

Молекулярно-генетическая характеристика образцов брокколи (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) коллекции ВИР

DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-91-99

УДК 631.527:575.22

Поступление/Received: 23.03.2020

Принято/Accepted: 21.09.2020



Molecular genetic characteristics of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) from the VIR collection

Д. А. ФАТЕЕВ*, А. М. АРТЕМЬЕВА

D. A. FATEEV*, A. M. ARTEMYEVA

Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44
* dmtfateev@gmail.com

N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources,
42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia
* dmtfateev@gmail.com

Актуальность. Брокколи – скороспелая, урожайная овощная культура, ценная по содержанию многих биологически активных соединений и минеральных элементов. В 2020 г. в Госреестре РФ зарегистрировано 47 гибридов и 8 сортов брокколи, среди них 14 сортов и гибридов российской селекции. Необходимость совершенствования сортимента по целому ряду актуальных направлений селекции требует привлечения новых эффективных методов, в том числе методов маркер-вспомогательной селекции и ассоциативного картирования. Оценка коллекции брокколи ВИР с использованием молекулярно-генетических маркеров позволит предоставить новый исходный материал для селекции улучшенных сортов. **Материалы и методы.** Проведено молекулярно-генетическое исследование 39 сортов и гибридных популяций брокколи различного географического происхождения, отличающихся по биологическим особенностям и направлениям использования. Для анализа были отобраны 35 маркеров микросателлитных последовательностей, специфичных для генома *Brassica* L. **Результаты и заключение.** С помощью использованных праймеров идентифицировано 110 полиморфных фрагментов. В изученных локусах идентифицировано от трех до семи аллелей. Показатель дискриминационной силы маркеров варьировал от 0,75 до 0,96 и в среднем составил 0,91, среднее число фрагментов на маркер – 4,4. У исследованных образцов выявлено 10 уникальных и 12 редких (встречающихся менее чем у 8% образцов) аллелей. В то же время аллель локуса BC65 длиной 201 пн обнаружен у 95% образцов, то есть был практически общим. Все использованные маркеры имеют достаточно высокую диагностическую ценность для анализа генетического полиморфизма и могут быть использованы для ДНК-идентификации сортов брокколи. Анализ генетического сходства коллекционных образцов, выполненный методом Unweighted Neighbor-Joining в программе DarWin, позволил выявить четыре близкородственных кластера в изученной выборке генотипов.

Ключевые слова: SSR-маркеры, генетическое разнообразие, ДНК-идентификация.

Background. Broccoli is an early-ripening vegetable crop that contains many biologically active compounds and mineral elements. According to the Genesys database, the global genebank collections contain no more than 465 different broccoli accessions. Fourteen cultivars and hybrids developed in Russia are registered in the State Register of the Russian Federation. The need to improve the assortment in a number of important breeding target areas (small habitus, non-spawning, bud size, disease resistance, etc.) requires the use of new effective techniques, including marker-assisted selection methods and association mapping. In this regard, it seems relevant to evaluate the VIR collection of broccoli using molecular genetic markers, which will provide new source material for breeding. **Materials and methods.** A molecular genetic study involved 39 broccoli cultivars and hybrid populations of different geographical origin, with various biological characteristics, and for various uses. For the analysis, 35 markers of microsatellite sequences specific to the *Brassica* L. genome were selected. PCR products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel. **Results and conclusions.** As a result, 110 polymorphic fragments were identified. In the studied loci, 3 to 7 alleles were pinpointed. The discriminating power of markers ranged from 0.75 to 0.96, and averaged 0.91; the average number of fragments per marker was 4.4. Ten unique alleles and 12 rare alleles (found in less than 8% of the samples) were observed in the studied accessions. On the other hand, the 201 bp allele of the locus BC65 was found in 95% of accessions, that is, it was almost common. All used markers have a sufficiently high diagnostic value and can be recommended for DNA identification in broccoli cultivars. An analysis of the genetic similarity of the collection accessions, carried out in the DarWin program using the Unweighted Neighbor-Joining method, made it possible to establish four closely related clusters.

Key words: SSR markers, genetic diversity, DNA identification.

Введение

Под *Brassica* L. (Капуста) семейства Brassicaceae Burnett включает представителей кормовых, овощных и масличных сельскохозяйственных культур. Растения капусты огородной (*B. oleracea* L.) отличаются высокой значимостью для рациона населения, содержат ценные питательные и биологически активные вещества, витамины и минеральные элементы. Вид является удобным объектом для молекулярно-генетических исследований; генотип его был секвенирован в 2014 г. (Liu et al., 2014).

Брокколи – *B. oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *italica* Plenck (syn. *B. oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.) (ветвистая брокколи, спаржевая капуста) – является разновидностью капусты огородной и родоначальной формой плотноголовчатой цветной капусты. Брокколи произошла от итальянской листовой капусты, которую отбирали на раннее цветение, при интрогрессии генетического материала критской капусты *B. cretica* Lam. (Artemyeva, Solovieva, 2018). В начале XVIII века итальянские иммигранты привезли семена брокколи в Северную Америку, откуда эта культура распространилась по странам Северной Европы и Японии. Считается, что брокколи обладает узкой генетической основой, поскольку долгое время культивировалась исключительно в Средиземноморье. Только в начале XX века началось широкое возделывание брокколи в Северной Америке, Северной Европе и странах Азии.

Коллекция брокколи ВИР насчитывает 126 образцов. Стержневая коллекция, отражающая разнообразие культуры по происхождению и типу использования, включает 39 образцов, сортовых и гибридных популяций. Определение уровня генетического полиморфизма коллекционных образцов, оценка их родственных взаимосвязей необходимы для разработки систем идентификации и паспортизации, а также поиска молекулярных маркеров, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками. Микросателлитные (SSR) маркеры использовались для изучения разнообразия капустных культур (Lowe et al., 2002; Piquemal et al., 2005), составления генетических карт на основе картирующих популяций у *B. oleracea* (Walley et al., 2012) и *B. rapa* L. (Lou et al., 2007), для ассоциативного картирования хозяйственно ценных признаков у *B. rapa* (Artemyeva et al., 2013). Получены данные о генетических взаимоотношениях как между разновидностями капусты, так и среди сортов этих разновидностей (Tonguc, Griffiths, 2004). Филогенетические связи между разновидностями капусты огородной из коллекции ВИР были установлены на основе изменчивости микросателлитов в работе А. М. Артемьевой с соавторами (Artemyeva et al., 2009). В исследовании южнокорейских ученых (Izzah et al., 2013) с помощью микросателлитных маркеров проанализирован 91 коммерческий образец *B. oleracea* и были выявлены генетические связи между представителями шести различных сортотипов. Изучение изменчивости микросателлитных локусов селекционных форм капусты белокочанной позволило классифицировать российские образцы (Shapturenko et al., 2016; Domblides A.S. et al., 2018). В то же время генетическое разнообразие коллекции брокколи с использованием молекулярно-генетических маркеров до сих пор не изучено.

Цель настоящей работы заключалась в изучении генетического разнообразия сортов и гибридных популяций брокколи и оценке эффективности использова-

ния подобранного нами набора микросателлитных маркеров для анализа генетического полиморфизма. В настоящей работе SSR-маркеры впервые использованы для оценки межсортного полиморфизма, определения уровня генетического сходства между образцами стержневой коллекции брокколи из коллекции ВИР.

Материалы и методы

Для молекулярного анализа была использована стержневая коллекция брокколи ВИР. Коллекция включала 39 сортов и гибридных популяций, имеющих различное географическое происхождение, в частности сорта селекции России, Японии, Швеции, США, Канады, Нидерландов (табл. 1). Тотальную ДНК выделяли из навески листьев пяти растений с помощью набора СорбГМО-Б (Синтол, Россия), согласно рекомендациям производителя (для выделения ДНК используется кремниевый сорбент и ионный детергент СТАВ). В исследовании использовали 35 SSR-маркеров. Информация о названиях SSR-маркеров, последовательности праймеров, размере и числе выявленных аллелей, а также их хромосомной локализации были получены из базы данных маркеров овощных культур VegMarks (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp>) (табл. 2). Праймеры синтезированы компанией «Евроген» (Россия).

Состав реакционной смеси (конечный объем 20 мкл) был следующий: 1 x ПЦР буфера, 1,5 ммоль $MgCl_2$, 200 мкмоль каждого из dNTP, 0,2 мкмоль каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 е.а. Taq ДНК-полимеразы (Евроген). ПЦР проводили при следующих условиях: 1 цикл – 5 мин при 94°C; далее 36 циклов, включающих: 45 с при 94°C, 45 с при 60°C, 45 с при 72°C; заключительная элонгация – 5 мин при 72°C. Температура отжига для каждой пары праймеров подбиралась индивидуально, поскольку предложенная по литературным данным температура не всегда позволяла пройти амплификации результативно. Фрагменты ПЦР разделяли в 3% агарозном геле. Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ImageLab® Software v6.0.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. Характеристика полиморфных микросателлитных локусов была получена с помощью программы iMec – Online Marker Efficiency Calculator (Amiryousefi et al., 2018). Были рассчитаны следующие показатели эффективности маркеров:

H – ожидаемая гетерозиготность, вероятность того, что образец является гетерозиготным по данному локусу в популяции

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

где p_i – частота i -го локуса среди общего числа I локусов;

PIC – мера информационного полиморфизма, определяется способностью маркера устанавливать полиморфизм в популяции в зависимости от числа обнаруживаемых аллелей и распределения их частот

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum p_i p_j^2$$

где p_i и p_j – частота i -го и j -го локуса. Первое суммирование – по общему количеству аллелей, тогда как два последующих суммирования обозначают все i и j , где $i \neq j$;

E – эффективное мультиплексное отношение, определяется как произведение общего числа полиморфных

Таблица 1. Список изученных образцов

Table 1. The list of the accessions studied

№ по каталогу ВИР	Название	Происхождение	№ по каталогу ВИР	Название	Происхождение
к-190	Green Sprouting early	США	к-302	El Centro	Великобритания
к-192	Green Sprouting 47	США	к-303	Charade (F1)	Япония
к-196	Coastle 57051A	Канада	к-304	Decathlon (F1)	Нидерланды
к-211	Burpees green bud	США	к-305	Monterey (F1)	Япония
к-212	Coastle 87038	Канада	к-306	Pentathlon (F1)	Япония
к-252	Тонус	ВНИИССОК	к-309	Medway (F1)	Нидерланды
к-276	Бонанза	США	к-310	Nutri-bud	США
к-284	Hybrid Express Corona	Япония	вр.к-159	Sureen	Нидерланды
к-285	Clippere #73367 (F1) R.S.	Нидерланды	вр.к-194	Fordgook Late Hybrid	Новая Зеландия
к-289	Violet Queen (F1) Purple	США	вр.к-202	Packman (F1)	США
к-290	Денди Эрли (F1)	Япония	вр.к-277	Green Goliath	США
к-291	Arcadia (F1)	Япония	вр.к-326	Patriot (F1)	Япония
к-292	Emerald City (F1)	Япония	вр.к-332	Agassi (F1)	Нидерланды
к-295	Southern Comet Hybrid	Япония	вр.к-333	25-91 RZ	Нидерланды
к-296	Cape Queen (F1)	Япония	вр.к-335	OPV-12317	Испания
к-297	Marathon (F1)	Япония	вр.к-341	Lufeng	Нидерланды
к-298	Everest (F1)	Канада	вр.к-347	Brodway (F1)	Нидерланды
к-299	Comanche (F1)	Япония	вр.к-350	Furio	Нидерланды
к-300	Senshi (F1)	Япония	вр.к-353	Red head	Финляндия
к-301	Triathlon (F1)	Япония		Out group (пекинская капуста)	

локусов (на праймер) и доли полиморфных локусов от их общего числа

$$E = n_p \left(n_p / n \right)$$

где n_p – число полиморфных локусов, n – общее число локусов. Чем выше значения E , тем эффективней система «праймер – маркер»;

D – дискриминационная сила, вероятность того, что два случайно выбранных образца демонстрируют разные закономерности формирования аллельного профиля и, таким образом, отличаются друг от друга

$$D = 1 - \sum g_i^2$$

где g_i – частота встречаемости i -го генотипа;

R – разрешающая способность; основана на распределении аллелей среди выбранных генотипов; сильно

коррелирует со способностью различать анализируемые образцы. Разделение образцов на две группы основано на наличии или отсутствии фрагмента, присутствующего в одной части образцов и отсутствующего в другой

$$R = \sum I_b$$

где $I_b = 1 - (2 \cdot 0.5 - p)$ – информативность локуса, p – доля особей, у которых выявлен локус I .

Дендрограмма генетического сходства сортов и гибридных популяций получена с помощью программы DarWin методом Unweighted Neighbor-Joining. С использованием программы STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al. 2003) была определена генотипическая структура изученной выборки образцов. Для выбора оптимального K (генетические группы), где $2 \leq K \leq 6$, использовался логарифм правдоподобия $\ln PD$

Таблица 2. Полиморфные молекулярно-генетические маркеры, использованные в исследовании**Table 2. Polymorphic molecular genetic markers used in the study**

Локус	Группа сцепления	Мотив	Последовательность 5'–3'	Ожидаемая длина фрагмента, пн.	Источник
BC7	C05	(ACC)6	F: AGTTGGCCCCATTTTCATTGTTAT R: CATCTTGACGGCCTCCATCTCCA	153	Ma Ron-gcai (2007)
BC38	R03	(ATC)7... (AAG)5	F: CTTTTGTGTGCCGACGAGA R: AGGAAGCAGGAAAGAGATAAAAG	198	Ma Ron-gcai (2007)
BC46	R01	(GAA)6	F: AGGTTTCGAGGTTTGTGGCTTCT R: CTAAACTCATCGCTTCCGTAAACA	184	Ma Ron-gcai (2007)
BC48	R02	(TCT)7	F: GGTGGTGGGCTGGGGAGTA R: CGTCGATCGATTTCATAACCGTAGA	237	Ma Ron-gcai (2007)
BC51	R06	(GAA)6	F: CCGAGGAAGAAAGCTGTTGAGTTG R: ATCGCTTCCGTAGACACCTTCGTT	154	Ma Ron-gcai (2007)
BC65	R04	(AG)7	F: TTCCGTCCCTTCCCTAAACAA R: TGAACACTACTGCCGAGAGAACAC	200	Ma Ron-gcai (2007)
BC89	R06	(AG)7	F: CGTCCGTAGCGCTATTTTTCAGA R: ACGTTGTCGATCGCCAGTTC	199	Ma Ron-gcai (2007)
Bras069	R10	Нет информации	F: CTCGATCTTCCCTGCTTTC R: GTTGAGCCAATCTACGGTTCC	199	Piquemal et al. (2005)
BRMS019	R10	(GT)10	F: CCCAAACGCTTTTGACACAT R: GGCACAATCCACTCAGCTTT	241	Suwabe et al. (2006)
BRMS051	R9	(TC)15	F: GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA R: GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG	262	Suwabe et al. (2006)
BRMS071	C03	(TC)5(TC)28	F: AAAGCGAGAAAAGTGCAGTTGAGAG R: CCACGAAACTACTGCAGATTGAAA	256	Suwabe et al. (2006)
KS31100	Нет информации	Нет информации	F: ATAAGGGCATCGCCTCAACA R: TGCACGCATCCACATAAACA	233	Suwabe et al. (2006)
KS50200	Нет информации	Нет информации	F: ACTAGGGCATCGCCTCAACC R: TGCACGCAGCATATAAAC	148	Suwabe et al. (2006)
Na10D09	C04	Нет информации	F: AAGAACGTCAAGATCCTCTGC R: ACCACCACGGTAGTAGAGCG	273	Lowe et al. (2002)
Na10c03	R1	Нет информации	F: TTGGGTGTCTTTGTTACCCC R: ACCGAGAAGACTGATACGGG	304	Lowe et al. (2002)
Na12c03	C02	Нет информации	F: ATCGTTGCCATTTAGGAGTGG R: ACCAAATTAACCTCTTTGC	272	Lowe et al. (2002)
Na12c08	Нет информации	(GA/CT) ₅₀	F: GCAAACGATTTGTTTACCCG R: CGTGTAGGGTGATCTAGATGGG	315	Lowe et al. (2002)
Ol11B05	C03	Нет информации	F: TCGCGACGTTGTTTGTTC R: ACCATCTTCTCGACCCTG	115	Lowe et al. (2002)
Ol11H06	R9	Нет информации	F: TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R: TTCTTCACTTCACAGGCAG	198	Lowe et al. (2002)
Ol12A04	R10	(GA/CT) ₁₇	F: TGGGTAAGTAAGTGTGGTGGC R: AGAGTTCCGATACTCTGGAGC	138	Lowe et al. (2002)
Ol10D08	C09	Нет информации	F: TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R: GAGCTGTATGTCTCCCGTGC	201	Lowe et al. (2003)
Ol12G04	C08	Нет информации	F: CGAACATCTTAGGCCGAATC R: GGTAACTGCGGGATATTG	157	Lowe et al. (2002)
Ra2E12	C06	Нет информации	F: TGTCAGTGTGTCCACTTCGC R: AGAGAAACCAATAAAGTAGAACC	148	Lowe et al. (2002)
Ra2G09	C02	Нет информации	F: ACAGCAAGGATGTGTTGACG R: GATGAGCCTCTGGTTCAAGC	254	Lowe et al. (2002)

с помощью приложения Clumpak, в котором применяется метод Evanno для определения наиболее вероятного числа генетических групп.

Результаты и обсуждение

Двадцать пять из 35 изученных SSR-локусов оказались полиморфными в изученной выборке генотипов. С помощью специфичных для них праймеров было выявлено 110 полиморфных фрагментов (табл. 3). Одним

из главных параметров, определяющих меру информативности маркеров, является мера информационного полиморфизма PIC. Для выбранных маркеров значения ожидаемой гетерозиготности (H) и PIC не могут превышать 0,5, поскольку для расчетов используется бинарная матрица наличия или отсутствия полиморфного фрагмента. Для отобранных нами локусов значение PIC варьировало от 0,268 до 0,375 и в среднем составило 0,316. Наиболее информативными (PIC > 0,35) оказались локусы BC7, BC51, BC65, KS50200, Ol11B05, которые

Таблица 3. Характеристика полиморфных микросателлитных локусов, выявленных у образцов брокколи

Table 3. Characterization of polymorphic microsatellite loci identified in broccoli

Локус	Размер фрагментов (от...до)	Число аллелей	H	PIC	E	D	R
BC7	105–195	6	0,462	0,355	2,175	0,869	2,25
BC38	144–254	5	0,379	0,307	1,275	0,935	2,15
BC46	108–184	3	0,444	0,345	1,000	0,890	0,100
BC48	139–215	4	0,429	0,337	1,25	0,903	1,90
BC51	99–171	2	0,500	0,375	1,000	0,753	0,100
BC65	162–246	3	0,493	0,371	1,325	0,807	0,750
BC71	158–220	4	0,438	0,342	1,30	0,895	1,90
BC89	137–205	6	0,304	0,258	1,125	0,965	0,250
Br372	162–252	3	0,449	0,348	1,025	0,885	1,55
Bras069	107–217	4	0,424	0,334	1,225	0,907	1,650
BRMS019	102–182	4	0,381	0,308	1,025	0,935	1,75
BRMS051	132–198	3	0,444	0,345	1,00	0,890	1,200
BRMS071	106–190	6	0,324	0,272	1,225	0,958	2,45
KS31100	241–272	5	0,331	0,276	1,05	0,956	0,7
KS50200	122–244	2	0,500	0,375	1,000	0,753	0,100
Na10D09	101–193	5	0,369	0,301	1,225	0,940	1,95
Na12c08	124–254	5	0,389	0,313	1,325	0,930	2,650
Na12H09	170–296	7	0,352	0,290	1,8	0,948	3,0
Ol11B05	96–218	3	0,476	0,362	1,175	0,848	0,45
Ol12F02	151–307	5	0,348	0,287	1,125	0,950	2,15
Ol12A04	168–266	5	0,301	0,256	0,92	0,966	1,75
Ol10D08	183–285	6	0,339	0,281	1,3	0,954	1,5
Ol12G04	122–202	5	0,320	0,268	1,000	0,960	2,00
Ra2E12	100–178	5	0,320	0,268	1,000	0,960	2,000
Ra2G09	143–215	4	0,391	0,322	1,025	0,905	1,75
Средние значения		4,4	0,396	0,315	1,188	0,906	1,52

Примечание: H – ожидаемая гетерозиготность; PIC – мера информационного полиморфизма;

E – эффективное мультиплексное отношение; D – дискриминационная сила; R – разрешающая способность

Note: H – expected heterozygosity; PIC – polymorphism of the information content;

E – effective multiplex ratio; D – discriminating power; R – resolving power

также характеризовались высокими значениями ожидаемой гетерозиготности. Показатель ожидаемой гетерозиготности (H) варьировал от 0,301 до 0,5 и в среднем составил 0,396. Значения эффективного мультиплексного отношения (E) варьировали от 0,258 до 1,3 и в среднем составили 1,12. Праймеры, с помощью которых амплифицировалось большое число полиморфных фрагментов, отличались наиболее высокими значениями E. Показатель дискриминационной силы маркеров (D) варьировал от 0,753 до 0,966 и в среднем составил 0,91. Разрешающая способность (R) варьировала от 0,1 до 3,0 и в среднем составила 1,52.

Наименее полиморфными оказались локусы KS50200 и BC51, имевшие по два аллеля. Максимальное число аллелей (7) выявлено в локусе Na12H09 (см. табл. 3). Среднее число идентифицированных аллелей на локус составило 4,4. Сорта голландской селекции оказались менее полиморфными (в среднем 1,2 фрагмента на маркер), чем сорта селекции Японии и США (в среднем 1,4 фраг-

мента на маркер). В общей сложности у 39 образцов выявлено 10 уникальных аллелей и 12 редких аллелей (встречаются у трех образцов). Уникальные аллельные профили отмечены у образцов: 'Green Sprouting early' и 'Hybrid Express Corona' (локус OI10D08), 'Marathon' (F1) (KS31100), 'Southern Comet Hybrid' (OI12F02), 'Cape Queen (F1)' (BC7), 'Furio' (OI12A04), 'Green Goliath' (Ra2E12), 'Coastle 87038' (BC89), 'Burpees green bud' (BC89) (рис. 1, 2). Число редких аллелей составило от одного до трех в зависимости от локуса. Частота встречаемости отдельных аллелей была очень высокой. Так, аллель 241 пн локуса KS31100 длиной 241 пн был представлен у 84% исследованных образцов, а аллель 201 пн локуса BC65 встречался у 95% образцов. При этом общее число аллелей, выявленное с помощью данных маркеров, составило 5 и 3 соответственно. Аллели 160 пн (локус BC46), 150 пн (BC51), 205 пн (BC89), 153 пн (OI11B05) встречались у всех исследуемых образцов. Возможно, они являются специфичными для культуры.

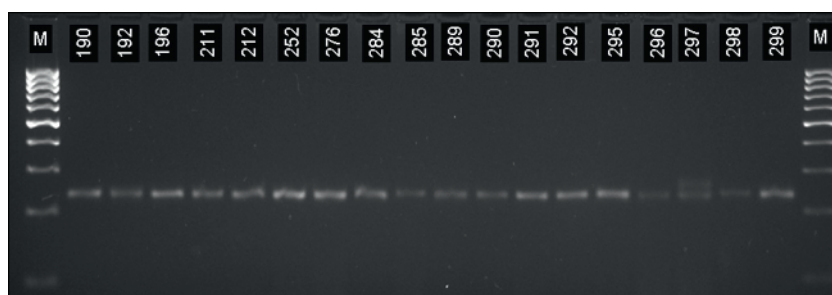


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов брокколи с праймерами к локусу KS31100. Сверху обозначены номера каталога образцов: 190 – Green Sprouting early, 192 – Green Sprouting 47, 196 – Coastle 57051A, 211 – Burpees green bud, 212 – Coastle 87038, 252 – Тонус, 276 – Бонанза, 284 – Hybrid Express Corona, 285 – Clippere #73367 (F1) R.S., 289 – Violet Queen (F1) Purple, 290 – Денди Эрли (F1), 291 – Arcadia (F1), 292 – Emerald City (F1), 295 – Southern Comet Hybrid, 296 – Cape Queen (F1), 297 – Marathon (F1), 298 – Everest (F1), 299 – Comanche (F1). М – маркер молекулярного веса ДНК 100 пн

Fig. 1. The electrophoregram of genomic DNA amplification products in broccoli with the primer KS31100. Presented above are the catalogue numbers of the accessions: 190 – Green Sprouting early, 192 – Green Sprouting 47, 196 – Coastle 57051A, 211 – Burpees green bud, 212 – Coastle 87038, 252 – Tonus, 276 – Bonanza, 284 – Hybrid Express Corona, 285 – Clippere #73367 (F1) R.S., 289 – Violet Queen (F1) Purple, 290 – Dandy Early (F1), 291 – Arcadia (F1), 292 – Emerald City (F1), 295 – Southern Comet Hybrid, 296 – Cape Queen (F1), 297 – Marathon (F1), 298 – Everest (F1), 299 – Comanche (F1). М – 100 bp DNA molecular weight marker

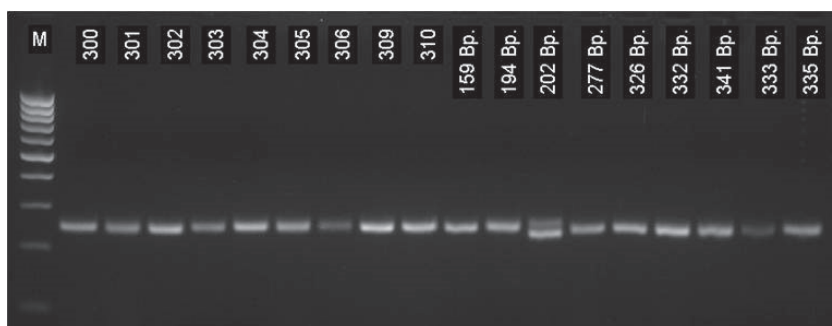


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов брокколи с праймерами к локусу OI12A04 образцов брокколи: 300 – Senshi (F1), 301 – Triathlon (F1), 302 – El Centro, 303 – Charade (F1), 304 – Decathlon (F1), 305 – Monterey (F1), 306 – Pentathlon (F1), 309 – Medway (F1), 310 – Nutri-bud, 159 вр. – Sureen, 194 вр. – Fordhook Late Hybrid, 202 вр. – Packman (F1), 277 вр. – Green Goliath, 326 вр. – Patriot (F1), 332 вр. – Agassi (F1), 333 вр. – 25-91 RZ, 335 вр. – OPV-12317. М – маркер молекулярного веса ДНК 100 пн

Fig. 2. The electrophoregram of genomic DNA amplification products in broccoli with the primer OI12A04. Presented above are the catalogue numbers of the accessions: 300 – Senshi (F1), 301 – Triathlon (F1), 302 – El Centro, 303 – Charade (F1), 304 – Decathlon (F1), 305 – Monterey (F1), 306 – Pentathlon (F1), 309 – Medway (F1), 310 – Nutri-bud, 159 вр. – Sureen, 194 вр. – Fordhook Late Hybrid, 202 вр. – Packman (F1), 277 вр. – Green Goliath, 326 вр. – Patriot (F1), 332 вр. – Agassi (F1), 333 вр. – 25-91 RZ, 335 вр. – OPV-12317. М – 100 bp DNA molecular weight marker

Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 25 SSR-маркеров, были использованы для построения дендрограммы генетического сходства сортов и гибридных популяций стержневой коллекции брокколи (рис. 3).

На дендрограмме выделились четыре больших кластера. Образцы, входящие в состав кластеров, различались размером головки, а также наличием/отсутствием и количеством пасынков. В первом кластере расположены самые позднеспелые образцы, образующие одну крупную головку. Во второй кластер вошли в основном скороспелые образцы. В третьем кластере

находились образцы среднеспелые, образующие одну головку среднего размера. В четвертом кластере расположились образцы с высокой пасынкообразовательной способностью. Значение PIC не превышало 0,38, что могло быть обусловлено как особенностью культуры брокколи (ее узкой генетической основой), так и составом анализируемой коллекции.

Анализ распределения генотипов в программе STRUCTURE показывает, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой популяции на четыре кластера ($K = 4$), которые соответствуют четырем группам генотипов (рис. 4).

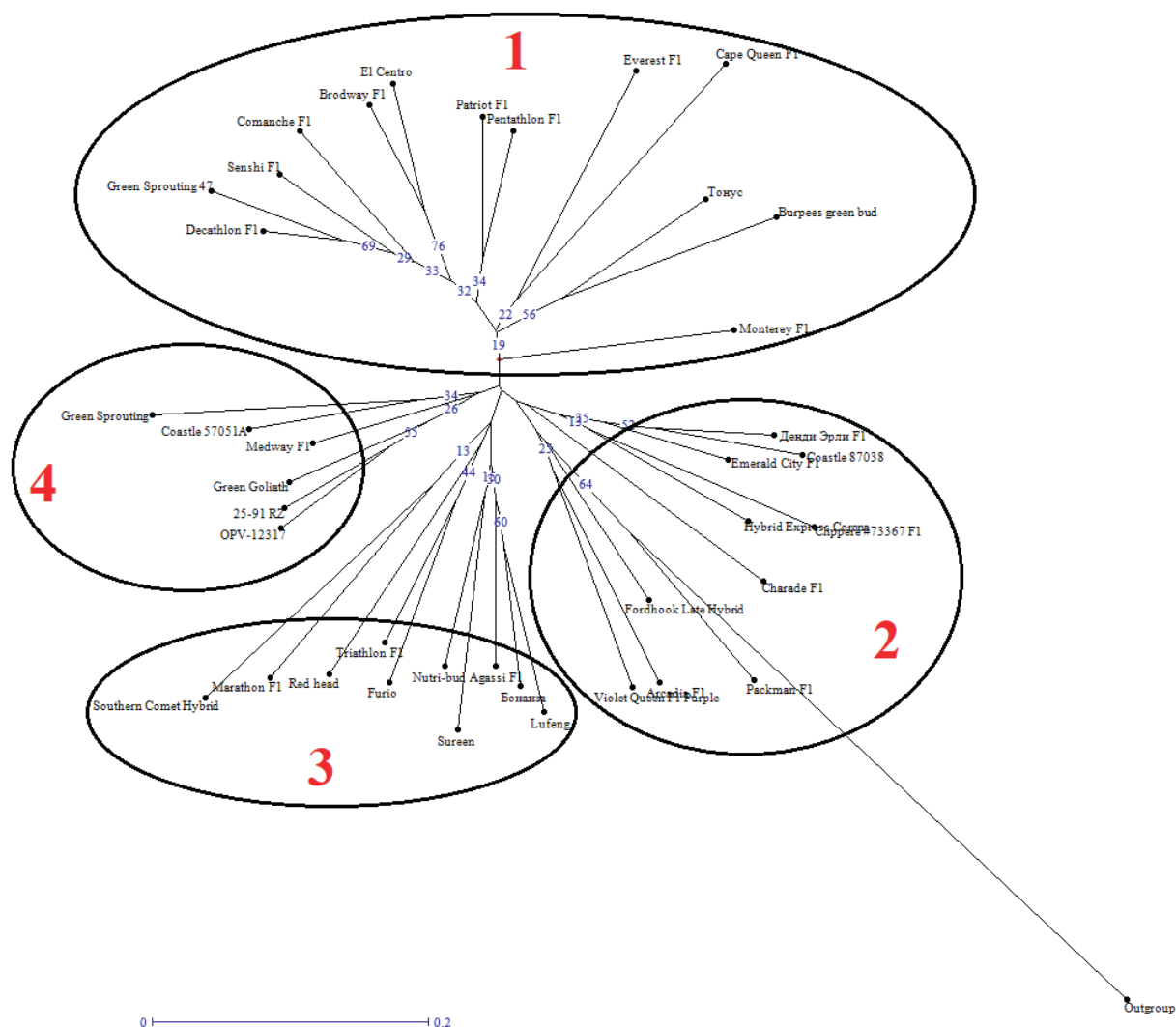


Рис. 3. Дендрограмма кластеризации образцов брокколи, построенная по результатам молекулярно-генетического анализа

Fig. 3. The dendrogram showing clustering of broccoli accessions based on molecular genetic analysis

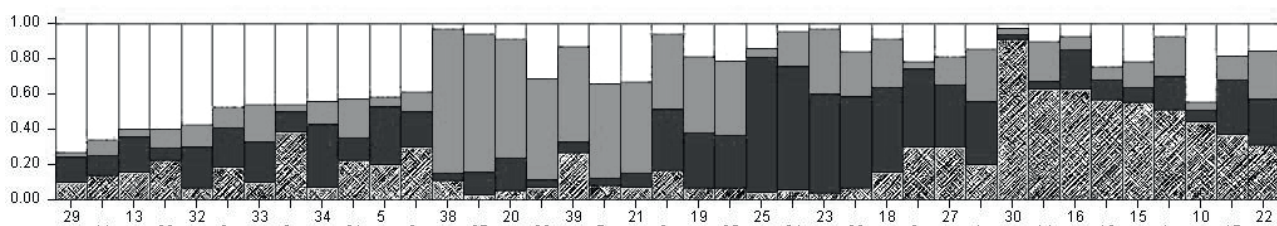


Рис. 4. Результаты определения генотипической структуры изученной выборки образцов в программе STRUCTURE 2.3.4

Fig. 4. The results of genotypic structure identification in the studied accessions via STRUCTURE 2.3.4 software

Заключение

Генотипирование 39 образцов стержневой коллекции брокколи (*B. oleracea* var. *italica*) с использованием 25 микросателлитных локусов позволило разделить изученную стержневую коллекцию на четыре группы, соответствующие морфологическим и фенологическим особенностям образцов. Первую группу составили образцы, характеризующиеся позднеспелостью и образующие одну крупную головку. Во второй группе сконцентрировались раннеспелые образцы, в третьей – среднеспелые, образующие одну головку среднего размера, а в четвертой – образцы с высокой пасынкообразовательной способностью. Результаты исследований показали, что сорта селекции Японии и США характеризуются большим полиморфизмом в сравнении с сортами европейской селекции. В сортах американской селекции выявлено наибольшее число редких и уникальных аллелей. У изученных образцов стержневой коллекции брокколи установлен высокий полиморфизм отдельных микросателлитных локусов. С помощью отобранного нами набора из 7 SSR-маркеров (OI10D08, KS31100, OI12F02, BC7, OI12A04, Ra2E12, BC89) могут быть идентифицированы и паспортизированы 10 образцов брокколи. Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения протестированных маркеров при оценке генетического разнообразия брокколи, а также при разработке методов идентификации и паспортизации сортов.

References/Литература

- Amiryousefi A., Hyvönen J., Pocza P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 2018;6(6):e01159. DOI: e01159.10.1002/aps3.1159
- Artemyeva A.M., Budahn H., Chesnokov Yu.V. Association mapping of morphological and physiological-biochemical traits in *Brassica rapa* L. species. *Russian Agricultural Sciences*. 2013;39(4):107-111. DOI: 10.3103/S1068367413020031
- Artemyeva A.M., Klocke E., Chesnokov Yu.V. Molecular analysis of phylogenetic relationships of cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Bulletin of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders*. 2009;13(4):759-771. [in Russian] (Артемяева А.М., Клоке Э., Чесноков Ю.В. Анализ филогенетических связей вида *Brassica oleracea* L. (Капуста огородная). *Информационный вестник ВОГуС*. 2009;13(4):759-771).
- Artemyeva A.M., Solovieva A.E. Genetic diversity and biochemical value of *Brassica* L. cabbage plants. *Bulletin of NSAU (Novosibirsk State Agrarian University)*. 2018;49(4):50-61. [in Russian] (Артемяева А.М., Соловьева А.Е. Генетическое разнообразие и биохимическая ценность капустных овощных растений рода *Brassica* L. *Вестник новосибирского государственного аграрного университета*. 2018;49(4):50-61). DOI: 10.31677/2072-6724-2018-49-4-50-61
- Domblides A.S., Domblides E.A., Bondareva L.L., Pivovarov V.F. Classification of national variety accessions of cabbage *Brassica oleracea* L. with the use of SSR markers. *Vegetable Crops of Russia*. 2018;(5):9-12. [in Russian] (Домблидес А.С., Домблидес Е.А., Бондарева Л.Л., Пивоваров В.Ф. Классификация отечественных сортов капусты *Brassica oleracea* L. с использованием SSR-маркеров. *Овощи России*. 2018;(5):9-12). DOI: 10.18619/2072-9146-2018-5-9-12
- Falush D, Stephens M, Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164(4):1567-1587.
- Izzah N.K., Lee J., Perumal S., Park J.Y., Ahn K. Fu D. et al. Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial *Brassica oleracea* L. cultivars belonging to six varietal groups *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013;60(7):1967-1986. DOI: 10.1007/s10722-013-9966-3
- Liu S., Liu Y., Yang X., Tong C., Edwards D., Paterson A.H. et al. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*. 2014;5:3930. DOI: 10.1038/ncomms4930
- Lou P., Zhao J., Kim J.S., Shen S., Del Carpio D.P., Song X. et al. Quantitative trait loci for flowering time and morphological traits in multiple population of *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany*. 2007;58(14):4005-4016. DOI: 10.1093/jxb/erm255
- Lowe A.J., Jones A.E., Raybould A.F., Trick M., Moule C.J., Edwards K.J. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(1):7-11. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00126.x
- Lowe A.J., Moule C.L., Trick M., Edwards K.J. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108(6):1103-1112. DOI: 10.1007/s00122-003-1522-7
- Piquemal J., Cinquin E., Couton F., Rondeau C., Seignoret E., Doucet I. et al. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *TAG. Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111(8):14-23. DOI: 10.1007/s00122-005-0080-6
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
- Shapturenko M.N., Pechkovskaya T.V., Vakula S.I., Jakimovich A.V., Zabara Yu.M., Khotyleva L.V. Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(1):51-56. [in Russian] (Шаптуренко М.Н., Печковская Т.В., Вакула С.И., Якимович А.В., Забара Ю.М., Хотылева Л.В. Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(1):51-56). DOI: 10.18699/VJ16.133
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T. et al. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana* the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics*. 2006;173(1):309-319. DOI: 10.1534/genetics.104.038968
- Tonguç M., Griffiths P.D. Genetic relationships of *Brassica* vegetables determined using database derived simple sequence repeats. *Euphytica*. 2004;137(2):193-201. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000041577.84388.43
- VegMarks: A DNA marker database for vegetables. 2006-2020. Available from: <https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/> [accessed Aug. 12, 2020].
- Walley P.G., Carder J., Skipper E., Mathas E., Lynn J., Pink D. et al. A new broccoli × broccoli immortal mapping population and framework genetic map: tools for breeders and complex trait analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012;124(3):467-477. DOI: 10.1007/s00122-011-1721-6

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Фатеев Д.А., Артемьева А.М. Молекулярно-генетическая характеристика образцов брокколи (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) коллекции ВИР. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020;181(3):91-99. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-91-99

Fateev D.A., Artemyeva A.M. Molecular genetic characteristics of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) from the VIR collection. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2020;181(3):91-99. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-91-99

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-91-99>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

ORCID

Fateev D.A. <https://orcid.org/0000-0002-1075-6704>

Artemyeva A.M. <https://orcid.org/0000-0002-6551-5203>