

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ВНУТРИВИДОВЫЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ КУЛЬТУР ВИДА *BRASSICA RAPA* L. ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТОВ

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

<sup>1</sup> Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: akme11@yandex.ru; <sup>2</sup> Институт селекционных исследований садовых и овощных культур, Германия

Проведено изучение генетического разнообразия и внутривидовых отношений вида *Brassica rapa* L. ( $2n = 20$ , геном AA) при использовании для этих целей 96 образцов стержневой коллекции ВИР и метода анализа микросателлитов. С помощью 61 полиморфного маркерного фрагмента построена UPGMA дендрограмма, на которой выделяются два основных кластера. Первый кластер составили преимущественно восточноазиатские листовые овощные культуры, а второй – корнеплодная репа и все масличные культуры. На дендрограмме образцы овощных культур разделены на внутривидовые группы, включая два кластера пекинской капусты и кластеры китайской и японской капуст. Японские листовые культуры, а также гибриды между подвидами кластеризованы вместе с морфологически близкими и генеалогически родственными образцами. Используемые SSR праймеры не позволили выделить отдельные подвиды репы и масличных культур. Однако применение изученных микросателлитных маркеров вида может быть использовано в селекционных программах для дифференциации образцов восточноазиатских листовых овощных культур при поиске различных генотипов.

**Ключевые слова:** *Brassica rapa* L., микросателлиты, филогения, SSR маркеры, генетическое разнообразие.

### Введение

Вид *Brassica rapa* L. включает экономически важные масличные, овощные и кормовые, листовые и корнеплодные культуры и широко распространен на земном шаре. Вид представлен столь огромным разнообразием форм, возникшим в ходе эволюции и domestikации, что многие внутривидовые таксоны имели в предыдущих классификациях ранг видов (Bailey, 1940; Синская, 1969). G. Olsson (1954) доказал свободную скрещиваемость видов по Bailey (1940), их общую кариологию и объединил их в один вид *Brassica rapa*. Последние классификации вида (Hanelt, 1986; Gladis, Hammer, 1992; Specht, Diederichsen, 2001) носят еще предварительный характер из-за недостаточности знаний о происхождении, становлении и внутривидовых взаимоотношениях.

Эти вопросы являются предметом исследования многих авторов, использующих различные методы от изучения древних литературных и археологических источников различных цивилизаций, сравнительной таксономии, особенностей распространения до анализа цитогенетических, биохимических, молекулярных данных (Song *et al.*, 1988; Gomez-Campo, 1999; Specht, Diederichsen, 2001; Игнатов, 2006).

По современным воззрениям, вид *B. rapa* ( $2n = 20$ , геном AA) произошел относительно недавно от вида *B. oleracea* ( $2n = 18$ , геном CC) в районе восточного Средиземноморья (Балканы и Малая Азия) и явился первым domestikцированным видом рода *Brassica* (Gomez-Campo, 1999). Вид разделен на западную евразийскую ветвь (*ssp. rapa, oleifera, dichotoma, trilocularis*), главным образом включающую корнеплодные и масличные культуры Европы, Центральной Азии и Ин-

дии, и восточноазиатскую ветвь (*ssp. chinensis*, *pekinensis*, *nipposinica*), включающую в основном овощные культуры. По С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001), западная группа – предковая, масличные культуры представляются более примитивными таксонами, и domestикация *ssp. oleifera* могла произойти в Юго-Западной Азии. При этом озимая сурепица (*ssp. oleifera biennis*) может быть предком репы (*ssp. rapa*). Сорные формы (*ssp. sylvestris* (Lam.) Janchen) не могут быть разделены таксономически из-за их ясного сходства с летней сурепицей (*ssp. oleifera annua*).

В то же время I.H. Burkill (1930) рассматривал Европу как место первой domestикации *B. rapa* в качестве двулетнего растения, от которого произошли в результате селекции однолетние формы (по: Gomez-Campo, 1999). А.Н. Игнатов (Персональное сообщение) предполагает, что первой domesticiрованной культурой вида была двулетняя корнеплодная репа Западной и Центральной Азии, откуда она распространилась на запад в Европу и на восток двумя волнами в южный и северный Китай. Эта идея ассоциируется с наблюдениями Е.Н. Синской (1928), которая описала 7 эколого-географических групп репы и предположила, что афганский тип явился предковой формой культивируемых *B. rapa*. Н. Reineg с соавт. (1995) соглашаются, что в Европе использование корнеплодного типа *B. rapa* очень древнее, это растение было прямо domesticiровано из дикого предка и позже дало начало европейским масличным культурам вида. Индийские масличные подвиды могли быть domesticiрованы независимо (Синская, 1928) или произошли от западной популяции (Gomez-Campo, 1999). По С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001), индийские масличные культуры коричневого сарсон (старейшая масличная культура Индии) и тория объединены, но это предложение не принято единодушно. Желтый сарсон, единственная самосовместимая культура в виде, однозначно происходит от *ssp. dichotoma*.

Восточная ветвь вида *B. rapa* развилась предположительно из масличных форм (Gomez-Campo, 1999), корнеплодной репы (Игнатов, 2006) или обеих этих форм (Takuno *et al.*, 2007) в Китае, а затем в Корее и Японии. Диверсификация здесь связана со специализацией по способу и сезону использования в различных климатических регионах. Китайская капуста

пак-чой (*ssp. chinensis*) была первой листовой (черешковой) овощной культурой, возникшей в Центральном Китае (Li, 1982). Ее древность подтверждается широким морфологическим разнообразием и высоким уровнем полиморфизма ДНК (Gomez-Campo, 1999). История и происхождение пекинской капусты *B. rapa ssp. pekinensis* – самой широко распространенной восточноазиатской овощной культуры вида – хорошо документированы (Li, 1982).

Н. Тохореус с соавт. (1997) разделили культуры вида по хозяйственному использованию на овощные, кормовой и масличные типы. Однако, по нашему мнению, такое деление не является основанием для таксономических построений, в том числе потому, что существуют культуры двойного использования: например, некоторые формы при весеннем посеве в Китае используются для получения масла, а при летне-осеннем – овощной продукции, листьев или корнеплодов. Представляется логичным создание внутривидовой классификации на основании филогенетического родства. Заслуживает внимания предложение А.Н. Игнатова (2006) объединить некоторые подвиды в китайскую и японскую группы.

Мировая коллекция вида *B. rapa* России, хранящаяся во ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, включает 327 образцов масличных культур, 525 образцов шести листовых овощных культур и 406 образцов корнеплодной репы. В результате многолетнего изучения этой коллекции в различных эколого-географических зонах страны в ВИР были описаны группы сортов (форм), различающихся по комплексу биологических признаков (Синская, 1928; Шебалина, 1974; Шебалина, Сазонова, 1985; Артемьева, 1999, 2001, 2004). В пределах каждой группы выделены сортоотипы – группы сортообразцов с близкими морфологическими, физиологическими, биохимическими и хозяйственно важными признаками. Эта работа послужила первым подходом к созданию стержневой коллекции вида.

Для изучения генетического разнообразия и генетических взаимоотношений в роде *Brassica* широко используются молекулярные маркеры (см. обзор Snowdon, Friedt, 2004). Генетическое разнообразие вида *B. rapa* интенсивно изучалось молекулярно-биологическими методами

(Song *et al.*, 1988, 1990; Zhao *et al.*, 2005; Ling *et al.*, 2007; Takuno *et al.*, 2007; Warwick *et al.*, 2007). В целом в работах отмечена тенденция к группировке образцов в соответствии с географическим происхождением в европейскую, индийскую (или одну евразийскую) и восточноазиатскую группы.

Цель настоящей работы – изучение генетического разнообразия и попытка уточнения внутривидовой классификации *B. rapa* посредством анализа микросателлитов геномов представителей вида из коллекции ВИР, в том числе установление отличимости подвидов/разновидностей и расположения гибридных форм на филогенетическом древе.

### Материал и методы

**Растительный материал.** Стержневая коллекция, отражающая ботаническое разнообразие вида *B. rapa*, включала 96 местных и селекционных образцов различного происхождения (табл. 1). Таксономическое деление дано по С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001) за исключением выделения *ssp. sylvestris* (Lam.) Janchen в отдельный от *ssp. oleifera* подвид.

**Выделение ДНК.** ДНК экстрагировали из молодых листьев по методике Д.Б. Дорохова и Э. Клоке (1997). Для совокупного гетерогенного анализа ДНК использовали 5 растений каждого образца. 5 растений каждого образца могут представляться не вполне достаточным для оценки разнообразия среди сортов-популяций перекрестноопыляющихся культур вида. Однако мы опирались на результаты, полученные S. Warwick с соавт. (2007) и S. Takuno с соавт. (2007), которые сравнивали количество фрагментов на электрофореграммах при использовании совокупности из 5 растений и набора индивидуальных растений одного и того же образца. Их данные свидетельствуют о том, что 95 % фрагментов были общими. Кроме того, целью работы было изучение разнообразия внутри целого вида, члены которого сильно различаются по морфологическим и биологическим особенностям, происхождению и использованию, и мы допустили, что ошибка от потери некоторых редких аллелей была общей по коллекции и не сыграла существенной роли в определении взаимоотношений между отдельными образцами.

### SSR (Simple Sequence Repeats) анализ ДНК.

Для анализа ДНК использовали 10 олигонуклеотидных пар праймеров (табл. 2), созданных в Китае Ma Rongcai (Персональное сообщение, неопубл. данные) и отобранных ранее для определения полиморфизма среди образцов пекинской капусты. В задачу наших исследований входило также установление возможности применения этого набора праймеров для анализа разнообразия других подвидов вида.

ПЦР проводили по методике, разработанной в лаборатории селекции растений Университета Вагенингена (Нидерланды), руководитель д-р А.В. Vonpema (Персональное сообщение). В смесь конечным объемом 12,5 мкл добавляли: 10 х инкубационный буфер (1,25 мкл), 0,25 мкл каждого dNTP (10 мМ), по 0,25 мкл каждого праймера (10 пикомоль/мкл), 0,1 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед/мкл) (Qbiogene, Германия) и 20 нг геномной ДНК.

Аmplification осуществляли в ДНК амплификаторе (BioRad, Германия), запрограммированном на 42 цикла: 1 – первичная денатурация при 94 °С 3 мин (1 цикл), 2 – денатурация при 94 °С 1 мин, отжиг праймеров при использовании touch-down с 65 °С до 56 °С по 1 мин, элонгация при 72 °С 1,5 мин (10 циклов), 3 – 94 °С 1 мин, отжиг при 55 °С 1 мин, 72 °С 1,5 мин (30 циклов), 4 – 72 °С 5 мин (1 цикл). Финальная температура – 4 °С.

Для электрофореза в ПААГ (8%) использовали автоматизированный секвенатор Li-Cor 4200 (Biosciences, Линкольн, Небраска, США), для визуализации и документации полученных данных использовали программу GeneIR для Li-Cor.

**Обработка экспериментальных данных.** При оценке данных использовали маркерные фрагменты размером от 100 до 300 пн, которые были рассмотрены как кодоминантные 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).

Коэффициенты (индексы) подобия рассчитывали с использованием генетической дистанции по R.R. Sokal и C.D. Michener (1958) (Simple matching). Кластерный анализ выполнен методом UPGMA с использованием программы TREECON для Windows (версия

Таблица 1

Список проанализированных образцов вида *Brassica rapa* L.

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на ден- дрограмме	Название образца	Происхож- дение
<i>ssp. pekinensis</i> (Lour.) Hanelt – пекинская капуста	Дунганская	139	001	Дунганская	Казахстан
	Сяо	53	008	Местный	Казахстан
		74	009	Сяо-бай-коу	Китай
		89	010	Доу-образная раннеспелая	Китай
		100	011	Nikoshima spring	Япония
		238	007	Nagoya Market	Япония
		58	012	Би-це	Киргизия
		210	013	KiribaSanto	Япония
		108	014	Местный	Китай
		132	017	Kasin	Япония
		247	018	Хасинбечу	Корея
	Чосен	122	020	Лен-син-дзон	Китай
		207	021	Chosen	Япония
	Аити	63	022	Местный	Китай
		131	023	Aichi	Япония
	Нозаки	111	025	Nozaki early	Япония
		327	026	Nozaki Harumaki	Япония
	Кага	103	028	Kaga	Япония
		88	029	Цзюй-син-бао-тоу-бай-цай	Китай
	Хоторен	127	030	Hotoren	Япония
	Чи-фу	48	031	Wong-Bok	Нидерланды
		110	033	Matsushima	Япония
	Кенсин	222	034	Kensin	Япония
	Гранат	164	036	Michihli	Канада
71		038	Хэ-тоу-вень	Китай	
Да-цин-коу	56	039	Да-цин-коу	Китай	
	128	040	Цжжита	Япония	
	198	041	Местный	Китай	
<i>ssp. chinensis</i> (L.) Hanelt – китайская капуста	Пиорбай	75	042	Пиорбай	Китай
	Сьюсман	77	043	Сьюсман	Китай
		Вр.930	044	Майская 8	Китай
	Тайсай	46	045	Тайна	Россия
	Ю-тсай (var.utilis)	106	046	Янцай	Китай
		195	048	Местный	Китай
203	049	Ching Pang Ju Tsai	Китай		
<i>var. rosularis</i> (Tsen & Lee) Hanelt – розеточная капуста	Та-гу-цай	84	050	Хэ-ю-та-цай	Китай
		129	051	Та-гу-цай	Китай

## Продолжение таблицы 1

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на ден- дрограмме	Название образца	Происхож- дение
<i>var. narinosa</i> (Bailey) Hanelt – широконосная капуста	Хризантемум	154	052	Chrysanthemum heart	Китай
		213	053	Bitamin na	Япония
<i>var. purpuraria</i> (Bailey) Bailey – пурпурная капуста		391	054	Xing Yang	Китай
<i>ssp. nipposinica</i> (Bailey) Hanelt – японская капуста	Мибуна	115	055	Mibuna	Япония
	Мизуна	159	056	Mizuna	Япония
		241	057	Shiroguki Kyona	Япония
<i>ssp. rapa</i> L. f. <i>Komatsuna</i> – листовая репа	Комацуна	215	059	Uzuki Komatsuna	Япония
		242	060	Goseki Late	Япония
	Куроха	264	061	Kuroha	Япония
Японские листовые овощи	Мана	372	002	Bansei Mana	Япония
	Сирона	98	003	Osaka Market	Япония
		217	004	Okute Osaka Shirona	Япония
	Хиросимана	335	005	Hiroshimana	Япония
Стабильные гибриды между подвидами		96	063	Шантай	Китай
		302	064	Гурин Дэбюу	Япония
		331	065	White Long Petiole	Япония
		436	066	Benrina	Япония
<i>ssp. rapa</i> L. – репа	Китайский	163	058	Местный	Китай
	Остерзундомский	307	097	Остерзундомский	Россия
	Бортфельдский	385	098	Бортфельдский	Украина
	Карельская	738	099	Карельская	Россия
	Гробовская	821	100	Гробовская	Россия
	Миланская белая	826	101	Миланская белая	Россия
	Петровская	830	102	Петровская	Россия
	Тельтовский	894	103	Тельтовская	Германия
	Норфолькский фиолетовоголовый	984	104	Норфолькский	Франция
	Волынский	1050	105	Волынский	Украина
Золотой шар	1283	106	Золотой шар	Нидерланды	
<i>ssp. oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> – сурепица яровая		68	062	Местный	Китай
		1	067	Kun Min ai u-zai	Китай
		2	068	Hue Zin u-zai	Китай
		11	069	Gute	Финляндия
		13	070	Местный	Аргентина
		25	071	Zsjan Su U uan-uzai 5082	Китай
		63	073	Pahsi	Индия
		106	075	Lotni mustard	Индия

## Окончание таблицы 1

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на ден- дрограмме	Название образца	Происхож- дение
<i>ssp. oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> – сурепица яровая		108	076	Arlo	Швеция
		114	077	Local (tetraploid)	Пакистан
		163	081	LGL	Пакистан
		192	085	Mustard	Непал
		248	088	Local	Испания
		251	089	Vat-cawte	Танзания
		301	091	BHLS	Непал
		339	095	Jui-cai-tai	Китай
	374	096	Local 88/47	Бутан	
<i>ssp. oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>biennis</i> – сурепица озимая		166	082	Root mustard	Тунис
		337	093	U-zai-zsi	Китай
<i>ssp. dichotoma</i> (Roxb.) Hanelt – коричневый сар- сон и тория		53	072	Local toria	Индия
		100	074	Local	Непал
		135	079	Ds 17	Индия
		161	080	Toria selection	Пакистан
		205	086	Sarson	Пакистан
<i>ssp. trilocularis</i> (Roxb.) Hanelt – желтый сарсон		131	078	Type 1	Индия
		188	083	Palton sarson 66	Индия
		299	090	Sangam	Индия
		338	094	Chen-du-ai-u-zai	Китай
<i>ssp. sylvestris</i> (Lam.) Janchen – дикая сурепица		176	084		Италия
		218	087	Nabo silvestre	Перу

1.36). Для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) анализ для 100 повторностей.

### Результаты

Изучение показало достаточно высокий уровень полиморфизма между членами вида: с 10 парами праймеров наблюдали 61 полиморфный SSR фрагмент (табл. 2). Размер амплифицированных фрагментов находился в пределах от 146 до 297 п.н. Отмечены региональные различия уровня генетического разнообразия: число ампликонов, продуцируемых различными праймерами, варьировало от 4 до 10 для масличных культур и европейской репы и от 2 до 8 для восточноазиатских листовых овощных культур, и уровень полиморфизма восточноазиатской

группы составил 82 % от уровня полиморфизма евразийской группы.

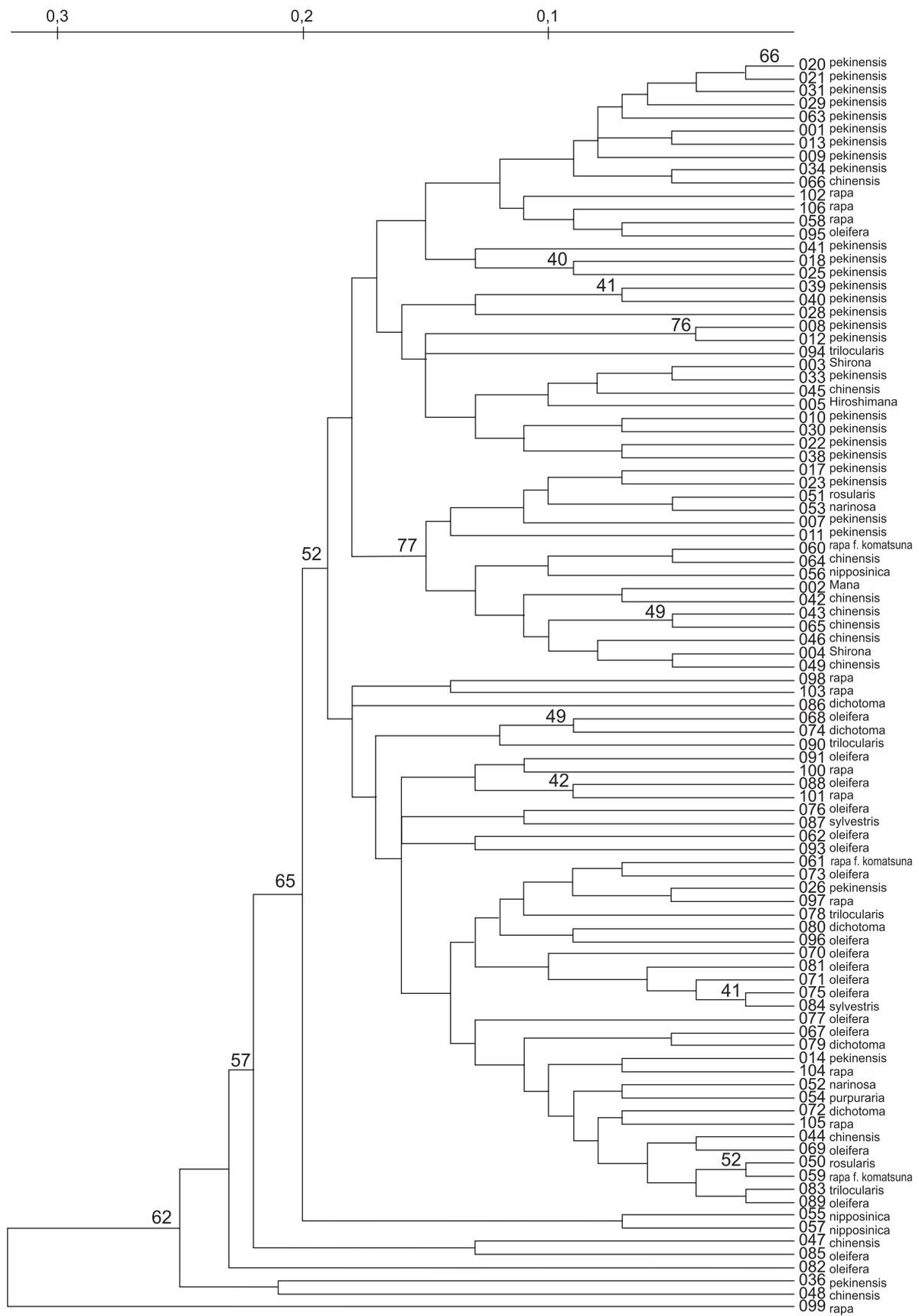
На рис. 1 представлена дендрограмма, построенная для всех 96 изученных образцов по результатам анализа микросателлитов при использовании метода расчета генетической дистанции Simple matching. Образцы на дендрограмме сгруппированы в два большие кластера, несколько образцов находятся за пределами кластеров, и образец европейской репы сортотипа Карельская (099 на дендрограмме) занимает позицию out-group.

Первый большой кластер включает подавляющее большинство образцов пекинской и китайской капусты, два образца розеточной капусты, стабильные гибриды между подвидами и все японские листовые овощные культуры. При этом гибрид с пекинской капустой в качестве

Таблица 2

Полиморфные EST-SSR локусы и образованные на их основе последовательности праймеров, местоположение маркеров в группах сцепления, размеры ампликонов, число аллелей, продуцированных каждым праймером

Название локуса	Мотив	Праймеры (прямой, обратный)	Местоположение SSR маркера в группах сцепления	Ожидаемый размер ампликона, п.н.	Наблюдаемый размер ампликона, п.н.	Число аллелей	
						Масличные, европейская репа	Восточно-азиатские культуры
BC7	(ACC) <sub>6</sub>	AGTTGGCCCCCAATTTCATTGTTAT CATCTTGACGGCCTCCCATCTCCA	R01	153	147–179 (основной 153)	10	8
BC38	(ATC) <sub>7</sub> ...(AAG) <sub>5</sub>	CTTTTGGTGCCTCCGACGAGA AAGGAAAGCAGGAAAGAGATAAAAAG	R03	198	184–203 (основной 200)	6	6
BC46	(GAA) <sub>6</sub>	AGGTTTCGAGGTTTGTGGCTTCT СТАААСТСАТСГТТССГТАААСА	R01	184	177–212 (основной 181)	6	2
BC48	(TCT) <sub>7</sub>	GGTGGTGGGCTGGGGAGTA CGTTCGATCGATTCAATAACCGTAGA	R02	237	230–251	4	6
BC51	(GAA) <sub>6</sub>	CCGAGGAAGAAAGCTGTTGAGTTG ATCGCTTCCGТАGACACCTTCGTT	R06	154	146–154 (основной 151)	4	2
BC63	(AG) <sub>9</sub>	TTCGGTCCCTTCCCTAAАСА GAACACТАCTGCCСAGAGAACAC	R03	202	189–207 (основной 198)	7	4
BC65	(AG) <sub>7</sub>	TCCCGTCCCTTCCCTAAАСА TGAACACТАCTGCCСAGAGAACAC	R04	200	189–207 (основной 200)	5	4
BC89	(AG) <sub>7</sub>	CGTCCGTAGCGCTAТТТТCAGA ACGTTGTCGATCGCCСAGTTC	R06	199	182–250	9	9
BC105	(CT) <sub>7</sub>	GACGCCCTCAATTGCTТАCTT AGGGAATGAGGATGGGTCTG	R05	212	207–214 (основной 207)	4	3
BC107	(TC) <sub>10</sub>	ATACAATCTCTGTGACTCTACAG AGCATCAAGGCCAАCTTTATCC	R09	204	284–297 (основной 295)	6	6



**Рис. 1.** UPGMA дендрограмма образцов вида *Brassica rapa*.  
Пояснения в табл. 1 и в тексте. Шкала показывает генетическую дистанцию.

одного родителя вошел с ней в один подкластер, а гибриды между китайской капустой и розеточной капустой – в подкластер китайской капусты. Один из образцов японских листовых овощей Хиросимана (005) и один из образцов Сирана (Osaka Market, 003), у которых морфологические признаки пекинской капусты преобладают, находятся в одном кластере с ней, в то время как формы Мана (002), Осака Сирана (004) и Хиросимана (007) – с китайской капустой. Также в подкластер китайской капусты входят один из образцов японской капусты (056), листовая японская репы (060) и два образца розеточной (*rosularis* и *narinosa*) капусты (051 и 053).

Среди образцов пекинской капусты очень близки генетически оказались сорта сорто-типа Чосен и Да-цин-коу из Китая и Японии (соответственно 020 и 021 и 039 и 040), сорта сортотипов Касин и Нозаки из Кореи и Японии (018 и 025), сорта сортотипов Сяо и Санто из Казахстана и Киргизии (008 и 012). В двух последних случаях сорта относятся к разным, но генеалогически родственным сортотипам.

Во втором большом кластере дендрограммы находятся преимущественно образцы масличных культур *ssp. oleifera*, *dichotoma*, *trilocularis*, а также *ssp. sylvestris* за исключением двух образцов, вошедших в кластер восточноазиатских листовых культур. По результатам анализа оказалось невозможным разделить масличные культуры по ботаническим подвидам. Также в этом кластере находится большинство образцов корнеплодной репы за исключением трех образцов, вошедших в первый кластер, и образца out-group. При этом образцы корнеплодной репы не только не образовали отдельного кластера, но оказались распределены достаточно равномерно между несколькими кластерами. Отдельный небольшой кластер образовали два из трех образцов японской капусты *ssp. nipposinica* (055, 057).

Внутри больших кластеров наблюдали близкие значения разнообразия – коэффициенты подобия 0,83. Несколько дальше отстоит от них кластер японской капусты (0,80). Образец out-group имеет коэффициент подобия 0,67.

### Обсуждение

Полиморфные EST-SSR локусы, выбранные для создания использованных в настоящей

работе праймеров, находятся в 7 из 10 группах сцепления – R01, R02, R03, R04, R05, R06 и R09 *B. rapa*.

Все маркерные фрагменты с ожидаемым или близким к нему размером отмечены у большинства членов вида. Различия между большими группами образцов по данному маркеру связаны главным образом с появлением редких аллелей в группе масличных культур и европейской репы, а также с различной частотой встречаемости общих для вида аллелей с отличной от ожидаемой молекулярной массой амплифицированных фрагментов. Не найдены аллели, которые были бы специфичны для ботанических подвигов. Это совпадает с данными J. Ren с соавт. (1995), которые не нашли RAPD фрагментов, позволяющих различать подвиды *B. rapa*.

Распределение образцов вида *B. rapa* в два больших кластера по результатам SSR анализа (см. рис. 1) сходно с результатами, полученными J. Zhao с соавт. (2005), S. Takuno с соавт. (2007) и S. Warwick с соавт. (2007), проанализировавшими методом AFLP коллекции Нидерландов, Китая и Канады, в которых европейские и индийские образцы в целом группируются отдельно от азиатских образцов. Однако в предшествующих исследованиях выявлялся более высокий уровень разнообразия азиатских культур по сравнению с европейскими, отсутствовало четкое разделение на подвиды, а также распределение образцов китайской капусты в несколько кластеров. В нашей работе образцы китайской капусты и гибриды с ней образовали свой подкластер, за исключением 4 образцов, распределенных в подкластер с пекинской капустой, с масличными культурами и за пределами кластеров, что подтверждает участие китайской капусты в происхождении других культур.

Два образца *var. rosularis* и *var. narinosa* группировались рядом друг с другом и вошли в подкластер китайской капусты, другой образец *var. narinosa* сгруппирован с образцом *var. purpuraria*, китайской овощной культуры, ограниченно выращиваемой в районах Пекина и Нанкина (052 и 054), что свидетельствует о близости этих форм и правомерности включения их в *ssp. chinensis*, как предложили С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001).

Образцы пекинской капусты сформировали два подкластера, что может говорить о

различном/множественном и/или гибридном происхождении этого подвида. Наши данные согласуются с результатами К.М. Song с соавт. (1988) и S. Warwick с соавт. (2007), у которых пекинская капуста также была разделена на две группы. В работе выявлены сильно отличающиеся от других сортотипы пекинской капусты Чосен и Да-цин-коу, что соответствует их морфологическим отличиям, а также близкие сортотипы. Вхождение трех образцов пекинской капусты в подкластер китайской капусты может быть связано с общим происхождением *ssp. pekinensis* и *ssp. chinensis*. Японские листовые овощи с неясным таксономическим положением, возникшие путем множественной гибридизации в районе Киото, в наших исследованиях расположены на дендрограмме в соответствии с морфологической близостью к пекинской или китайской капусте.

Два из трех образцов японской капусты *ssp. nipposinica* сформировали отдельный кластер, третий образец вошел в подкластер китайской капусты и расположен рядом с японскими листовыми овощами. Существует несколько гипотез происхождения *ssp. nipposinica*. Так, А.Н. Игнатов (2006) говорит о происхождении японской капусты из японской репы; китайские исследователи предполагают гибридизацию *B. rapa* с неизвестным видом (Сао, 1997). Отдельное положение японской капусты, выявленное в нашей работе, а также в исследованиях S. Warwick с соавт. (2007) и S. Takuno с соавт. (2007), скорее, поддерживает последнее предположение.

Группировка европейских образцов различных подвигов в один кластер в наших исследованиях подтверждает тесные взаимоотношения *ssp. rapa* и *ssp. oleifera*, как об этом сообщали по результатам морфологических исследований, RFLP, AFLP и изоферментного анализа (Синская, 1928; Prakash, Hinata, 1980; Song *et al.*, 1988; McGrath, Quiros, 1992; Takuno *et al.*, 2007; Warwick *et al.*, 2007).

S. Warwick с коллегами (2007) подтвердила отдельное положение части изученных образцов индийских масличных культур *ssp. trilocularis* и *ssp. dichotoma* от европейской сурепицы *ssp. oleifera*. При этом в отличие от упомянутых ранее исследований в работе S. Warwick с соавт. (2007) индийские культуры не связаны общим происхождением с европейской *ssp. oleifera*.

В наших исследованиях масличные культуры образовали свой большой кластер независимо от их происхождения за исключением двух образцов из Китая в кластере с азиатскими овощными культурами и двух образцов за пределами кластеров. Такое положение образцов на дендрограмме может говорить об общности их происхождения. В работе S. Takuno с соавт. (2007) масличные культуры также образуют общий кластер и не делятся на ботанические подвиды. Авторы объясняют это очень быстрой дивергенцией, предшествующей фиксации аллелей в каждом образце, что в свою очередь выражается в нарушении ожидаемого положения образцов на дендрограмме.

С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001) считают, что китайская растительная форма двойного использования *var. chinoleifera* (по классификации китайских ботаников *ssp. chinensis var. utilis* Tsen et Lee) (Tsen, Lee, 1942) близка индийским масличным. Китайские исследователи (He *et al.*, 2003) считают, что первым типом *B. rapa* (*syn. campestris*) на территории Китая был зимний масличный тип, который дал начало весеннему типу и позже овощным полужимним формам. Таким образом, расположение большинства китайских масличных культур среди образцов евразийской группы, а двух из них среди образцов восточноазиатского происхождения вполне ожидаемо. В исследованиях S. Takuno с соавт. (2007) также образцы *ssp. rapa* и *ssp. oleifera* из Восточной Азии были близки азиатским листовым овощным.

Два диких/сорных образца *ssp. sylvestris* независимо от их происхождения (Италия и Перу) расположены на дендрограмме среди образцов *ssp. oleifera*, подтверждая мнение С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001) о невозможности отделить их от масличной сурепицы. Также представляется трудным отделить дикие от сегетальных и рудеральных форм, так что вопрос о положении *ssp. sylvestris*, по нашему мнению, по-прежнему остается открытым.

Распределение образцов корнеплодной репы между кластерами, по-видимому, свидетельствует об их высокой вариабельности. Следует отметить, что местный образец северокитайской репы (к-163, на дендрограмме 058) находится в одном кластере с пекинской капустой, что может косвенно свидетельствовать о происхождении

пекинской капусты от подобной репы. Образец репы Карельская (к-738, Россия) выделился наличием редких аллелей в электрофоретическом спектре и занял позицию out-group. Е.Н. Синская (1928) писала про образцы репы этого сортотипа, что это «заходящая форма», занимающая промежуточное положение между географическими группами, которая по признакам корня принадлежит к западноевропейской группе сортотипов (по Синской (1928), разновидностей), а по признакам листьев – к русской. Видимо, этим и объясняется отдельное положение образца.

Таким образом, использование SSR анализа позволило разделить изученную коллекцию вида *B. rapa* ВИР на внутривидовые группы, в основном соответствующие эволюционному развитию вида и в отношении филогенетического положения восточноазиатских культур, – последней ботанической классификации С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001). Использованный в работе набор микросателлитных маркеров может быть эффективен для дифференциации образцов восточноазиатских овощных культур.

Работа выполнена в рамках российско-немецкого проекта 1/07 «Использование молекулярных маркеров для оценки генетических ресурсов растений».

### Литература

- Артемьева А.М. Листовые овощные растения вида *Brassica rapa* L. // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1999. Т. 157. С. 55–66.
- Артемьева А.М. Экологическая дифференциация капусты пекинской *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson // Генетические коллекции овощных растений: Сб. статей. СПб, 2001. Ч. 3. С. 148–166.
- Артемьева А.М. Доноры и источники для селекции листовых овощных культур вида *Brassica rapa* L. (Пекинская, китайская и японская капусты, листовая репа) // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб, 2004. Вып. 740. 132 с.
- Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 358–365.
- Игнатов А.Н. Генетическое разнообразие фитопатогенных ксантомонад вида *Xanthomonas campestris* и устойчивость к ним растений семейства Brassicaceae: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006. 350 с.
- Синская Е.Н. Масличные и корнеплоды семейства Cruciferae // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1928. Т. 19. Вып. 3. 648 с.
- Синская Е.Н. Историческая география культурной флоры. Л.: Наука, 1969. 480 с.
- Шебалина М.А. Репа, турнепс и брюква. Л.: Колос, 1974. 352 с.
- Шебалина М.А., Сазонова Л.В. Корнеплодные растения. Культурная флора СССР. Л.: Колос, 1985. 325 с.
- Bailey L.H. The cultivated Brassicas // Genets Herbarum. 1940. V. 4. № 9. P. 319–330.
- Cao J., Cao S., Miao Y., Lu G. Cladistic operational analysis and study on the evolution of chinese cabbage groups (*B. campestris* L.) // Acta Horticulturae Sinica. 1997. V. 24. № 1. P. 35–42.
- He Y.T., Chen B.Y., Fu T.D. et al. Origin and evolution of *Brassica campestris* L. in China // Acta Genetica Sinica. 2003. V. 30. № 11. P. 1003–1012.
- Gladis T.H., Hammer K. Die Gaterslebener *Brassica*-Kollektion – *Brassica juncea*, *B. napus*, *B. nigra* und *B. rapa* // Feddes Reportium. 1992. V. 103. P. 469–507.
- Gomez-Campo C., Prakash S. Origin and domestication // Biology of *Brassica* coenospecies / Ed. C. Gomez-Campo. Amsterdam-Lausanne-New-York-Shannon-Singapore-Tokyo: Elsevier Press, 1999. P. 33–58.
- Hanelt P. *Cruciferae* // Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen) / Ed. J. Schultze-Motel. Berlin: Akademie-Verlag, 1986. P. 272–332.
- Li C.W. The origin, evolution, taxonomy and hybridization of Chinese cabbage // Chinese cabbage. Proc. 1st Intern. AVRDS Symposium. Taiwan, 1981. 1982. P. 3–10.
- Ling A.E., Kaur J., Burgess B. et al. Characterization of simple sequence repeat markers derived in silico from *Brassica rapa* bacterial artificial chromosome sequences and their application in *Brassica napus* // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. P. 273–277.
- McGrath J.M., Quiros C.F. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin // Theor. Appl. Genet. 1992. V. 83. P. 783–790.
- Olsson G. Crosses within the campestris group of the genus *Brassica* // Hereditas. 1954. V. 40. P. 398–418.
- Prakash S., Hinata K. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop *Brassica*, a review // Opera Bot. 1980. V. 55. P. 1–57.
- Reiner H., Holzner W., Ebermann R. The development of turnip-rape *Brassica rapa* crops from the wild type in Europe – an overview of botanical, historical and linguistic facts // Rapeseed today and tomorrow. 9th Intern. Rapeseed Congress (Cambridge. UK. 4–7 July 1995). 1995. V. 4. P. 1066–1069.

- Ren J., McFerson J.R., Li R. *et al.* Identities and relationships among Chinese vegetable brassicas as determined by Random Amplified Polymorphic DNA markers // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1995. V. 120. P. 548–555.
- 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.
- Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* syn. *campestris* // *Theor. Appl. Genet.* 1990. V. 79. № 4. P. 497–506.
- Specht C.E., Diederichsen A. *Brassica* // *Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops* / Ed. P. Hanelt. Berlin: Springer-Verlag, 2001. V. 3. P. 1435–1465.
- Takuno S., Kawahara T., Ohnishi O. Phylogenetic relationships among cultivated types of *Brassica rapa* L. em. Metzg. As revealed by AFLP analysis // *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2007. V. 54. P. 279–285.
- Toxopeus H., Tamagishi H., Oost E.N. A cultivar group classification of *Brassica rapa* L., update 1987 // *Eucarpia Cruciferae Newslett.* 1987. V. 12. P. 5–6.
- Tsen M., Lee S.H. A preliminary study of Chinese cultivated brassicas // *Hortus Sinicus Bull.* 1942. V. 2. P. 1–32.
- Warwick S.I., James T., Falk K.C. AFLP-based molecular characterization of *Brassica rapa* and diversity in Canadian spring turnip rape cultivars // *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2007. V. 6. № 1. P. 11–21.
- 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.

## GENETIC DIVERSITY AND INTRASPECIFIC PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *BRASSICA RAPA* L. SPECIES CROPS BASED ON MICROSATELLITE ANALYSIS

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

<sup>1</sup> N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Industry, St.-Petersburg, Russia, e-mail: akme11@yandex.ru;

<sup>2</sup> Institute for Breeding research on Horticultural and Fruit Crops of JKI, Quedlinburg, Germany

### Summary

Genetic diversity and phylogenetic relationships of *Brassica rapa* L. were studied by the use of 96 accessions from the core collection of N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Industry and 10 new SSR primer pairs. 61 molecular (SSR) markers permitted to construct the UPGMA dendrogram where two main clusters were determined: the first cluster included generally leafy vegetable crops from East Asia, the second one – the turnip and all oilseed crops. The vegetable accessions were clustered in two clusters of Chinese cabbage and separate clusters of pak-choi and mizuna. Japanese leafy vegetables and hybrids between different subspecies were clustered together with morphologically close and genealogically related accessions. The use of SSR primers did not permit to isolate different botanic subspecies of the turnip and oilseed crops. However use of the microsatellite markers studied may be fruitful in breeding programs for differentiation of leafy *B. rapa* vegetables for search of genetically different genotypes.