

ЛЕМЕШ В. А., БОГДАНОВА М. В. [✉], МОЗГОВА Г. В., БУРАКОВА А. А.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: office@igc.by

[✉] m.bogdanova@igc.by, +375172840413, +375297706871

ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДИКОРАСТУЩИХ ПОПУЛЯЦИЙ И КУЛЬТУРНЫХ СОРТОВ МАСЛИЧНОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)

Цель. Целью работы являлось сравнение показателей полиморфизма культурных сортов и популяций рапса *Brassica napus* L., произрастающих вне мест возделывания, для оценки генетического разнообразия дикорастущих популяций рапса в Беларуси. **Методы.** В работе дана оценка генетического разнообразия по данным генотипирования 7 микросателлитных локусов. **Результаты.** Результаты свидетельствуют о большем генетическом разнообразии в дикорастущих популяциях рапса. Анализ структуры распределения генотипов в программе STRUCTURE показал, что наиболее вероятно разделение исследуемой группы на три кластера – культурные сорта, дикорастущие популяции *B. napus* и образцы *B. rapa*. **Выводы.** Установленная генетическая дивергенция между дикорастущими популяциями и сортами указывает на способность дикорастущего масличного рапса формировать и поддерживать стабильные популяции в условиях Беларуси. На практике это следует учитывать при оценке экологического риска при высвобождении трансгенного рапса в окружающую среду. А при возделывании трансгенного рапса особое внимание необходимо уделять мерам по предотвращению возникновения его дикорастущих популяций.

Ключевые слова: масличный рапс, дикорастущие популяции, микросателлитные локусы, генетическое разнообразие.

Рапс (*Brassica napus*) – один из видов рода *Brassica* семейства Brassicaceae, с числом хромосом $2n = 38$. Обычно рассматривается как аллотетраплоид *Brassica rapa* ($2n = 20$) и *Brassica oleracea* ($2n = 18$), возникший в результате спонтанной гибридизации. Рапс имеет несколько центров происхождения и образовался в результате, по меньшей мере, четырех независимых событий гибридизации диплоидных видов *B. rapa* и *B. oleracea* [1]. До сих пор нет единого мнения относительно места происхождения

рапса. Дикорастущий рапс неизвестен, но во многих странах Европы, Азии, Америки и Северной Африки рапс встречается в одичавшем состоянии как сорняк.

В регионах, где планируется выращивание генно-модифицированных (ГМ) культур, рекомендуется заблаговременно проводить исследования переопыления, а также процессов наследования, экспрессии и фенотипических проявлений трансгенов в гибридах как с дикорастущими, так и с культурными растениями, а затем на основе полученных данных разрабатывать конкретные меры и рекомендации по предотвращению попадания трансгенов в окружающую среду [2].

Хотя генно-модифицированный (ГМ) рапс пока не возделывается в Беларуси, внедрение трансгенных сортов в широкую практику сельскохозяйственного производства в ближайшие годы представляется вполне реальным. В этой связи вопросы межвидового переноса генов имеют немаловажное значение.

При оценке рисков воздействия генетически модифицированных организмов на окружающую среду большое внимание уделяется сохранению биологического разнообразия. При этом наиболее актуальной проблемой является риск переноса трансгенов диким сородичам сельскохозяйственных культур в результате перекрестного опыления, поскольку межвидовая гибридизация является не только инструментом селекции, но и силой, способной вызвать эволюционные изменения в экосистемах [3]. Установление фактов и последствий переопыления трансгенных растений с нетрансгенными родственными видами, как дикими, так и культурными, являются предметом интенсивного изучения, и в литературе имеются сведения по этому направлению исследований. Однако в Беларуси такие работы не проводились. Среди возможных последствий переопыления с трансгенными растениями называют, в первую очередь, увели-

чение инвазивного и сорного потенциала вновь образованных гибридов [4–6], а также исчезновение и ассимиляцию диких видов [7].

Наиболее вероятной выглядит возможность перекрестного опыления рапса с дикорастущими и культурными представителями того же вида. Свободноживущие популяции могут появляться в результате потери ГМ-семян при транспортировке и служить источником распространения трансгенов через пыльцу и семена. В Японии, где ГМ-растения не возделывались, был обнаружен устойчивый к 26 гербицидам рапс *V. parvis*, произрастающий вблизи портов и на обочинах дорог. Предположительно, семена рассыпались при перевозке на грузовиках из портов к фабрикам по переработке [8]. Несмотря на запрет возделывания и импорта семян, устойчивые к гербицидам свободнорастущие трансгенные растения рапса торговых марок Roundup Ready (Monsanto) и In Vigor (Bayer) были обнаружены вблизи железных дорог и портов в Швейцарии [9]. В Германии свободнорастущие трансгенные растения рапса обнаруживались через 15 лет после окончания полевых испытаний [10]. Также были найдены гербицидоустойчивые растения редьки *V. rapa* L., а также растения рапса, устойчивые к нескольким гербицидам одновременно, что свидетельствует о переносе генов в дикорастущие популяции [11]. Обнаружение ГМ-вставок в продукции органического сельского хозяйства неизбежно приведёт к убыткам для производителей. К тому же, ГМ-сорта являются интеллектуальной собственностью компаний-производителей, которые могут предъявить производителям обвинения в незаконном использовании запатентованных семян, в то время как трансгены могут присутствовать в семенах в результате переопыления [2].

Целью нашего исследования явилось сравнение показателей полиморфизма культурных сортов и популяций рапса *V. parvis*, произрастающих вне мест возделывания, для оценки генетического разнообразия дикорастущих популяций рапса в Беларуси.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК 30 культурных сортов вида *V. parvis*, 9-ти популяций дикорастущего рапса *V. parvis*, 10-ти индивидуальных дикорастущих растений *V. parvis* и трех растений *V. rapa*, произрастающих вне мест возделывания масличного

рапса (на железнодорожных насыпях, вдоль автомобильных дорог, на садовых участках). ДНК выделяли с использованием набора реактивов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) по протоколам производителя. Для оценки исследованных образцов было отобрано шесть пар SSR праймеров, продуцирующих 7 локусов, которые показали высокий уровень полиморфизма (Na12D08, O112D04-1, O112D04-2, Ra2A05, Na10H03, Na14H11, O111B05). ПЦР проводили в термоциклере MyCycler™ (BioRad, США) с флуоресцентно-мечеными праймерами. Продукты амплификации денатурировали формамидом и разделяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Определение размеров аллелей осуществляли при помощи программного обеспечения GeneMapper v4.1. (Applied Biosystem, США), используя стандарт S450 (GOrDIZ, Россия). Для статистической обработки результатов использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel – GenAIEx 6.41 [12]. Кластерный анализ проведен с помощью программ DARwin5 (версия 6.0.018) [13]. Для описания генетической структуры и исследования соответствия между кластерами генотипов и группами популяций мы применили программу STRUCTURE 2.3.4. [14]. В ней реализован байесовский алгоритм кластеризации генотипов в K кластеров с учетом априорной информации о географическом положении рассматриваемых популяций [15]. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [14] и выбора оптимального K, где $1 \leq K \leq 10$, использовали логарифм правдоподобия LnPD с помощью on-line-приложения STRUCTURE Harvester v0.6.94 [16].

Результаты и обсуждение

В результате микросателлитного анализа в выборке культурных сортов идентифицировано 46 аллелей размером от 68 до 177 п.н. Число аллелей на локус составляло от 3 до 9. Значения H_o (наблюдаемая гетерозиготность) варьировали от 0,1 до 0,71 (табл. 1).

В выборке дикорастущих популяций рапса *V. parvis* в изученных локусах было выявлено 38 аллелей размером от 66 до 177 п.н. Число аллелей на локус варьировало от 3 до 8. Значения H_o варьировали от 0 до 0,93 (табл. 2).

Таблица 1. Полиморфизм *SSR* локусов культурных сортов рапса *B. napus*

Полиморфный локус	Размер аллелей (п.н.)	n_a	n_e	H_o	H_E	I_{nor}
Na12D08	68-89	5	1,26	0,10	0,19	0,35
O112D04-1	109-122	9	2,17	0,55	0,51	0,87
O112D04-2	130-144	9	1,89	0,41	0,47	0,91
Ra2A05	70-89	6	1,59	0,21	0,28	0,49
Na10H03	102-112	3	2,02	0,71	0,50	0,82
Na14H11	115-177	8	1,64	0,28	0,37	0,68
O111B05	108-117	6	2,06	0,19	0,52	1,11
Итого		46				
Среднее		6,6	1,796	0,349	0,398	0,722
SE		0,351	0,139	0,065	0,052	0,091

Примечания: n_a – наблюдаемое число аллелей; n_e – эффективное число аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – Nei's ожидаемая гетерозиготность; I_{nor} – нормализованный индекс Шеннона.

Таблица 2. Полиморфизм *SSR* локусов дикорастущих популяций рапса *B. napus*

Полиморфный локус	Размер аллелей (п.н.)	n_a	n_e	H_o	H_E	I_{nor}
Na12D08	66-89	5	1,83	0,31	0,34	0,59
O112D04-1	109-122	7	1,98	0,58	0,49	0,74
O112D04-2	132-138	5	1,99	0,44	0,43	0,71
Ra2A05	70-89	8	2,24	0,47	0,54	1,00
Na10H03	102-112	3	2,49	0,93	0,60	1,00
Na14H11	119-177	6	2,00	0,42	0,50	0,85
O111B05	109-114	4	2,67	0,00	0,63	1,13
Итого		38				
Среднее		5,4	2,093	0,458	0,486	0,818
SE		0,239	0,144	0,083	0,046	0,082

Примечания: n_a – наблюдаемое число аллелей; n_e – эффективное число аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – Nei's ожидаемая гетерозиготность; I_{nor} – нормализованный индекс Шеннона.

Статистические показатели (n_a , n_e , H_o , H_E , I_{nor}) достоверно не различались среди групп культурных сортов и дикорастущих популяций (табл. 1, 2), тем не менее значения, полученные для дикорастущих популяций, были выше.

Анализируя внутрисортную и внутрипопуляционную генетическую изменчивость, абсолютно генетически однородных сортов обнаружено не было. Наибольшей генетической однородностью обладал один образец (коммерческий сорт «Ситро»). Во всех остальных образцах доля гетерозиготных генотипов была выше, хотя установлена значительная вариабельность среди образцов по наблюдаемой гетерозиготности (H_o). Процент полиморфных локусов был выше для группы дикорастущих популяций (табл. 3).

В результате анализа всех индивидуальных образцов выявлено 52 аллеля, из которых

63% были общими для культурных сортов и дикорастущих популяций (табл. 3). Для дикорастущих популяций наблюдалось большее количество частных аллелей (36%) по сравнению с коммерческими сортами (9,6%).

При построении дендрограммы генетического подобия между изученными образцами невзвешенным парно-групповым методом кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) три образца *B. rapa* были четко отделены от *B. napus*. Коммерческие сорта и дикорастущие популяции распределились в два основных кластера.

Анализ структуры распределения генотипов в программе STRUCTURE показал, что наиболее вероятно разделение исследуемой группы на три кластера ($K=3$) (рис. 1).

Таблица 3. Общие и частные микросателлитные аллели для групп коммерческих сортов и дикорастущих популяций

Микросателлитный локус	Число аллелей	Число общих аллелей	Число частных аллелей	
			Коммерческие сорта	Дикорастущие популяции
Na12D08	7	3	2	2
O112D04-1	10	7	0	3
O112D04-2	9	5	0	4
Ra2A05	9	5	3	1
Na10H03	3	3	0	0
Na14H11	8	6	0	2
O111B05	6	4	0	2
Итого	52	33	5	14
Среднее	7,43	4,71	0,71	2,00
Стандартное отклонение	2,37	1,50	1,25	1,29

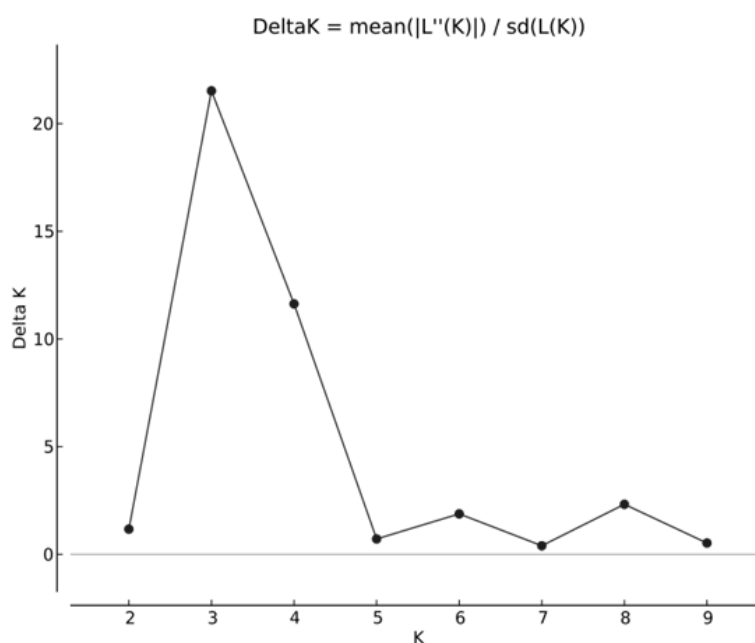


Рис. 1. Графическое отображение определения числа кластеров в программе STRUCTURE Harvester.

Исходя из данных кластеризации можно предположить, что дикорастущие популяции *V. parvis* генетически дифференцированы от культурных сортов, включенных в наше исследование. В целом, обе группы продемонстрировали сходную популяционно-генетическую структуру со сравнимым уровнем генетического разнообразия как внутри, так и между образцами. Культурные сорта рапса и дикорастущие популяции имели более 50% общих микросателлитных аллелей. Между двумя группами растений наблюдался умеренный уровень генетической дифференциации.

Использованные нами для оценки генетического разнообразия микросателлитные (SSR)

маркеры являются подходящим инструментом для идентификации генотипов рапса, однако нельзя исключить, что небольшие размеры выборки и загрязнение семян могут отрицательно влиять на способность обнаружения генетического вклада некоторых сортов в дикорастущие популяции.

Отдельный кластер образовала выборка культурных сортов. Также выделился кластер дикорастущих популяций и кластер образцов *V. rapa* (рис. 2).

Эффект основателя и генетический дрейф могут играть значительную роль в формировании генетической структуры дикорастущих популяций. Генетические различия среди дикорас-

тущих популяций и сравнительно высокий уровень инбридинга подтверждают эту гипотезу. Некоторые дикорастущие популяции генетически достаточно однородны, что указывает на единство их происхождения. Другие популяции демонстрируют неоднородный генетический состав, что позволяет предположить их происхождение из нескольких источников и формирование таких популяций в течение нескольких лет.

Некоторые дикорастущие растения, собранные на большом расстоянии друг от друга, и отобранные, в основном, из небольших популяций, относятся к одному генетическому кластеру. Это генетическое сходство среди дикорастущих растений может быть обусловлено: их общим происхождением от сортов, которые уже не культивируются; отбором, привносящим или исключаящим определенные аллели локусов, или возможной гибридизацией с родственными видами. В любом случае данные свидетельствуют о том, что эти дикорастущие популяции существуют уже несколько лет.

В процессе культивирования и сбора урожая некоторые семена рапса могут попадать в почву, формировать «банк семян», и, оставаясь там до следующего сезона, начинать прорастать до или после посева последующей культуры севооборота. Способствует формированию «банка семян» рапса в почве неравномерность созревания его семян, недостаточная устойчивость к растрескиванию стручка, плохое хозяйствование, что может привести к тому, что большое количество семян высаженного масличного рапса не будет собрано. На выживаемость и устойчивость семян в почве и растительном покрове значительно влияют условия окружающей среды, продолжительность периода покоя, а

также установившаяся практика земледелия и управления севооборотом сельскохозяйственных культур. В местах с плотной высадкой культур это, в частности, может привести к проблемам самосева сорняков в последующих культурах и ухудшению качества семян новых сортов рапса, возделываемых на этом же поле. В некоторых случаях самосевные растения могут составлять значительную конкуренцию засеянной культуре и ухудшать качество ее урожая. В таких случаях их необходимо устранять химическим и/или механическим способом. Основными факторами, регулирующими риск сохранения «банка семян» и появления самосевных растений, является правильная обработка земель после культивирования, агротехнические мероприятия, направленные на уничтожение «банка семян», удаление самосево из севооборота, чередование сельскохозяйственных культур в севообороте. Кроме того, целесообразно использовать сорта, не способные переходить к состоянию вторичного покоя, что необходимо экспериментально установить до высева сорта.

Выводы

Установленная нами генетическая дивергенция между дикорастущими популяциями и сортами масличного рапса указывает на то, что дикорастущий масличный рапс способен формировать и поддерживать стабильные популяции в условиях Беларуси. На практике это следует учитывать при оценке экологического риска при высвобождении трансгенного рапса в окружающую среду. А при возделывании трансгенного рапса особое внимание необходимо уделять мерам по предотвращению возникновения его дикорастущих популяций.

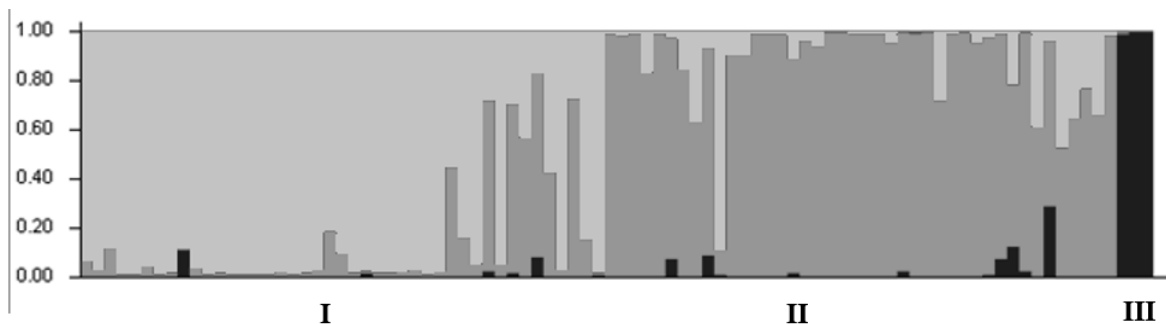


Рис. 2. Кластеризация выборок на основе алгоритма программы STRUCTURE 2.3.4. при $K=3$. По вертикали – доля частот аллелей соответствующего кластера (апостериорная вероятность), по горизонтали – номера популяций: I – коммерческие сорта, II – дикорастущие популяции, III – образцы *B. rapa*.

References

1. Song K., Osborn T. Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome*. 1992. Vol. 35, № 6. P. 992–1001.
2. Mihailova E.V., Kuluev B.R., Haziahmetov R.M. Ocenka vozmozhnosti gibridizacii geneticheski modifitsirovannogo rapsa c rodstvennymi netransgennymi rasteniyami. *Ekologicheskaya genetika*. 2015. Vol. 13, № 2. P. 100–117. [in Russian] / Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Хазиахметов Р.М. Оценка возможности гибридизации генетически модифицированного рапса с родственными нетрансгенными растениями. *Экологическая генетика*. 2015. Т. 13, № 2. С. 100–117.
3. Zou J., Fu D., Gong H., Qian W., Xia W., Pires J.C., Li R., Long Y., Mason A.S., Yang T.J., Lim Y.P., Park B.S., Meng J. *De novo* genetic variation associated with retrotransposon activation, genomic rearrangements and trait variation in a recombinant inbred line population of *Brassica napus* derived from interspecific hybridization with *Brassica rapa*: Genomic alterations in introgressed *Brassica napus*. *The Plant Journal*. 2011. Vol. 68, № 2. P. 212–224. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04679.x.
4. Ellstrand N.C. When Transgenes Wander, Should We Worry? *Plant physiology*. 2001. Vol. 125, № 4. P. 1543–1545. doi: 10.1104/pp.125.4.1543.
5. Lu B.-R., Snow A.A. Gene Flow from Genetically Modified Rice and Its Environmental Consequences. *BioScience*. 2005. Vol. 55, № 8. P. 669.
6. Rieseberg L.H., Kim S.C., Randel R.A., Whitney K.D., Gross B.L., Lexer C., Clay K. Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers. *Genetica*. 2007. Vol. 129, № 2. P. 149–165. doi: 10.1007/s10709-006-9011-y.
7. Zыbalov V.S. Upravlenie funkciej agrocenozov. Rol' promezhutochnyh posevov i polikul'tur. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2002. № 1. P. 3–10. [in Russian] / Зыбалов В.С. Управление функцией агроценозов. Роль промежуточных посевов и поликультур. *Сельскохозяйственная биология*. 2002. № 1. С. 3–10.
8. Saji H., Nakajima N., Aono M., Tamaoki M., Kubo A., Wakiyama S., Hatase Y., Nagatsu M. Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res.* 2005. Vol. 4, № 4. P. 217–222. doi: 10.1051/ebr:2006003/.
9. Schulze J., Frauenknecht T., Brodmann P., Bagutti C. Unexpected diversity of feral genetically modified oilseed rape (*Brassica napus* L.) despite a cultivation and import ban in Switzerland. *PLoS one*. 2014. Vol. 9, № 12. P. e114477. doi: 10.1371/journal.pone.0114477.
10. Belter A. Long-Term Monitoring of Field Trial Sites with Genetically Modified Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) in Saxony-Anhalt, Germany. Fifteen Years Persistence to Date but No Spatial Dispersion. *Genes (Basel)*. 2016. Vol. 7, № 1. P.E3. doi: 10.3390/genes7010003.
11. Aono M., Wakiyama S., Nagatsu M., Kaneko Y., Nishizawa T., Nakajima N., Tamaoki M., Kubo A., Saji H. Seeds of a possible natural hybrid between herbicide-resistant *Brassica napus* and *Brassica rapa* detected on a riverbank in Japan. *GM Crops*. 2011. Vol. 2, № 3. P. 201–210. doi: 10.4161/gmcr.2.3.18931.
12. Peakall R., Smouse P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, № 19. P. 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
13. DARwin software (2006). URL: <http://darwin.cirad.fr/darwin> (Last accessed: 12.12.2018).
14. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14, No. 8. P. 2611–2620.
15. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000. Vol. 155, No. 2. P. 945–959.
16. Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012. Vol. 4, No. 2. P. 359–361.

LEMESH V., BAH DANAVA M., MOZGOVA G., BURAKOVA A.

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: mw.bogdanova@gmail.com

POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI IN FERAL POPULATIONS AND COMMERCIAL VARIETIES OF OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.)

Aim. The aim of the work was to compare the polymorphism of commercial varieties and populations of *B. napus* growing outside cultivation to assess the genetic diversity of feral rapeseed populations in Belarus. **Methods.** The study assessed genetic diversity according to the data of 7 microsatellite loci genotyping. **Results.** The results indicate a greater genetic diversity in feral oilseed rape populations. An analysis of the structure of the genotypes distribution in the STRUCTURE software showed the division into three clusters – commercial varieties, feral populations and samples of *B. rapa*. **Conclusions.** The established genetic divergence between feral populations and commercial varieties indicates that feral oilseed rape is able to maintain persistent populations in Belarus. In practice, this should be taken into account when assessing the environmental risk when transgenic rape is released into the environment. And in the cultivation of transgenic rapeseed, special attention should be paid to measures to prevent the occurrence of its free-growing populations.

Keywords: oilseed rape, feral populations, microsatellite loci, genetic diversity.

ЛЕМЕШ В. А., БОГДАНОВА М. В., МОЗГОВА Г. В., БУРАКОВА А. А.

ДНУ «Інститут генетики і цитології НАН Білорусі»,

Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: office@igc.by

ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДИКОРΟΣЛИХ ПОПУЛЯЦІЙ І КУЛЬТУРНИХ СОРТІВ ОЛІЙНОГО РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS* L.)

Мета. Метою роботи було порівняння показників поліморфізму культурних сортів і популяцій ріпаку *Brassica napus* L., які ростуть поза місцями обробітку, для оцінки генетичної різноманітності дикорослих популяцій ріпаку в Білорусі. **Методи.** У роботі проведено оцінку генетичної різноманітності за даними генотипування 7 мікросателітних локусів. **Результати.** Результати свідчать про більшу генетичну різноманітність у дикорослих популяціях ріпаку. Аналіз структури розподілу генотипів у програмі STRUCTURE показав, що найбільш ймовірним є поділ досліджуваної групи на три кластери – культурні сорти, дикорослі популяції *B. napus* і зразки *B. para*. **Висновки.** Встановлена генетична дивергенція між дикорослими популяціями і сортами вказує на здатність дикорослого олійного ріпаку формувати і підтримувати стабільні популяції в умовах Білорусі. На практиці це слід враховувати для оцінки екологічного ризику при вивільненні трансгенного ріпаку в навколишнє середовище. При обробітку трансгенного ріпаку особливу увагу необхідно приділяти заходам щодо запобігання виникненню його дикорослих популяцій.

Ключові слова: олійний рапс, дикорослі популяції, мікросателітні локуси, генетична різноманітність.