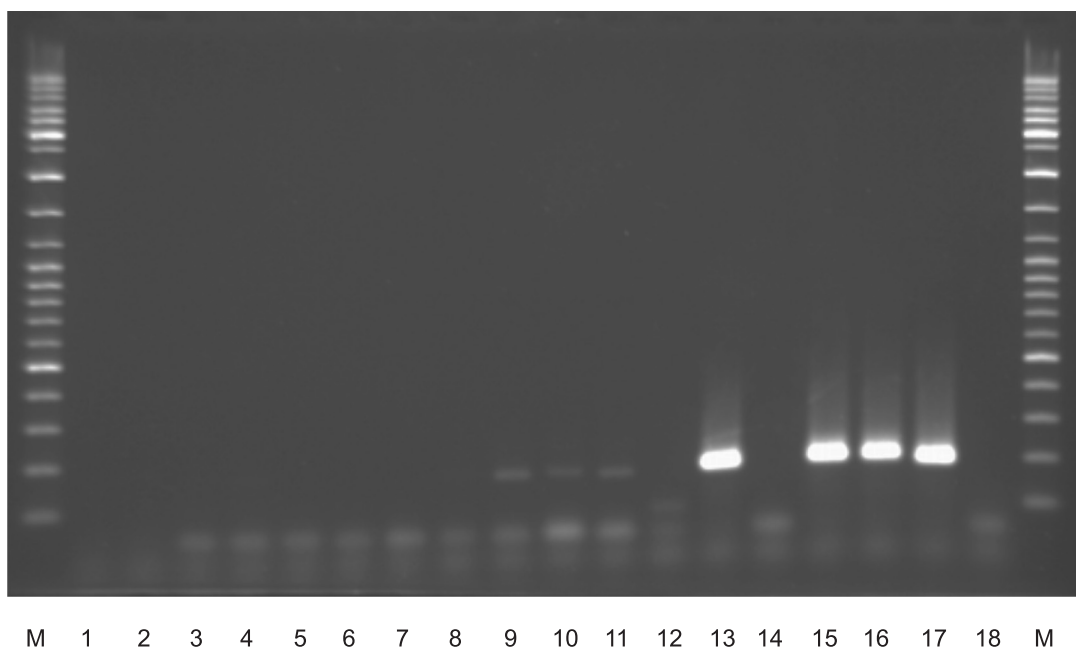
описан как В') примыкает на ден-дрограммах к В-геномным видам *B. nigra* (В) и *B. juncea* (АВ), но отстоит от них (генетическое расстояние между этими видами при RAPD 0,2). Образцы видов *B. carinata* (BC) и *B. composita* (ABC), имеет цитоплазму *B. carinata* кластеризованы рядом друг с другом. Существенные различия при RAPD и SSR касались позиции образца вида *B. souliei* ( $n = 11$ ): при RAPD он действительно занимает обособленное положение с самым высоким генетическим расстоянием 0,78, а при SSR он входит в кластер В-генома.

Все образцы вида *B. oleracea*, двух диких средиземноморских видов, родственных *B. oleracea* ( $n = 9$ ), *B. incana* и *B. taurica* (геном С), и вида *B. napus* (геном АС) образовали два близких кластера с небольшими различиями по положению образцов внутри кластеров, определенных разными методами анализа, и были отделены от В-геномных образцов. При этом виды *B. incana* и *B. taurica* расположены на дендрограммах рядом с листовыми капустами *B. oleracea* convar. *acephala* var. *medullosa* и *B. oleracea* convar. *fruticulosa* var. *ramosa*, а белокочанная капуста *B. oleracea* convar. *capitata* var. *capitata* f. *alba* отделена от них (генетическая дистанция 0,37). Образцы вида *B. napus* (геном АС) сформировали два кластера: образцы ярового рапса составили отдельный кластер и образцы озимого рапса и брюквы – другой. Два сорта ярового рапса, Westar (Канада) и Lisora



**Рис. 1.** RAPD профиль видов рода *Brassica* с праймером OPA 09.

1 – *B. rapa* (A); 2–6 – *B. napus* (AC); 7–10 – *B. oleracea* (C); 11 – *B. taurica* (C); 12 – *B. incana* (C); 13 – *B. carinata* (BC); 14 – *B. fruticulosa* (F); 15 – *B. nigra* (B); 16 – *B. juncea* (AB); 17 – *B. composita* (ABC); 18 – *B. souliei* (S); М – маркер молекулярной массы.



**Рис. 2.** SSR-профиль видов рода *Brassica* с парой праймеров Ni2-F02.

1 – *B. rapa* (A); 2–6 – *B. napus* (AC); 7–10 – *B. oleracea* (C); 11 – *B. taurica* (C); 12 – *B. incana* (C); 13 – *B. carinata* (BC); 14 – *B. fruticulosa* (F); 15 – *B. nigra* (B); 16 – *B. juncea* (AB); 17 – *B. composita* (ABC); 18 – *B. souliei* (S); М – маркер молекулярной массы.

(Германия), оказались очень близки друг к другу (генетическое расстояние 0,17), в то время как сорт Викинг (к-5208) из России несколько отделен от них (генетическое расстояние 0,23).

**Внутривидовые отношения разновидностей вида *B. oleracea*.** В ходе исследований выявлен высокий уровень полиморфизма среди различных разновидностей капусты огородной

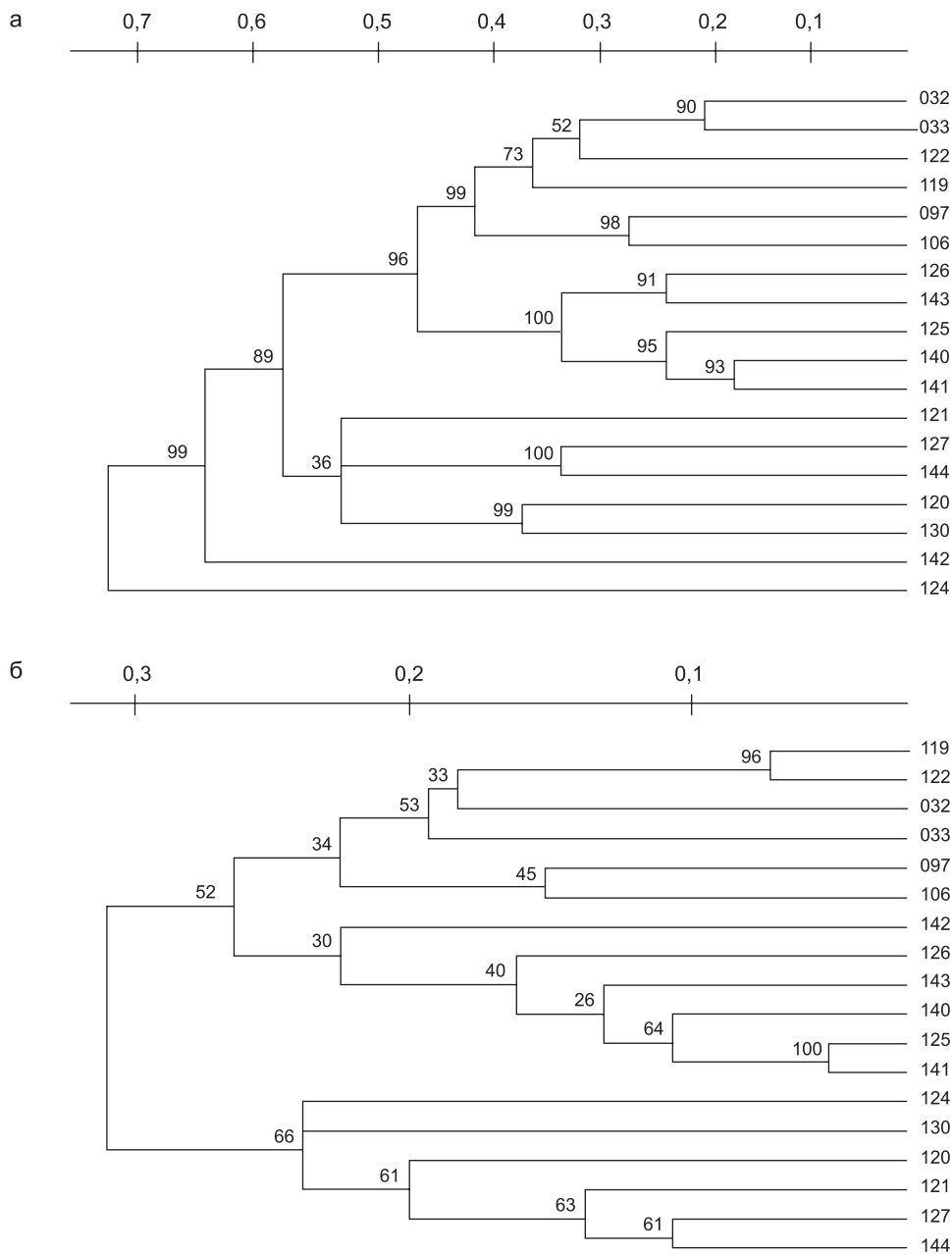


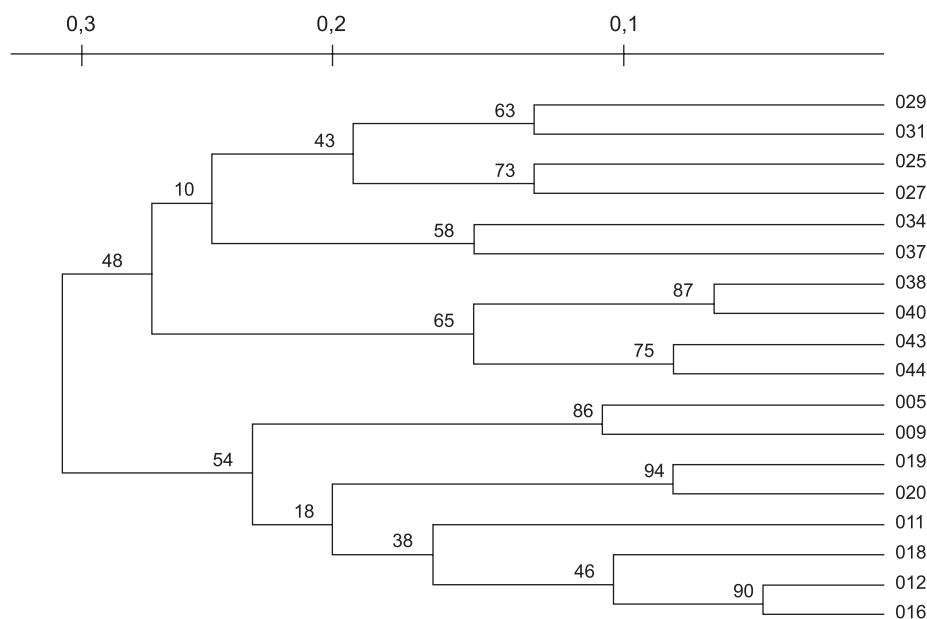
Рис. 3. UPGMA дендрограммы видов *Brassica*.

а – RAPD (генетические дистанции по Nei и Li); б – SSR (генетические дистанции Simple matching). Образцы: 032 – *B. oleracea* convar. *fruticosa* var. *ramosa*; 033 – *B. oleracea* convar. *acephala* var. *medullosa*; 122 – *B. incana*; 119 – *B. taurica*; 097, 106 – *B. oleracea* convar. *capitata* var. *capitata* f. *alba* (геном C); 126 – *B. napus* ssp. *oleifera* f. *biennis*; 143 – *B. napus* ssp. *napobrassica*; 125 – *B. napus* ssp. *oleifera* f. *annua* (Россия); 140, 141 – *B. napus* ssp. *oleifera* f. *annua* (Канада, Германия соответственно) (геном AC); 121 – *B. fruticulosa* (F); 127 – *B. nigra* (B); 144 – *B. juncea* (AB); 120 – *B. composita* (ABC); 130 – *B. carinata* (BC); 142 – *B. rapa* (A); 124 – *B. souliei* (S).

*B. oleracea*: наблюдали 350 RAPD и 96 SSR амплифицированных продуктов. Расхождения между результатами RAPD и SSR касались главным образом позиции группы кочанных капуст convar. *capitata*. UPGMA дендрограмма SSR-анализа приведена на рис. 4. На дендрограмме

представлены три главных кластера, соответствующие трем группам разновидностей: *acephala*, *botrytis* и *capitata* (Gladis, Hammer, 2003). В исследованиях I. Divaret и G. Thomas (1998) по результатам RAPD и S. Song с коллегами (1988) по результатам RFLP группа цветной капусты





**Рис. 4.** UPGMA-дендрограмма разновидностей вида *B. oleracea* (I) по результатам SSR-анализа (генетические дистанции Simple matching).

029 – брюссельская капуста; 031 – листовая капуста древовидная; 025, 027 – кольраби; 034, 037 – листовая капуста курчаволистная; 038, 040, 043, 044 – цветная капуста; 005, 009, 011 – белокочанная капуста; 019, 020 – савойская капуста; 016, 018 – краснокочанная капуста; 012 – португальская капуста.

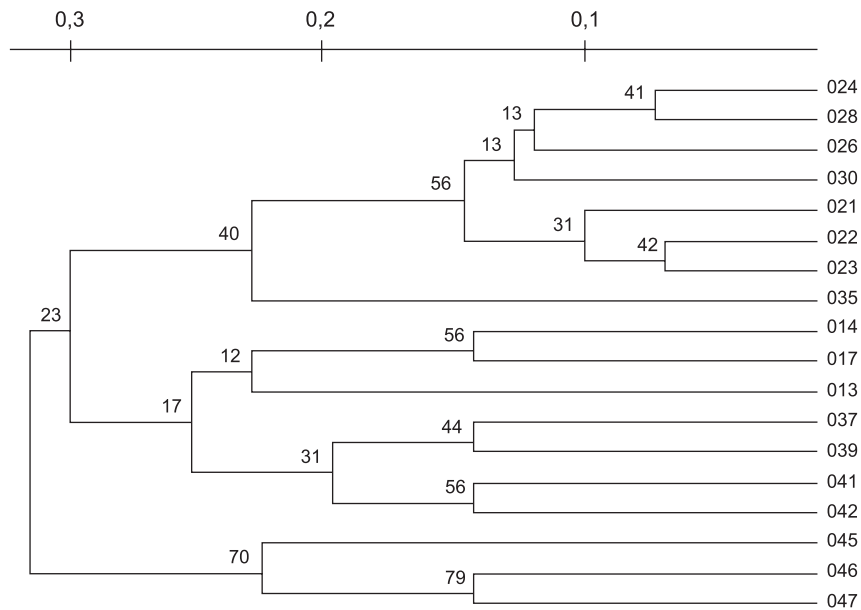
(*botrytis*) отделена от общей группы листовых (*acephala*) и кочанных (*capitata*) капуст. В наших исследованиях при SSR-анализе более отделена от двух других группа кочанных капуст, хотя отмечены низкие значения бутстреп, а по результатам RAPD сохраняется отдельное от других групп положение группы цветной капусты. Генетическое расстояние между сортами цветной капусты при RAPD было 0,25, что подтверждает предположение о значительном полиморфизме среди сортов цветной капусты. Большой кластер листовых капуст включает три подкластера: в первый вошли брюссельская капуста и листовая капуста древовидная, во второй – кольраби и в третий – курчаволистная капуста. В группе кочанных капуст сорта белокочанной капусты из северной и центральной зон России и сорта савойской капусты четко разделены; при этом отмечены высокие расстояния связывания: 86 и 94 соответственно. Отделена от них группа, в которую вошли португальская капуста, краснокочанная и образец белокочанной капусты из южной зоны России.

Использование для микросателлитного анализа другого набора сортов *B. oleracea* показало близкие, но не совпадающие результаты

(рис. 5). Отдельный кластер был сформирован образцами китайской листовой капусты *B. alboglabra* с высоким значением бутстреп 79, но кластер включал также один образец озимой цветной капусты, в то время как образцы скороспелой цветной капусты образовали отдельный кластер. Образцы кольраби с белым стеблеплодом (024 и 028) были кластеризованы отдельно от образца с синим стеблеплодом (026).

## Обсуждение

**Внутривидовое разнообразие *Brassica*.** Как известно, выбор расчета коэффициента подобия влияет на результаты кластерного анализа (Silva Meyer *et al.*, 2004). Некоторые из алгоритмов расчета генетической дистанции базируются на сравнении между совместным проявлением фрагментов в каждой аллельной паре («1» в матрице данных) и различиями между аллелями (обозначенными как «1 и 0» и «0 и 1») (Sorensen, 1948; Nei, Li, 1979; Jaccard, 1901). Другие алгоритмы включают показатель отсутствия фрагмента у аллельной пары, например, Simple matching. R. Sokal и C. Michener (1958) считают, что для доминантных RAPD-маркеров



**Рис. 5.** UPGMA-дендрограмма разновидностей вида *B. oleracea* (II) по результатам SSR-анализа (генетические дистанции Simple matching).

024, 026, 028 – кольраби; 030 – брюссельская капуста; 035, 037 – листовая капуста курчаволистная; 039, 041, 042, 045 – цветная капуста; 021, 022, 023 – савойская капуста; 014, 017 – краснокочанная капуста; 013 – португальская капуста; 046, 047 – *B. alboglabra*.

предпочтительнее методы расчета генетической дистанции, исключая последний показатель. Для кодоминантных SSR-маркеров было предложено использовать Simple matching метод, а для RAPD-маркеров – коэффициент Sorensen-Dice (da Silva Meyer *et al.*, 2004). При сравнении генетических дистанций для RAPD было установлено, что расчеты по Jaccard-Dice и Nei-Li дают одинаковые результаты (Divaret, Thomas, 1998).

В наших исследованиях были построены RAPD- и SSR-дендрограммы с использованием алгоритмов по Nei-Li и Simple matching для каждого метода анализа. Образцы на дендрограммах были организованы сходным образом, но применение расчета дистанции по Nei-Li для RAPD доминантных маркеров и Simple matching для SSR кодоминантных маркеров действительно показало результаты, более коррелирующие с ботанической классификацией. Использование матрицы по Nei-Li для построения комбинированной RAPD- и SSR-дендрограммы не выявило преимуществ по сравнению с применением каждого метода отдельно.

Положение вида *B. fruticulosa* соответствует его принадлежности линии *Sinapis*, к которой

относятся виды, содержащие В-геном (Warwick, Black, 1991). В то же время *B. fruticulosa* не образует фертильных гибридов с *B. nigra* и предположительно относится к другому цитодему (Gomez-Campo, Hinata, 1980). Отсутствие специфичного маркера генома В на электрофограмме этого вида подтверждает наличие у него отдельного генома F.

Позиция на дендрограмме *B. oleracea* и видов *B. incana* и *B. taurica* ( $n = 9$ ) отражает общее происхождение дикой *B. oleracea* = syn. *B. sylvestris* и этих видов и/или возможное участие родственных видов в становлении листовых капуст, что согласуется с данными С. Gomez-Campo (1999). Генетическая дистанция между *B. incana* и *B. taurica* при RAPD- и SSR-анализах равнялась 0,36 и 0,06 соответственно. Существование таких отношений, скорее, подтверждает предположение о том, что *B. taurica* представляет собой обособившуюся популяцию *B. incana* из восточной части ареала вида (Snogerup, 1980).

Использование для SSR-анализа пары праймеров 0109-A03, описанной Lowe *et al.* (2002) как генерирующей маркеры, специфичные для С-генома, в наших исследованиях показало

другие результаты. Все С-геномные образцы, один образец озимого рапса (АС) и образец *B. fruticulosa* (F) также имели этот маркер (128–140 пн). В то же время пара праймеров Ni2-F02, описанная прежде как генерирующая маркеры для А-, В- и С-геномов, в настоящей работе продуцировала четко выраженные маркеры, специфичные для В-генома, с размером 216–218 пн, и очень слабо выраженные маркеры для С-геномных образцов размером 173–175 пн (рис. 2). Более высокая специфичность наших результатов может быть объяснена использованием в наших исследованиях более высокой температуры отжига – 65 °С вместо 55 °С, как было предложено Lowe *et al.* (2002).

*Внутривидовое разнообразие B. oleracea.* Среди разновидностей вида *B. oleracea* наблюдали большую вариабельность (генетическая дистанция по Nei и Li равна 0,67). Возможно, различные типы листовых капуст имеют общее происхождение от мозговой капусты *B. oleracea* convar. *acephala* var. *medullosa* и не могут быть надежно разделены RAPD-анализом (Divaret, Thomas, 1998). Однако в наших исследованиях были выделены три кластера, соответствующие морфологическому делению. Исключением явилось положение образца брюссельской капусты, который попал в один кластер с листовой капустой. Но этот факт не удивителен, так как известно существование тесных связей между листовыми капустами и брюссельской, имеющими общее происхождение. Объединение в одной группе краснокочанной капусты, одного образца белокочанной капусты и португальской капусты Тронхуда может быть объяснено общим происхождением краснокочанной капусты и восточной группы сортов белокочанной капусты в Малой Азии (Лизгунова, 1984), а также участием полукочанной португальской капусты в становлении типичных кочанных капуст (Dias, Monteiro, 1994).

Образцы *B. alboglabra* образовали на дендрограмме отдельный кластер от кластеров других культур *B. oleracea*, что может служить подтверждением вывода Gomez-Campo (1999) о том, что китайская листовая капуста – это отдельный подвид в пределах вида. С другой стороны, образцы *B. alboglabra* были кластеризованы вместе с образцом озимой цветной капусты, что заставляет предположить

родственные связи между ними и принять во внимание то, что ранее таксономическое положение китайской листовой капусты было определено как разновидность var. *alboglabra* (Bail.) Sun в группе разновидностей цветной капусты convar. *botrytis* (Gladis, Hammer, 2003). Из этого следует, что таксономическое положение китайской листовой капусты по-прежнему требует уточнения.

Таким образом, в наших исследованиях RAPD-анализ позволил оценить взаимоотношения внутри рода *Brassica* на уровне видов, групп разновидностей и отдельных разновидностей с некоторыми отличиями от ботанической классификации. В то же время в настоящем исследовании результаты SSR-анализа более соответствовали ботанической классификации. Это подтверждает положение Varshney с соавт. (2005) о том, что среди различных классов молекулярных маркеров SSR-маркеры более других подходят для генетических и селекционных исследований в царстве растений благодаря их воспроизводимости, мультиаллельной природе, кодоминантному характеру наследования, широкой распространенности в геноме.

В результате наших исследований выявлены специфичные RAPD-маркеры для генома С, а также SSR-маркер для генома В. Подтверждено, что вид *B. fruticulosa* Cyt. средиземноморская капуста принадлежит линии В-генома, но имеет собственный геном F. Предварительно описанный как вид крымская капуста *B. taurica* Tzvel. определен как подвид вида *B. incana* Ten. Вид *B. incana* близкородственен листовым капустам вида *B. oleracea* – группам разновидностей convar. *fruticulosa* и convar. *acephala*. Китайская листовая капуста *B. alboglabra*, по всей вероятности, может быть включена в вид *B. oleracea* в ранге подвида. С помощью SSR-анализа вид *B. oleracea* капуста огородная разделен на кластеры, в целом соответствующие ботаническим группам разновидностей и разновидностям, хотя специфичных дескрипторов для разновидностей установить не удалось.

### Литература

- Анискина Ю.В., Бирюкова В.А., Велишаева Н.С. и др. ДНК-генотипирование растений родов *Brassica* и *Solanum* // С.-х. биология. 2005. № 1. С. 110–119.

- Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 358–365.
- Лизгунова Т.В. Культурная флора СССР. Т. XI. Капуста. Л.: Колос, 1984. 328 с.
- Allender C.J., Allainguillaume J., Lynn J., King G.J. Simple sequence repeats reveal uneven distribution of genetic diversity in chloroplast genomes of *Brassica oleracea* and ( $n=9$ ) wild relatives // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. P. 609–618.
- Al-Shehbaz I., Beilstein M., Kellogg E. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview // Plant Syst. Evol. 2006. V. 259. P. 89–120.
- Bailey C.D., Koch M.A., Mayer M. *et al.* Toward a global phylogeny of the Brassicaceae // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. P. 2142–2160.
- Dias J.S., Monteiro A. Taxonomy of Portuguese tronchuda cabbage and galega kale landraces using morphological characters, nuclear RFLPs, and isozyme analysis: A review // Euphytica. 1994. V. 79. № 1. P. 115–126.
- Divaret I., Thomas G. Use of RAPD markers to analyse the genetic variability of a collection of *Brassica oleracea* L. // Proc. Int. Symp. on Brassicas. Acta Hort. 1998. V. 459. P. 255–262.
- Gladis T., Hammer K. Die *Brassica-oleracea*-Gruppe. Lennestadt. 2003. 45 p.
- Gomez-Campo C. Taxonomy // Biology of *Brassica* coenospecies. Amsterdam-Lausanne-New York-Shannon-Singapore-Tokyo: Elsevier Press, 1999. P. 3–32.
- Gomez-Campo C., Hinata K. A check list of chromosome numbers in the tribe Brassiceae // *Brassica* Crops and Wild Allies. Japan, Tokyo: Japan Sci. Soc. Press. 1980. P. 51–63.
- Jaccard P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura // Bull. Soc. Vandoise Sci. Nat. 1901. V. 37. P. 547–579.
- Louarn S., Torp A.M., Holme I.B. *et al.* Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* // Genet. Res. Crop Evol. 2007. V. 54. P. 1717–1725.
- Lowe A.J., Jones A.E., Raybould A.F. *et al.* Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 7–12.
- Lysak M.A., Cheung K., Kutschke M., Bures P. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in *Brassicaceae* species with varying chromosome number and genome size // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 402–410.
- Murren C.J., Pendleton N., Pigliucci M. Evolution of phenotypic integration in *Brassica* (*Brassicaceae*) // Amer. J. Botany. 2002. V. 89. P. 655–663.
- Negi M.S., Sabharwal V., Bhat S.R., Lakshmikumar M. Utility of AFLP markers for the assessment of genetic diversity within *Brassica nigra* Germplasm // Plant Breeding. 2004. V. 123. P. 13–16.
- Nei M., Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
- Silva Meyer da A., Garcia A.A.F., Pereira de Souza A., Lopes de Souza Jr. C. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.) // Genet. Mol. Biol. 2004. V. 27. № 1. P. 83–91.
- Snogerup S. The wild forms of *Brassica oleracea* group ( $2n=18$ ) and their possible relations to the cultivated ones // *Brassica* Crops and Wild Allies / Ed. S. Tsunoda, K. Hinata, C. Gomez-Campo. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, 1980. P. 121–132.
- Snowdon R.J., Friedt W. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities // Plant Breeding. 2004. V. 123. P. 1–8.
- Sokal R.R., Michener C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships // Univ. Kans. Sci. Bull. 1958. V. 38. P. 1409–1438.
- Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 2. Preliminary analysis of subspecies within *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* // Theor. Appl. Genet. 1988. V. 76. P. 593–600.
- Sorensen T. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons // Vidensk. Selsk. Biol. Skr. 1948. V. 5. P. 1–34.
- Specht C.E., Diederichsen A. *Brassica oleracea* group // Mansfelds Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops (except ornamentals) / Ed. P. Hanelt. Berlin-N.Y.: Springer, 2001. P. 1435–1446.
- Szewc-McFadden A.K., Kresovich S., Bliet S.M. *et al.* Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 93. P. 534–538.
- Tonguç M., Griffiths F.D. Genetic relationships of *Brassica* vegetables determined using database derived simple sequence repeats // Euphytica. 2004. V. 137. P. 193–201.
- U N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization // Jap. J. Bot. 1935. V. 7. P. 389–452.
- Uzunova M.I., Ecke W. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rapa (*Brassica napus* L.) // Plant Breeding. 1999. V. 118. P. 323–326.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrels M.E. Genic micro-

- satellite markers in plants: features and application // Trends Biotechnol. 2005. V. 23. № 1. P. 48–55.
- Warwick S., Black L.D. Molecular systematics of *Brassica* and allied genera (subtribe *Brassiceae*) – chloroplast genome and cytodeme congruence // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 82. P. 81–92.
- Warwick S.I., Sauder C.A. Phylogeny of tribe Brassiceae (Brassicaceae) based on chloroplast restriction site polymorphisms and nuclear ribosomal internal transcribed spaces and chloroplast *trnL* intron sequences // Can. J. Bot. 2005. V. 83. P. 467–483.
- Zhao J., Wang X., Deng B. *et al.* Genetic relationships within *Brassica rapa* inferred from AFLP fingerprints // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 10. P. 1301–1314.

## MOLECULAR ANALYSIS OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF CABBAGE (*BRASSICA OLERACEA* L.)

A.M. Artemyeva<sup>1</sup>, E. Klocke<sup>2</sup>, Yu.V. Chesnokov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russian N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry (VIR), St.-Peterburg, Russia, e-mail: akme11@yandex.ru; yu.chesnokov@vir.nw.ru;

<sup>2</sup> Institute for Horticultural Crops, Quedlinburg, Germany, e-mail: E.Klocke@BAFZ.de

### Summary

RAPD and SSR were used for analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships between some *Brassica* wild species of uncertain taxonomy and *B. oleracea* varieties. Fifty-three accessions of different taxonomic levels were tested: wild species, landraces, and old and advanced cultivars from the VIR collection. The analysis was performed with 19 OPA primers for RAPD and 10 primer pairs from Operon Technologies for SSR were used. Specific descriptors for B and C genomes were found. Dendrograms showing relationships between accessions of different taxonomic levels were constructed on the base of Nei and Li genetic distances (1979) for RAPD and Sokal and Michener distances (1958) for SSR. The *Brassica* species and *B. oleracea* varieties were found to be highly polymorphic.

**Key words:** *Brassica*, *Brassica oleracea*, RAPD, SSR, molecular markers, phylogeny.