

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ *BRASSICA OLERACEA* VAR. *CAPITATA* L.

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *alba* DC) является одной из наиболее важных овощных культур благодаря широкой адаптационной способности, высокой урожайности и питательной ценности. Селекция *B. oleracea* преимущественно базируется на использовании физиологической самонесовместимости и MS (male-sterile) систем и предполагает наличие генетически выровненного исходного материала. Тем не менее, ввиду высокой внутривидовой гетерогенности, связанной с биологическими особенностями этой культуры, существует проблема создания константного генетического материала и поддержания его чистоты [1, 2]. Традиционная оценка селекционных форм, основанная на данных полевого испытания, позволяет отобрать образцы, выровненные по срокам созревания, размеру и форме кочана. Тем не менее, генетическая компонента изменчивости, обусловленная гетерозиготностью особей по разным аллелям, как правило, остается за пределами такой оценки. Следовательно, возможности семейственного отбора, так же как и контроль типичности наследуемого в поколениях генетического материала, в значительной мере ограничены.

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

Удобным и технологичным методом ДНК-скрининга является микросателлитный (SSR — Simple sequence repeat) анализ, который эффективно используется для картирования, выявления сцепления и закономерностей наследования. Микросателлиты относятся к tandemно повторяющимся последовательностям ДНК, которые широко представлены в геноме растений и животных, включая кодирующие и некодирующие

области [3, 4]. SSR локусы выявляют большое разнообразие аллелей, поскольку события, обуславливающие вариацию в количестве повторов, являются частыми и обратимыми [5]. В некоторых случаях отмечается существование более 10 аллелей для одного маркера [6]. Эта информация может быть полезна, так как обеспечивает эффективный способ отслеживания аллелей в популяции и позволяет дифференцировать генотипы при использовании относительно небольшого числа маркеров.

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

Материалы и методы

Объектом исследования служила селекционная коллекция образцов капусты белокочанной, полученных на основе коммерческих сортов различного эколого-географического происхождения: Альфредо (Alf) и Ротонда (Rot) голландской селекции; Арктика (Arg) и Семко юбилейный (Sem) селекции РФ; Гранада (Gran), Роксана (Rok), Сулейка (Sul), Увертюра (Uver) и Халиф (Khal), а также линии L251, L264, L407, L573, L574, L575, L576, L577, L578, L580, L583, L661, L728, L783, L860, L962 немецкой селекции; линии Gr, P19 селекции РБ.

ДНК выделяли из этиолированных проростков в трехкратной повторности при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (#K0512, Fermentas) согласно инструкции. Каждая повторность представляет собой смесь (bulk) ДНК из 3–9 индивидуальных растений. Препараты ДНК разводили до конечной концентрации 10 ng/ml^{-1} в деионизированной воде и хранили при температуре $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Для молекулярно-генетического анализа использовали 14 SSR-маркеров (BoABI1, BoIAB20TR,

BoIAB15TF, BoAP1, BoCALa, BoCALb, BoCALc, BoDEL9, BoDCTD1, BoPLD1, BoPLD2, BoPC34, BoREM1b, BoTHL1), отобранных из литературных источников [7, 8]. Амплификацию проводили на оборудовании «Biometra» (Германия) в стандартном режиме.

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

Оценку аллельного состава SSR-локусов осуществляли на основе бинарных матриц. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала методом UPGMA выполняли с использованием программы DARwin 5.0 (vers. 1.3b). Генетическую структуру определяли при помощи анализа главных компонент (PCA). Анализ частот SSR-локусов и информационного содержания соответствующих маркеров выполнен при помощи приложения GenAlEx 6.5.

Результаты и обсуждение

При изучении генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокочанной Института овощеводства НАН Беларуси, представленной 27 образцами различного происхождения, использовали 14 пар микросателлитных маркеров. В результате ДНК-типирования рассмотрено 78 аллелей в 14 SSR-локусах. Уровень наблюдаемого полиморфизма составил 97,9%. Фактический размер фрагментов варьировал по отношению к теоретически ожидаемому, за небольшим исключением. Количество рассмотренных аллелей на locus достигало 2–11 и в среднем составило 5,7 на 1 locus. Также отмечено значительное варьирование частот SSR-аллелей (рис. 1). Наблюдаемые частоты минорных аллелей (MAF — Minor Alleles Frequencies) были сдвинуты к $MAF < 0,32$.

На долю редких ($MAF < 0,05$) пришлось около 16% аллелей, которые были выявлены в локусах: BoDCTD8 (174bp), BoIAB15TF (218bp, 240bp, 293bp), BoIAB20TR (204bp), BoTHL1 (140bp), PLD2 (243bp, 247bp, 254bp), REM1b (172bp), BoPLD1 (302bp), BoABI1 (169bp), BoCalc (140bp). Тогда как наиболее распространенные ($MAF > 0,5$) составили 26,9% от обще-

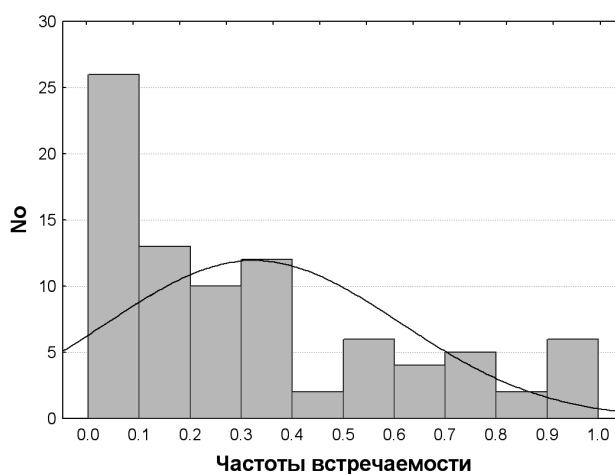


Рис. 1. Характер распределения частот встречаемости SSR-аллелей в коллекции капусты белокочанной

го числа аллелей. Размер фрагментов BoDel9 (262bp), BoIAB15TF (302bp), BoIAB20TR (197, 314bp), BoCALb (242bp), BoTHL1 (149bp), BoPLD2 (188bp), Rem1b (163bp) соответствовал теоретически ожидаемому.

Среди 14 анализируемых SSR-локусов индекс информативности PIC ранжировался от 0,193 (для BoIAB15TF) до 0,866 (для BoIAB20TR) и в среднем достигал 0,62. Уровень гетерогенности варьировал от 0,071 до 0,436 и имел среднее значение 0,25, подтверждая существование полиморфизма во всех исследуемых SSR-локусах. Наиболее информативными ($PIC > 0,7$) оказались локусы BoDCTD1, BoIAB20TR, BoPC34, BoCALa, BoPLD1, BoCALc, которые также характеризовались высокими значениями индекса Шеннона (I) и числа эффективных аллелей (N_e).

При изучении генетической гетерогенности капусты белокочанной на основе полиморфизма SSR-локусов рассчитаны генетические дистанции (GD) между образцами. Величина GD варьировала от 0,089 (Khal, Rot) до 0,573 (Sul, PI9), со средним уровнем 0,333.

Для выявления топологической дифференциации и внутрисортного полиморфизма методом UPGMA выполнен кластерный анализ (рис. 2), в результате которого экспериментальные формы дифференцированы на две группы сходства.

Максимальная величина межгрупповых дистанций GD достигает 0,573. Согласно иерархической дифференциации в субкластере I выделены два класса общности: (A) L661, Gran, PI9, Rok, Alf, L580, L789, L583; (B) L264, L574, L728, L575, L407, L578, L577, L576, L860, L573, а так-

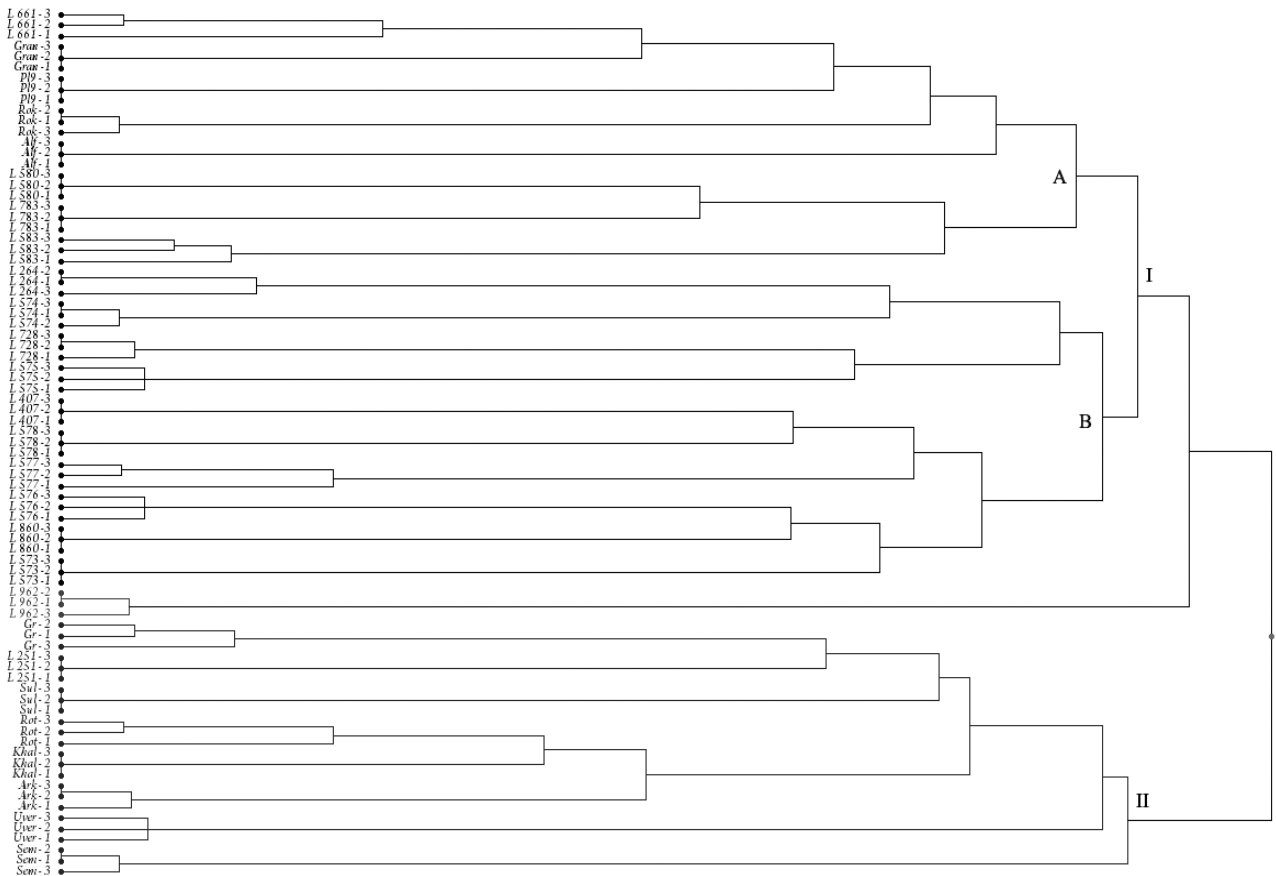


Рис. 2. Топологическая дифференциация образцов капусты белокочанной методом UPGMA, выполненная на основе анализа аллельного состава 14 микросателлитных локусов

же отдельная топологическая ветвь, образованная L962. Здесь величина генетических дистанций (GD) варьирует от 0,137 до 0,444, в зависимости от топологии ветвления. Субкластер II образуют 8 образцов (Khal, Rot, Sul, Ark, Gr, Uver, L251, Sem) с величиной межкластерных расстояний 0,102–0,346. Наибольшая генетическая общность характеризует Khal и Rot. Образцы Uver и Sem топологически выделены отдельными ветвями, что обусловлено наличием у них наибольшего числа уникальных сочетаний SSR-аллелей.

По результатам изучения аллельного состава SSR-локусов коллекции капусты белокочанной наиболее информативными оказались маркеры Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc, которые позволяют проводить как межсортовую, так и межлинейную дифференциацию *B. oleracea* var. *capitata*, включая типирование индивидуальных растений. Также установлено высокое разнообразие экспериментальных форм, которое свидетельствует о широкой генетической основе коллекции, которая преимущественно представлена образцами, полученными на основе сортов

зарубежной селекции различного эколого-географического происхождения (Россия, Германия, Голландия). Межсортовой полиморфизм, выраженный в аллельном разнообразии изученных SSR-локусов, в значительной мере облегчает сортовую идентификацию и типирование индивидуальных растений при создании базовых популяций для последующей селекции на гетерозис.

При изучении внутрисортового полиморфизма показано, что наиболее выровненными по аллельному составу SSR-локусов являются Gran, P19, Alf, L580, L783, L407, L578, L860, L573, L251 и Khal. Остальные образцы выявляют гетерогенность, которая, вероятно, связана с высоким полиморфизмом исходных форм, вследствие чего целесообразно провести семейственный отбор для получения генетически выровненного поколения.

В результате исследования определены доноры редких аллелей: линии Gr, Alf, P19, Rot, Rok, L583, L578, L577, L573, L407, которые необходимо сохранять для поддержания разнообразия базовой коллекции, а также включать в гибриди-

зацию с целью выделения ценных генетических сегрегаций.

Сгруппированные в общие субкластеры образцы, несмотря на различное происхождение, с высокой вероятностью имеют общую предковую генетическую основу. Это может быть связано с использованием на ранних этапах селекции европейского региона ограниченного числа выдающихся генотипов.

Выводы

Полученные результаты подтверждают, что предложенный набор SSR-маркеров может успеш-

но использоваться не только для оценки внутривидового разнообразия *B. oleracea*, но также для анализа меж- и внутрисортовой гетерогенности.

Информация о топологической дифференциации коллекции капусты белокочанной, полученная в результате кластерного анализа, является основой для селекционного отбора генетически выровненного материала, а также дивергентных комбинаций скрещивания при селекции на гетерозис.

Выражаем благодарность сотрудникам РУП Института овощеводства НАН Беларуси за предоставленный для исследований селекционный материал капусты белокочанной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ye Sh., Wang Y., Huang D., Li J., Gong Y., Xu L., Liu L. Genetic purity testing of F₁ hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) // *Scientia Horticulturae*. — 2013. — 155. — P. 92–96.
2. Liwang Liu, Guang Liu, Yiqin Gong Evaluation of Genetic Purity of F₁ Hybrid Seeds in Cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR Markers // *Hortscience*. — 2007. — 42, № 3. — P. 724–727.
3. Zhang L., Yuan D., Yu Sh., Li Zh., Cao Y., Miao Zh., Qian H., Tang K. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana* // *Bioinformatics*. — 2004. — 20, № 7. — P. 1081–1086.
4. Senan S., Kizhakayil D., Sasicumar B., Sheeja Th. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview // *Not. Sci. Biol.* — 2014. — 6, № 1. — P. 1–13.
5. Kashi Y., King D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution // *Trends Genet.* — 2006. — 22. — P. 253–259.
6. Reif J. C., Warburton M. L., Xia X. C., Hoisington D. A., Crossa J., Taba S., Muminovic J., Bohn M., Frisch M., Melchinger A. E. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers // *Theor Appl Genet.* — 2006. — 113. — P. 177–185.
7. Louarn S., Torp A. M., Holme I. B., Andersen S. B., Jensen B. D. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* L. // *Genet. Resour. Crop. Evol.* — 2007. — 54. — P. 1717–1725.
8. Tonguc M., Griffiths Ph. D. Genetic relationships of Brassica vegetables determined using database derived simple sequence repeats // *Euphytica*. — 2004. — 137. — P. 193–201.

SHAPTURENKO M. N., PECHKOVSKAYA T. V., VAKULA S. V., KHOTYLEVA L. V.

Institute of Genetics and Cytology of Natl. Acad. Sci. of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: m.shapturenko@tut.by

COMPARATIVE DIVERSITY SIMPLE SEQUENCE REPEAT LOCI FROM *BRASSICA OLERACEA* VAR. *CAPITATA* L.

Aims. White cabbage is characterized by high level of intraspecific heterogeneity due to some biological features that causes difficulties for breeding at creation constant form and maintaining of their genetic typicality. Thus, we studied the effectiveness the set of SSR markers for both white cabbage diversity analysis and pure lines genotyping. **Methods.** Molecular-genetic studies were performed trough SSR PCR. Effectiveness the set of markers was evaluated by counting allelic richness, PICs, heterogeneity, allele frequencies using GenAlEx 6.5. To determine *B.o.var capitata* diversity with low and high variations, Jaccard dissimilarity index was estimated by Darwin software. **Results.** 15 microsatellite loci were characterized for the information content, allelic frequencies and heterogeneity level. The effective multiallelic markers (Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc) with high information content (PIC > 0.7) that could be successfully used for the analysis of inter- and intravarietal polymorphism *B. oleracea* var. *capitata* were defined. Based on the SSR-evaluation and subsequent clustering the genetic structure of breeding collection was established, which showed that most experimental forms have a common ancestral genetic basis, in spite of different origins. **Conclusions.** Proposed set of informative SSR markers is a useful tool for the selection of genetically constant material, as well as divergent cross combinations for the hybrid breeding. Identified donors of rare SSR alleles potentially could be a source of valuable genetic segregation for further *B. oleracea* improvement.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *alba* DC, genetic diversity, SSR.