

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ *САСТА* ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ВНУТРИ ВИДА *BRASSICA RAPA* L.

А.М. Артемьева¹, Х. Будан², Э. Клоке², Ю.В. Чесноков¹

¹ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия, e-mail: akme11@yandex.ru; yu.chesnokov@vir.nw.ru;

² Институт селекционных исследований садовых и овощных культур, Quedlinburg, Germany, e-mail: holger.budahn@jki.bund.de; evelyn.klocke@jki.bund.de

В дополнение к проведенному ранее изучению генетического разнообразия и внутривидовых отношений *Brassica rapa* L. методом анализа микросателлитов (Артемьева и др., 2008; Zhao *et al.*, 2010) для уточнения внутривидовых филогенетических связей в этом виде впервые были использованы мобильные генетические элементы (МГЭ) II класса. Материалом исследований послужила стержневая коллекция вида, хранящаяся в ВИР (96 образцов). Применение 12 пар S-SAP-праймеров дало возможность найти 123 полиморфных маркера. Выяснено, что использование в качестве маркеров МГЭ позволяет разделить культуры вида на два основных кластера – восточноазиатских овощных и индоевропейско-азиатских масличных и корнеплодных культур, а первый кластер – на подкластеры пекинской и китайской капусты, что соответствует ботаническому делению и результатам анализа микросателлитов. Ценным дополнением к предшествующему анализу явилось разделение пекинской капусты на группы, в том числе выделение ее кочанных форм, уточнение положения формы Хирошимана, японской капусты, а также разделение масличных культур во втором кластере по географическому происхождению. Однако использование 149 SSR-маркеров и 123 S-SAP-маркеров для построения SAHN-дендрограммы позволило получить более точное положение каждого изученного образца в системе вида. В этом случае лишь несколько хорошо морфологически отличимых образцов европейской корнеплодной репы оказались дисперсно распределены между образцами второго кластера; в то время как половина образцов репы сформировала отдельную группу в пределах непальско-индийского подкластера. Возможно, это наиболее древние формы, близкие первой доместцированной центральноазиатской форме вида.

Ключевые слова: *Brassica rapa* L., ДНК-маркеры, филогения, мобильные генетические элементы (МГЭ), *САСТА*, S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism), микросателлиты (SSR).

Введение

Вид *Brassica rapa* L. ($n = 10$, геном AA) включает экономически важные масличные, овощные и кормовые культуры, листовые и корнеплодные и широко распространен на земном шаре. В этой связи генетическое разнообразие и филогенетические взаимоотношения внутри вида всегда являлись предметом интенсивного изучения различными методами, в том числе и методами молекулярного анализа ДНК, и чаще всего проводились на материале коллекций генетических ресурсов различных стран (Song *et al.*, 1988, 1990; Zhao *et al.*, 2005, 2010; Ling *et al.*,

2007; Takuno *et al.*, 2007; Warwick *et al.*, 2007; Артемьева и др., 2008). В проведенных исследованиях выявлена тенденция к группировке проанализированных образцов в соответствии с их географическим происхождением в европейскую, индийскую (чаще одну евразийскую) и восточноазиатскую группы.

Известно, что повторяющиеся ДНК-мотивы представляют значительную часть эукариотического генома; они составляют как минимум 50 % генома человека (HIGSC, 2001), а у некоторых растений они могут составлять 80 % генома (Meyers *et al.*, 2001; Vicient *et al.*, 2001). Повторяющиеся последовательности разделены

на две большие группы: tandemные повторы, которые образуют большие блоки в геноме, в том числе сателлиты различной длины, и дисперсно распределенные повторы, которые включают мобильные генетические элементы (МГЭ) (Heslop-Harrison, 2000). На основе наличия или отсутствия промежуточной РНК транспозиции МГЭ подразделяют на два класса. МГЭ I класса объединяют ретротранспозоны, которые используют обратную транскриптазу для перевода РНК-матрицы в ДНК. МГЭ II класса – транспозоны, осуществляют транспозицию без посредника – напрямую от ДНК к ДНК.

Сравнительный анализ, проведенный с привлечением методов биоинформатики, показал, что геномы модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. и капусты огородной *Brassica oleracea* L. ($n = 9$, геном CC), от которого произошел вид *B. rapa*, несут одни и те же мобильные элементы, хотя и в разных соотношениях, вызванных в том числе различиями в размере генома (Zhang, Wessler, 2004). Этот результат находится в соответствии с высоким уровнем геномного консерватизма между двумя видами, дивергировавшими 15–20 млн лет назад (Yang *et al.*, 1999).

Несмотря на то что полностью секвенированный геном *Arabidopsis* несет все известные типы мобильных элементов (AGI, 2000), до сих пор только очень малая часть мобильных элементов *Brassica* была изучена на молекулярном уровне, при этом главным объектом изучения были МГЭ I класса. Полученные нами и нашими молдавскими коллегами результаты свидетельствуют о наличии последовательностей МГЭ II класса *Ac*, *MuDR*, *CACTA* и *Far1* в геномах шести видов рода *Brassica* (Соловьева и др., 2009). Ранее было установлено, что в геноме *B. oleracea* среди МГЭ II класса наиболее широко распространены элементы *CACTA* (Zhang, Wessler, 2004). Термин *CACTA* относится к элементам с инвертированными концевыми повторами (TIR, Terminal Inverted Repeats) длиной обычно 10–28 п.н., которые заканчиваются консервативным мотивом 5'-*CACTA*-3', при этом внутренние последовательности элементов *CACTA* высоковариабельны.

В настоящее время предполагается, что повторяющиеся элементы, особенно МГЭ, являются одной из главных движущих сил геномной

и генной эволюции (Bennetzen, 2005; Hawkins *et al.*, 2006). В роде *Brassica* *CACTA*-транспозон *Bot1* прошел несколько раундов амплификации только в геноме *B. oleracea* в отличие от генома *B. rapa*, что сыграло главную роль в недавней дивергенции двух геномов (Alix *et al.*, 2008). Этими же авторами был установлен С-геном-специфичный сегмент *Bot1*. В геномах *B. rapa* и *B. napus* (ААСС) они обнаружили присутствие *Bot1*-подобных *CACTA*-элементов, идентифицировали их размер и TIR-последовательности.

Целью нашей работы было посредством S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) анализа установить, насколько *Bot1*-подобные *CACTA*-элементы широко распространены в геноме *B. rapa*, могут ли созданные на основе их последовательностей специфичные маркеры быть использованы для уточнения внутривидовой классификации *B. rapa*, какова эффективность совместного использования двух типов молекулярных маркеров, созданных на основе различных групп повторяющихся последовательностей ДНК – tandemно организованных микросателлитов и дисперсно покрывающих геном мобильных элементов *CACTA* – для филогенетических построений у вида *B. rapa*.

Материалы и методы

Растительный материал

Стержневая коллекция, отражающая ботаническое разнообразие вида *Brassica rapa*, включала 96 местных и старых селекционных образцов различного происхождения. Образцы коллекции имеют различный статус: дикие, примитивные, местные, селекционные, и т. д. К старым относятся образцы, созданные приблизительно до 1960-х гг.). Коллекция включала листовые восточноазиатские капусты: пекинскую, китайскую, розеточную, пурпурную, японскую; листовую репу, а также гибриды между подвидами листовых форм, корнеплодную репу, масличные культуры включая дикую/сорную *ssp. sylvestris*, индийские масличные культуры торию, коричневый и желтый сарсон, озимую и яровую сурепицу (табл. 1). Таксономическое деление дано по С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001) за исключением выде-

Таблица 1

Список проанализированных образцов вида *Brassica rapa* L.

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на дендро- грамме и элект- рофореграмме	Название образца	Происхож- дение
<i>ssp. pekinensis</i> (Lour.) Hanelt	Дунганская	139	001	Дунганская	Казахстан
	Сяо	53	008	Местный	Казахстан
		74	009	Сяо-бай-коу	Китай
		89	010	Доу-образная раннеспелая	Китай
	Чиримен	100	011	Hikoshima spring	Япония
		Нагасаки	238	007	Nagoya Market
	Шантунг	58	012	Би-це	Киргизия
		210	013	Kiriba Santo	Япония
		108	014	Местный	Китай
	Касин	132	017	Kasin	Япония
		247	018	Хасинбечу	Корея
	Чосен	122	020	Лен-син-дзон	Китай
		207	021	Chosen	Япония
	Айти	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	Цужита	Япония
198		041	Местный	Китай	
<i>ssp. chinensis</i> (L.) Hanelt	Пиорбай	75	042	Пиорбай	Китай
	Сьюсман	77	043	Сьюсман	Китай
		Вр.930	044	Майская 8	Китай
	Тайсай	46	045	Тай-на	Россия
		106	046	Янцай	Китай
		214	047	Nicanme Jukijiro Taisai	Япония
	Ю-тсай (var.utilis)	195	048	Местный	Китай
203	049	Ching Pang Ju Tsai	Китай		
<i>var. rosularis</i> (Tsen and Lee) Hanelt	Та-гу-цай	84	050	Хэе-ю-та-цай	Китай
		129	051	Та-гу-цай	Китай
<i>var. narinosa</i> (Bailey) Hanelt	Хризантемум	154	052	Chrysanthemum heart	Китай
		213	053	Vitamin na	Япония

Продолжение таблицы 1

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на дендро- грамме и элект- рофореграмме	Название образца	Происхож- дение
<i>var. purpuraria</i> (Bailey) Bailey		391	054	Xing Yang	Китай
<i>ssp. nipposinica</i> (Bailey) Hanelt	Мибуна	115	055	Mibuna	Япония
	Мизуна	159	056	Mizuna	Япония
		241	057	Shiroguki Kyona	Япония
<i>ssp. rapa</i> L. f. <i>Komatsuna</i>	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
	Хирошимана	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.	Китайский	163	058	Местный	Китай
	Остерзундомский	307	097	Остерзундомский	Россия
	Бортфельдский	385	098	Бортфельдский	Украина
	Карельская	738	099	Карельская	Россия
	Грбовская	821	100	Грбовская	Россия
	Миланская белая	826	101	Миланская белая	Россия
	Петровская	830	102	Петровская	Россия
	Тельговский	894	103	Тельговская	Германия
	Норфолькский фиолетовоголовый	984	104	Норфолькский	Франция
	Вольнский	1050	105	Вольнский	Украина
Золотой шар	1283	106	Золотой шар	Нидерланды	
<i>ssp. oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i>		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
		108	076	Arlo	Швеция
		114	077	Local (tetraploid)	Пакистан
		163	081	LGL	Пакистан
		192	085	Mustard	Непал
		248	088	Local	Испания

Окончание таблицы 1

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на дендро- грамме и элект- рофореграмме	Название образца	Происхож- дение
<i>ssp. oleifera</i> (DC.) Metzger <i>f. annua</i>		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 <i>f. biennis</i>		166	082	Root mustard	Тунис
		337	093	U-zai-zsi	Китай
<i>ssp. dichotoma</i> (Roxb.) Hanelt		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		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		176	084		Италия
		218	087	Nabo silvestre	Перу

ления *ssp. sylvestris* (Lam.) Janchen в отдельный от *ssp. oleifera* подвид.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из молодых листьев по методике Д.Б. Дорохова и Э. Клоке (1997). Для гетерогенного (bulk)-анализа ДНК использовали 5 растений каждого образца.

S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) анализ ДНК

Для анализа ДНК использовали стандартный метод AFLP. S-SAP анализ проводили согласно методике R. Waugh с соавт. (1997). При этом в качестве САСТА-специфичных праймеров использовали праймеры, созданные на основе TIR длиной 17 и 19 п.н., описанных в статье К. Alix и др. (2008): ВоВ029L16 5'-(САСТАСААГАААААСАГС)-3' и часть ВоВ048N13 5'-(САСТАСААГАААААСАГСГА)-3'. Для селективной амплификации использовали Mse-CAC, Mse-CAT+CAG, Mse-CCG, Mse-CCT,

Mse-CGT, Eco-ACA, которые были выбраны в предварительных тестовых испытаниях.

Электрофорез проводили в 8 %-м ПААГ с помощью автоматизированного секвенатора Li-Cor 4200 (Biosciences, Линкольн, Небраска, США), гель-документацию полученных данных выполняли с помощью программы GeneIR, предназначенной для Li-Cor. Визуализация геля проводилась в IR700 и IR800, что позволяло использовать при электрофорезе один гель для двух комбинаций праймеров.

SSR (Simple Sequence Repeats) анализ ДНК

Для SSR-анализа ДНК использовали 21 олигонуклеотидную пару sss праймеров и один BrFLCI специфичный CAPS, созданные различными авторами (www.brassica.info) и отобранные для определения полиморфизма среди образцов *B. rapa* научно-исследовательской группой селекции растений Университета Вагенингена, Нидерланды (Артемяева и др., 2008; Zhao *et al.*, 2010). Выбранные праймеры продуцировали маркеры, находящиеся во всех 10 хромосомах

вида, т. е. обеспечивали хорошее покрытие генома.

ПЦР проводили в смеси объемом 12,5 µl: 10 × инкубационный буфер (1,25 µl), 0,25 µl каждого dNTP (10 mM), по 0,25 µl каждого праймера (10 pmol/µl), 0,1 µl Taq ДНК-полимеразы (5 U/µl) (Qbiogene, Германия) и 20 ng геномной ДНК.

Аmplификацию осуществляли в ДНК-амплификаторе (BioRad, Германия), запрограммированном на 43 цикла: 1-й цикл – первичная денатурация при 94 °C 3 мин, 2-й цикл – денатурация при 94 °C 1 мин, отжиг праймеров при использовании touch-down (ступенчатое понижение температуры) с 65 °C до 56 °C по 1 мин. Температуру понижали на 1 °C каждый цикл до достижения финальной температуры отжига 56 °C. Элонгацию проводили при 72 °C 1,5 мин (10 циклов). 3-й цикл – при 94 °C 1 мин, отжиг при 55 °C 1 мин (30 циклов), конечное расширение при 72 °C 5 мин.

Обработка экспериментальных данных

При оценке полученных полиморфных ПЦР-фрагментов использовали бинарную матрицу: (1) в присутствии и (0) при отсутствии соответствующего ампликона.

Расчет генетической дистанции выполняли с помощью NTSYSpc, кластерный анализ – методами UPGMA с использованием программы TREECON для Windows (версия 1.36), NJ (Neighbor Joining) и SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested Clustering).

Результаты

Впервые коллекция *B. rapa* (табл. 1) была проанализирована методом S-SAP с использованием праймеров, специфичных к МГЭ САСТА. В связи с тем что для обработки методики и учета повторяемости и воспроизводимости результатов каждый образец коллекции был представлен двумя повторностями, для построения матрицы отбирались фрагменты, встречающиеся в обеих повторностях (25 % полос были различны в двух повторностях). Также были учтены только хорошо различимые фрагменты, свойственные более чем двум об-

разцам, что, возможно, могло привести к потере некоторых очень редких аллелей.

Проведенное изучение показало достаточно высокий уровень полиморфизма между членами вида: с 12 парами праймеров наблюдали 123 полиморфных S-SAP-фрагмента. При этом все пары праймеров обеспечили проведение нормальной амплификации. В комбинациях с праймером BoB029L16 количество полиморфных фрагментов было соответственно 9, 14, 11, 17, 15, 6 (в среднем 12 аллелей на праймер), а в комбинациях с BoB048N13 – 12, 10, 3, 9, 9, 8 (в среднем 8,5 аллелей на праймер) (примеры см. на рис. 1).

На рис. 2 представлена SAHN-дендрограмма, построенная по результатам S-SAP анализа МГЭ САСТА. Образцы на дендрограмме сгруппированы в два больших кластера: восточноазиатских капустных культур и масличных культур и корнеплодной репы, коэффициент подобия между кластерами 0,59.

Кластер восточноазиатских овощей, в свою очередь, разделен на подкластеры пекинской и китайской капуст, при этом образцы розеточной и пурпурной капусты (*rosularis*, *narinosa* и *purpuraria*) (50, 51, 52, 53, 54 на дендрограмме) образуют отдельную группу внутри подкластера китайской капусты вместе с родственным образцом сорто типа Ю-тсай (49). Два образца японской капусты из трех расположены рядом между подкластерами пекинской и китайской капуст так же, как и японские листовые овощи Мана (2) и Хирошимана (11). За пределами подкластеров находятся несколько образцов пекинской и китайской капуст, а также образцы японских овощей Сирана (4) и Хирошимана (5). В кластер розеточной капусты попал образец коричневого сарсона из Индии (79), а два образца пекинской капусты находятся среди образцов китайской (14 и 33).

Во втором большом кластере на дендрограмме расположены образцы масличных культур вида *ssp. oleifera*, *dichotoma*, *trilocularis*, дикой *ssp. sylvestris*, а также образцы корнеплодной репы, при этом образец европейской репы сорто типа Грбовская (100 на дендрограмме) занимает в этом кластере позицию внешней группы с коэффициентом подобия 0,60. Кластер разделен на два подкластера: в первом подкластере находятся масличные культуры, ведущие

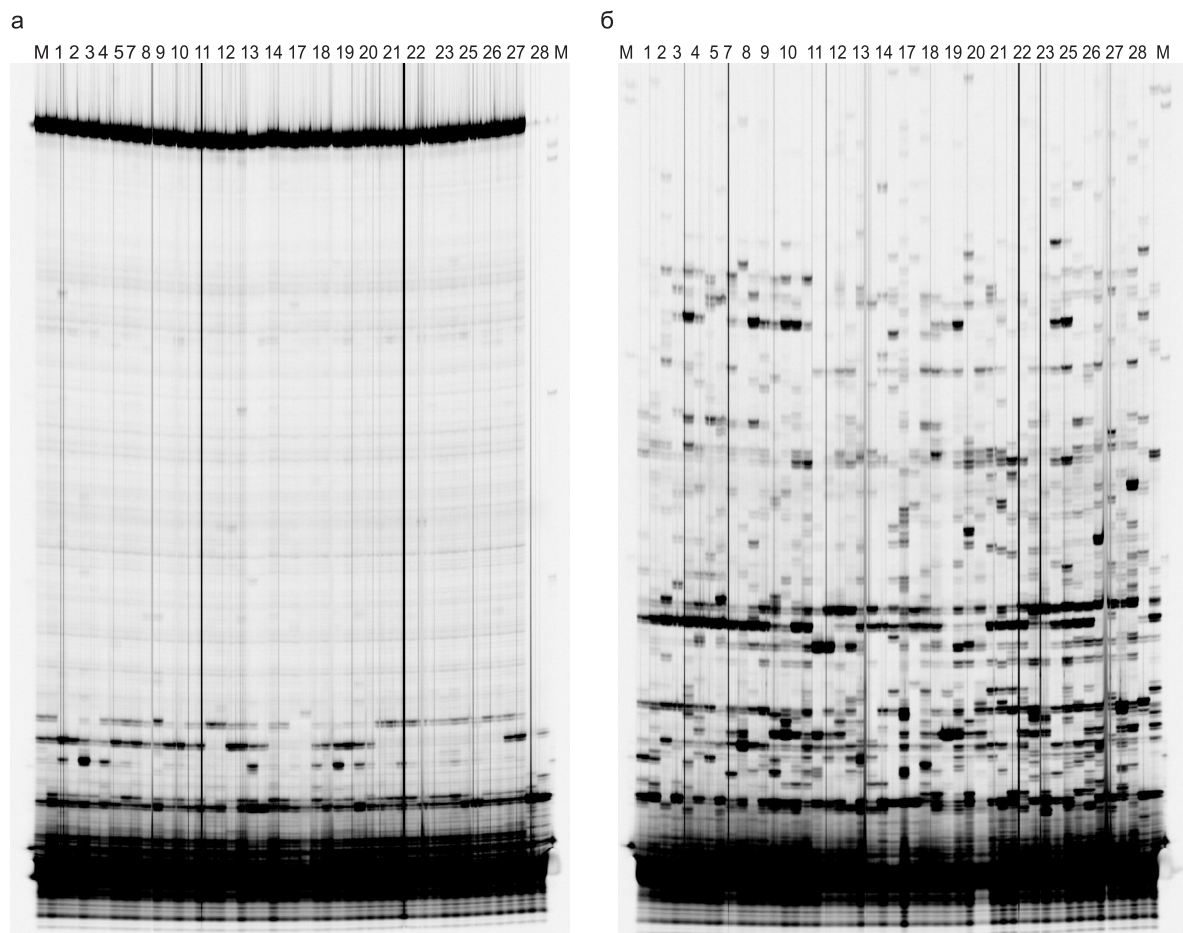


Рис. 1. Пример электрофореграмм, полученных с *BoB048N13+Mse* CCG (19 п.н. (а) и с *BoB029L16+Mse* CAC (17 пн) (б).

M – маркер молекулярной массы; 1–5, 7–14, 17–23 и 25–28 – образцы коллекции. Каждый образец представлен на двух дорожках. Нумерация, название и ботаническая принадлежность даны в табл. 1.

происхождение преимущественно из Непала и Пакистана, а во втором – из Индии и Китая. В первый подкластер вошли также масличные из Швеции, Италии, Перу, Танзании. Образцы корнеплодной репы не образовали отдельного кластера, но 5 образцов из 11 образуют группу, будучи расположенными в первом подкластере, остальные образцы корнеплодной репы оказались распределены между подкластерами. Также в этом кластере находятся образцы листовой репы Комацуна и Куроха (59, 60, 61) и стабильные гибриды между подвидами (63, 64, 65, 66). В кластер попали один образец китайской капусты, два образца пекинской капусты и образец Хирошимана (7).

На рис. 3 приведена дендрограмма, построенная с учетом SSR- и S-SAP-маркеров. На

дендрограмме также отражены два больших кластера: восточноазиатских овощных культур и масличных культур и репы; за пределами кластеров находится оригинальный образец пекинской капусты Michihli (36) из Канады, а образец, ранее описанный как репа Карельская (99), находится в положении внешней группы с коэффициентом подобия 0,65.

Кластер восточноазиатских капуст разделен на подкластеры пекинской и китайской капуст, а два образца китайской капусты группируются отдельно (47 и 48), но примыкают к китайской капусте. Среди пекинской капусты отдельно сгруппированы, как и при S-SAP-анализе, сорта Дунганская (1) и сорта сортотипа Касин (17 и 18), к ним примыкают листовые японские овощи Мана (2) и Сирона (4). Типично кочанные сорта

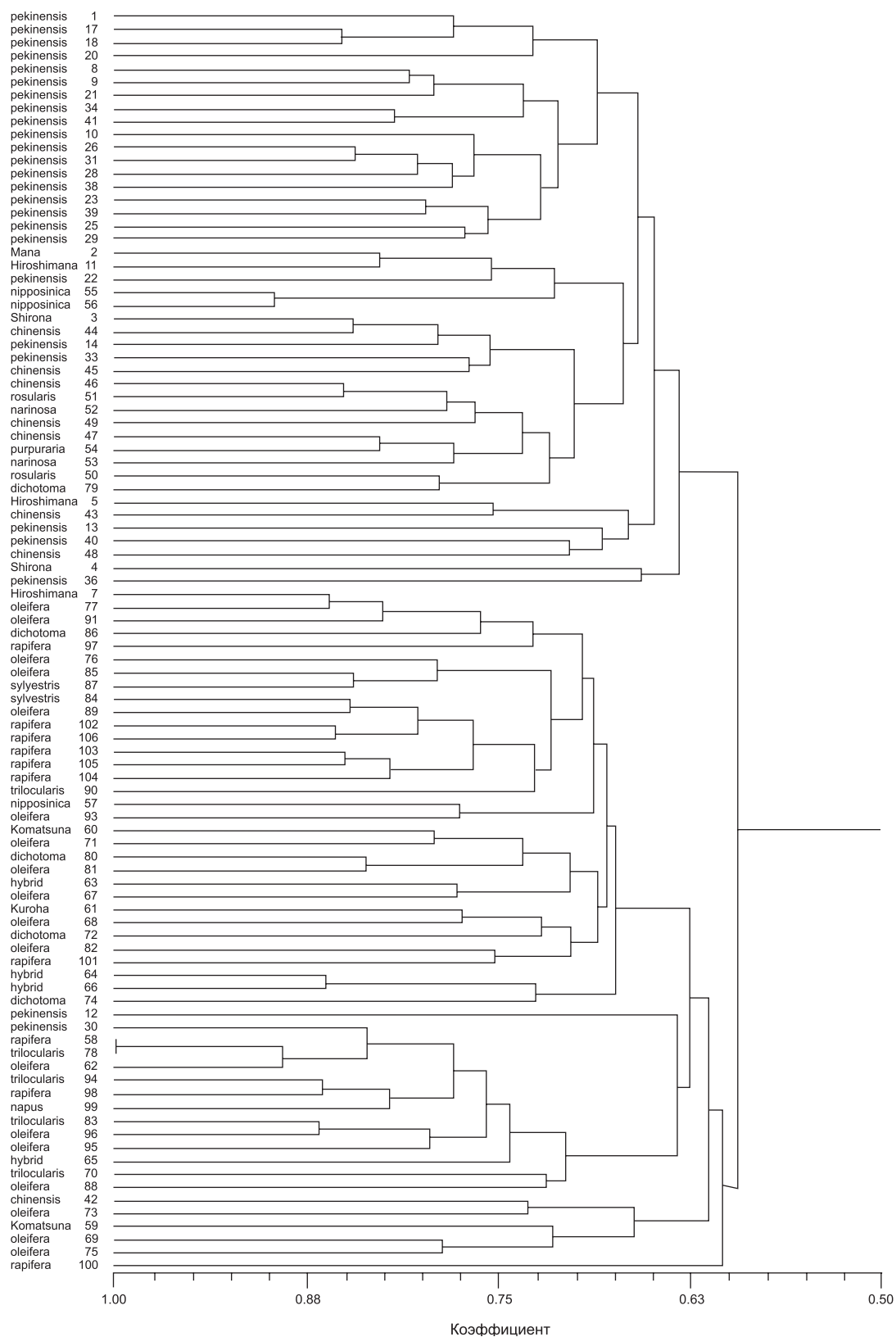


Рис. 2. SAHN-дендрограмма, построенная с использованием S-SAP-маркеров.

Расчет генетической дистанции с использованием бинарной матрицы был проведен с помощью NTSYSpc. Названия подвидов, соответствующие кластерам и подкластерам, приведены слева от дендрограммы.

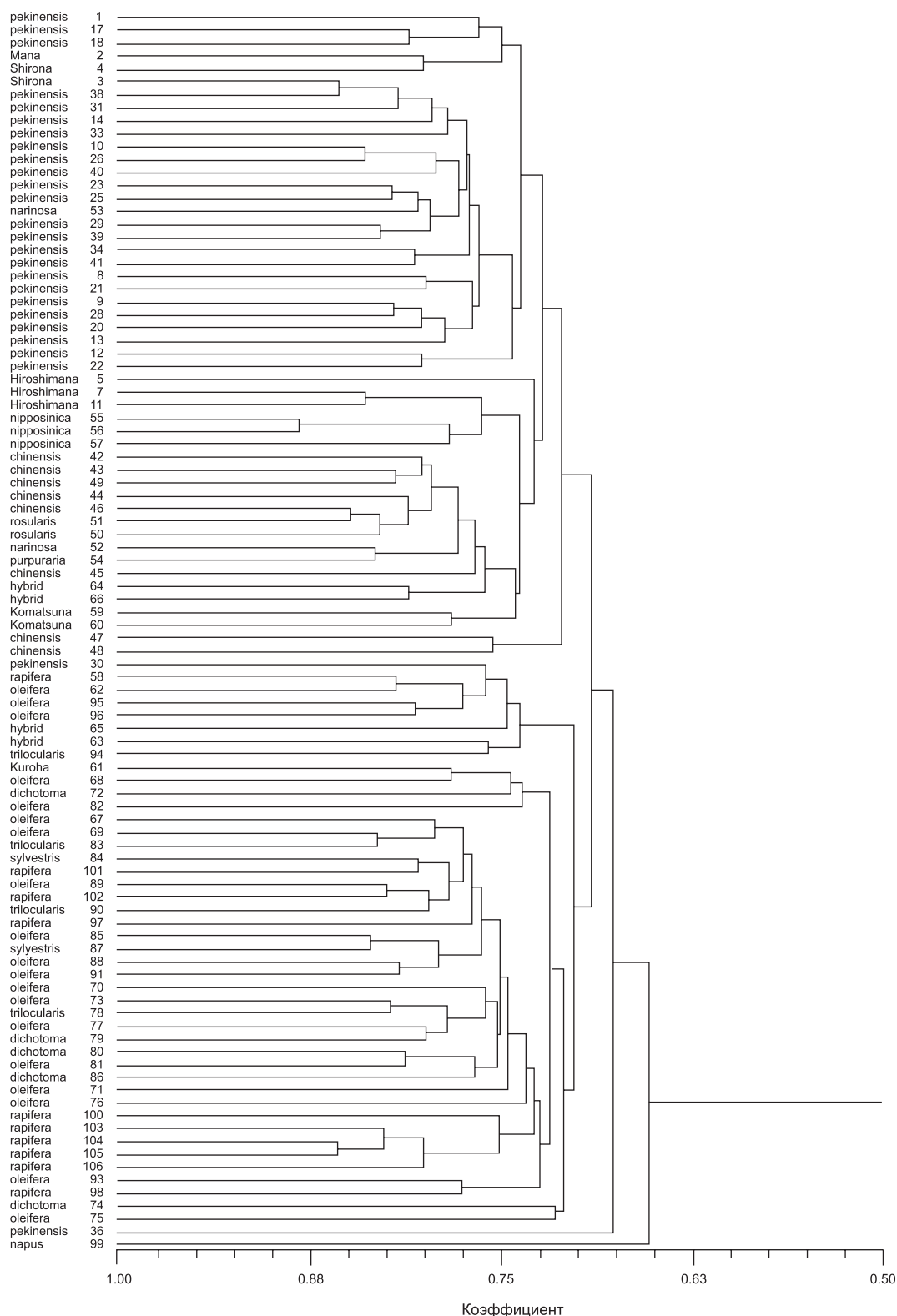


Рис. 3. SAHN-дендрограмма, построенная с использованием SSR- и S-SAP-маркеров.

Расчет генетической дистанции с использованием бинарной матрицы был проведен с помощью NTSYSpc. Названия подвидов, соответствующие кластерам и подкластерам, приведены слева от дендрограммы.

и полукочанные/кочанные с открытой вершиной образуют соответственно вторую и третью близкие группы, независимо от страны, из которой они поступили в коллекцию. Четвертая группа представлена двумя образцами различных сортоформ из Киргизии и Китая (12 и 22).

Подкластер китайской капусты включает следующие группы: Хирошимана (5, 7, 11), японскую капусту (55, 56, 57), большую группу, включающую рядом расположенные близкие образцы типично китайской капусты (42, 43, 44, 46, 49), розеточную и пурпурную капусты (50, 51, 52, 54), листовую репу Комацуна (59, 60), стабильные гибриды между подвидами китайской и розеточной капуст (64) и китайской капустой и листовой репой (66).

Индоевропейско-азиатские масличные культуры, независимо от ботанического подвида, и корнеплодная репа так же, как и в предыдущих наших исследованиях, сформировали один большой кластер. Масличные культуры китайского происхождения расположены за одним исключением в двух небольших отдельных подкластерах рядом со стабильными листовыми гибридами (63 и 65). В третьем большом подкластере находятся масличные Непала, Пакистана и Индии, а также все образцы европейской репы за исключением китайского местного образца (58) в первом подкластере. Пять образцов репы сформировали группу близких образцов (100, 103, 104, 105, 106); еще один образец репы находится рядом с ними и образцом озимой сурепицы (98). В кластер попал образец пекинской капусты Хоторен (30).

Обсуждение

Полиморфные SSR- и CAPS-локусы, выбранные для создания праймеров в настоящей работе, представляли генетические локусы всех 10 групп сцепления, т. е. обеспечивают хорошее покрытие генома *B. rapa*.

При использовании *САСТА ВоВ029L16* (17 п.н.) мы получили очень большое число S-SAP-фрагментов разной интенсивности, в том числе единичных, и не представлялось возможным учесть на фореграмме все полосы, продуцируемые изучаемым праймером. В то же время более специфичный *ВоВ048N13* (19 п.н.) продуцировал менее многочисленные хорошо

организованные фрагменты (рис. 1). 20 % найденных S-SAP-фрагментов были свойственны всем изученным образцам, возможно, они являются видоспецифичными.

SAHN-метод кластеризации образцов показал результаты, наилучшим образом согласующиеся с ботаническим делением.

Филогенетическая картина, полученная при использовании в качестве маркеров концевых мотивов последовательностей МГЭ, хотя включает несколько несовпадающих с классической (традиционной) ботанической точки зрения положений, однако вносит ряд существенных поправок в результаты анализа микросателлитов. В первом большом кластере это касается, прежде всего, четкого положения всех образцов розеточной и пурпурной капуст внутри подкластера китайской капусты. Также отдельно оказались сгруппированы образцы пекинской капусты сортоформ Дунганская из Казахстана (001) и Касин и Чосен (017, 018, 020), кочанные с открытой вершиной, ведущие происхождение из Кореи, и это объединение представляется совершенно оправданным.

Во второй большой индоевропейский кластер масличных культур и корнеплодной репы попали образцы Хирошимана, листовой репы и листовые сложные гибриды восточноазиатского происхождения, что справедливо подтверждает происхождение листовых реп от корнеплодных, а также участие масличных форм в гибридизации при становлении конкретного образца и типа. Наметившееся в результате использования маркеров, разработанных на основе мотивов последовательностей МГЭ, хотя и не во всех случаях, разделение масличных культур по географическому происхождению – Непал и Пакистан, с одной стороны, и Индия и Китай – с другой, также является важным дополнением в обоснованную дифференциацию образцов вида.

При использовании двух типов молекулярных маркеров расположение ветвей дендрограммы явилось самым точным с традиционной ботанической точки зрения (рис. 3). Образец внешней группы был таковым и в случае использования SSR маркеров. Этот образец был привлечен в стержневую коллекцию как репа Карельская, но морфологический анализ подтвердил выводы анализа ДНК: видимо, при ре-

продуцировании была допущена ошибка, и этот образец – брюква *B. napus* L. ssp. *rapifera* Metzg. Образец пекинской капусты с цилиндрическим кочаном Michihli (36) из Канады при S-SAP-анализе был в кластере восточноазиатских овощных, хотя и не в группе пекинской капусты, а за пределами подкластеров. При использовании всех маркеров он остался за пределами обоих больших кластеров как второй образец внешней группы с коэффициентом подобия 0,67.

В нашей предшествующей работе при использовании анализа микросателлитов (Артемьева и др., 2008) так же, как и в работах Song с соавт. (1988) и Warwick с соавт. (2007), образцы пекинской капусты были разделены на две группы. В настоящем анализе внутри подкластера пекинской капусты выделены четыре группы. Объединение сортов Дунганская, Касин и двух морфологически близких Дунганской японских овощных, имеющих гибридное происхождение (первая группа), говорит, скорее, о родственности происхождения с участием «сильного» компонента репы. Выделение хорошо различимой группы преимущественно кочанных сортов, видимо, позволит найти маркеры, связанные с генными локусами, ответственными за формирование кочана. Выявленное разделение пекинской капусты на четыре группы представляется очень интересным и, по нашему мнению, говорит о множественном и гибридном происхождении пекинской капусты.

В предшествующих исследованиях (Zhao *et al.*, 2005; Takuno *et al.*, 2007; Warwick *et al.*, 2007) образцы китайской капусты распались на несколько кластеров. В наших работах при анализе микросателлитов образцы китайской капусты и гибриды с ней образовали один подкластер за исключением четырех образцов (Артемьева и др., 2008; Zhao *et al.*, 2010). В настоящем исследовании все образцы китайской капусты вошли в один подкластер. Существование группы розеточной и пурпурной капусты внутри кластера китайской капусты свидетельствует о близости этих форм и правомерности включения их в ssp. *chinensis* на правах разновидностей var. *rosularis*, var. *narinosa*, var. *purpuraria*, как предложили С.Е. Specht и А. Diederichsen (2001).

Японские образцы Hikoshima spring (11) и Nagoya market (7) ранее при морфологическом описании (Артемьева, 2004) были отнесены к

отдельным сортотипам пекинской капусты. В дальнейших исследованиях была установлена их близость типу листовых овощей Широшимана, возникших путем множественной гибридизации в районе Киото, который японские ботаники выделяют в ботаническую форму (Tsen, Lee, 1942). Их мнение подтверждают результаты настоящего анализа, когда упомянутые образцы вошли в подкластер китайской капусты, но образовали отдельную группу, а образец с названием собственно Широшимана (5) на дендрограмме примыкает к ним, но отстоит от остальных типов кластера, являясь для китайской капусты внешней группой.

При анализе микросателлитов было выявлено отдельное положение части образцов японской капусты (Takuno *et al.*, 2007; Warwick *et al.*, 2007; Артемьева и др., 2008). По результатам настоящей работы, группа японской капусты примыкает к группе Широшимана, образуя с ней свой кластер внутри китайской капусты, что, скорее, поддерживает мнение А.Н. Игнатова (2006) о японском происхождении этой культуры.

Группировка масличных культур и репы в один кластер при отсутствии разделения на подвиды в наших исследованиях подтверждает тесные взаимоотношения ssp. *rapa* и ssp. *oleifera*, а также общность происхождения и генетическую близость ботанических подвидов масличных культур, как об этом можно было судить по результатам морфологических исследований, RFLP, AFLP и изоэнзимного анализа (Синская, 1928; Prakash, Hinata, 1980; Song *et al.*, 1988; McGrath, Quiros, 1992; Takuno *et al.*, 2007; Warwick *et al.*, 2007).

При САСТА-анализе масличные культуры объединились согласно географическому происхождению – из Непала и Пакистана, с одной стороны, и из Китая и Индии – с другой. При использовании же двух типов маркеров на дендрограмме образцы китайских масличных выделились в два кластера. Это положение подтверждает широко распространенное деление масличных *B. rapa* на яровые, озимые и китайский типы (Vonnema, 2010; Zhao, 2010).

В наших предыдущих исследованиях образцы европейской репы оказались бессистемно распределены между масличными культурами (Артемьева и др., 2008). В настоящей работе

5 образцов кластеризованы вместе и рядом с шестым, а также образцом озимой сурепицы, возможно, родственным. Этот результат свидетельствует об успешном поиске молекулярных маркеров, свойственных подвиду *spp. rapa*, среди САСТА МГЭ. Остальные образцы корнеплодной репы распределены между кластерами, что, по-видимому, свидетельствует об их высокой вариабельности.

Были найдены два несоответствующих классической систематике положения образцов на дендрограмме, построенной с использованием обоих типов маркеров: положение образца розеточной капусты Vitamin па (53) и пекинской капусты Хоторен (30), но этот результат не удивителен для перекрестно опыляемых гетерогенных и гетерозиготных образцов коллекции.

Таким образом, амплифицированные последовательности МГЭ II класса САСТА могут быть полезны при разработке молекулярных маркеров, в частности S-SAP, благодаря разнообразию и распространенности этих последовательностей в геномах представителей *Brassica rapa*. S-SAP-маркеры могут быть напрямую использованы для анализа генетического разнообразия, филогенетических построений и геномного картирования.

Выяснено, что использование в качестве маркеров только МГЭ, как и других ранее использованных маркеров, позволяет разделить культуры вида *B. rapa* на два основных кластера: восточноазиатских овощных и индоевропейско-азиатских масличных и корнеплодных культур, а первый кластер – на подкластеры пекинской и китайской капуст, что соответствует традиционному ботаническому делению. Ценным дополнением к предшествующему анализу той же коллекции методом микросателлитов явилось разделение пекинской капусты на ботанически различные группы, в том числе выделение ее кочанных форм, уточнение положения формы Широшмана, японской капусты, а также разделение масличных культур во втором кластере по географическому происхождению. Использование обоих типов маркеров – 149 SSR и 123 S-SAP для построения SAHN-дендрограммы позволило получить наиболее точное положение каждого изученного образца в системе вида. Только несколько морфологически хорошо отличимых образцов европейской корнеплодной

репы оказались дисперсно распределены между образцами второго кластера; однако часть образцов репы сформировала отдельную группу в пределах непальско-индийского подкластера. Возможно, это наиболее древние формы, близкие первой domesticiрованной центрально-азиатской форме вида.

Благодарности

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

Литература

- 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.
- Артемьева А.М., Чесноков Ю.В., Клоке Э. Генетическое разнообразие и внутривидовые филогенетические взаимоотношения культур вида *Brassica rapa* L. по результатам анализа микросателлитов // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 608–619.
- 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.
- Соловьева А.Е., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Идентификация последовательностей элементов Ac, MuDR, Far 1 и САСТА в геномах видов рода *Brassica* // V съезд ВОГиС. М., 21–28 июня 2009 г. Ч. 1. С. 329.
- Alix K., Joets J., Ryder C.D. *et al.* The САСТА transposon *Bot1* played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation // Plant J. 2008. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03660.x
- AGI, Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.
- Bennetzen J.L. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants // Curr. Opin. Genet. Dev. 2005. V. 15. P. 621–627.

- Bonnema G. Association mapping in *Brassica rapa*. A case study on metabolite variation comparing methods. Nov11-11 OECD. 2010.
- Hawkins J.S., Kim H., Nason J.D. *et al.* Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium* // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 1252–1261.
- Heslop-Harrison J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 617–635.
- IHGSC. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature.* 2001. V. 409. P. 860–921.
- 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.
- Meyers B.C., Tingey S.V., Morgante M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome // *Genome Res.* 2001. V. 11. P. 1660–1676.
- Prakash S., Hinata K. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop *Brassica*, a review // *Opera Bot.* 1980. V. 55. P. 1–57.
- 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. N 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 // *Genet. Res. Crop Evol.* 2007. V. 54. P. 279–285.
- Tsen M., Lee S.H. A preliminary study of Chinese cultivated brassicas // *Hort. Sin. Bull.* 1942. V. 2. P. 1–32.
- Vicient C.M., Jaaskelainen M.J., Kalendar R., Schulman A.H. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 1283–1292.
- Warwick S.I., James T., Falk K.C. AFLP-based molecular characterization of *Brassica rapa* and diversity in Canadian spring turnip rape cultivars // *Plant Genet. Res. Character. Util.* 2007. V. 6. N 1. P. 11–21.
- Waugh R., McLeon K., Flavell A.J. *et al.* Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphism (S-SAP) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 253. P. 687–694.
- Yang Y.W., Lai K.N., Tai P.Y., Li W.H. Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other angiosperm lineages // *J. Mol. Evol.* 1999. V. 48. P. 597–604.
- Zhang X., Wessler S.R. Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in the related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 5589–5594.
- Zhao J., Pino del Carpio D., Cumar Basnet R. *et al.* Design of a *Brassica rapa* core collection for association mapping studies // *Genome.* 2010. V. 53. N 11. P. 884–898.
- 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.

USE OF *CACTA* MOBILE GENETIC ELEMENTS FOR THE REFINEMENT OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG *BRASSICA RAPA* L. SPECIES

A.M. Artemyeva¹, H. Budahn², E. Klocke², Yu.V. Chesnokov¹

¹ Vavilov Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia,
e-mail: akme11@yandex.ru; yu.chesnokov@vir.nw.ru;

² Institute for Breeding Research on Agricultural Crops, Quedlinburg, Germany,
e-mail: holger.budahn@jki.bund.de; evelyn.klocke@jki.bund.de

Summary

In addition to our previous studies of the genetic diversity and intraspecific relationships in *Brassica rapa* L. by SSR analysis, we were first to use Class II transposable elements to clarify phylogenetic relations. The core collection of 96 accessions stored at the Vavilov Institute was used in the study. Experiments with 12 S-SAP primer pairs gave rise to 123 polymorphic markers. With the use of TE markers, we divided *B. rapa* crops into two major clusters: East-Asian vegetables and Indo-European-Asian oilseed and turnip. The first cluster was divided into subclusters of Chinese cabbage and pak-choi, in agreement with the botanical division and the results of SSR analysis. The previous classification was improved by division of Chinese cabbage into groups, including a separate group of headed cabbages; refinement of the positions of the Hiroshimana and Mizuna forms; and division of oilseed according to geographical origin. However, more accurate positions of accessions in the system of the species were obtained by construction of a SAHN dendrogram with 149 SSR and 123 S-SAP markers. In this dendrogram, only few accessions of European turnip were dispersed among accessions of the other cluster, but some accessions formed a separate group in the Nepal-Indian subcluster. They are supposed to be the oldest forms closely related to the first domesticated Central-Asian *B. rapa* form.

Key words: *Brassica rapa* L., DNA markers, phylogeny, transposable elements (TEs), *CACTA*, Sequence-Specific Amplification Polymorphism (S-SAP), Simple Sequence Repeats (SSRs).