

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, СХОЖИЕ С МГЭ II КЛАССА,
В ГЕНОМАХ ВИДОВ РОДА *Brassica* L.*

А.М. АРТЕМЬЕВА, А.Г. ДУБОВСКАЯ, А.Е. СОЛОВЬЕВА, Ю.В. ЧЕСНОКОВ

На основе данных литературы и собственных исследований рассматривается генетическая нестабильность геномов у видов рода *Brassica* и возможности использования первичных нуклеотидных последовательностей, схожих с мобильными генетическими элементами (МГЭ) II класса (Ac, MuDR, Far1 и САСТА), при создании молекулярных маркеров для оценки генетического разнообразия культур семейства *Brassicaceae* L. Представлены результаты ПЦР-оценки распространения и полиморфизма маркеров на основе элементов Ac, MuDR, Far1 и САСТА у образцов, представляющих виды этого семейства в мировой коллекции ВИР (Всероссийский НИИ растениеводства), в связи с обсуждением их филогении.

Ключевые слова: виды рода *Brassica*, мобильные генетические элементы Ac, MuDR, Far1, САСТА, сохраняемое генетическое биоразнообразие.

Keywords: species *Brassica*, mobile genetic elements Ac, MuDR, Far1, САСТА, preserved genetic biodiversity.

Разработанная Николаем Ивановичем Вавиловым теория мобилизации и изучения генетических ресурсов растений, которая базировалась на знании ботаники, географии, истории, эволюционного учения, становится все более актуальной в современных условиях глобальных климатических изменений и усиления антропогенного воздействия, приводящего к обеднению генофонда как культурных, так и диких видов. Еще с начала XX века, основываясь на этой теории, Н.И. Вавилов с соратниками организовали целенаправленные экспедиционные сборы, что позволило создать уникальную мировую коллекцию культурных видов растений ВИР (Всероссийский институт растениеводства), в том числе экономически важных культур семейства *Brassicaceae* L.

Первые образцы овощных и масличных культур семейства поступили в коллекцию ВИР в 1921 году в результате экспедиций Н.И. Вавилова в страны Западной Европы, США и Канаду, затем в Афганистан, Иран, Армению. Российские селекционные и местные сорта были привлечены сначала через Всесоюзную сельскохозяйственную выставку, затем в ходе экспедиций в Северо-Западный регион, на Алтай и Дальний Восток. Были организованы экспедиции в страны древней земледельческой культуры: в Средиземноморье, Эфиопию, Западный Китай — под руководством Н.И. Вавилова, в Малую Азию — П.М. Жуковского, в Индию — В.В. Марковича и др. Еще при жизни Н.И. Вавилова коллекция капусты, например, уже включала 1500 образцов. В результате этой деятельности сложился «...исходный потенциал видового разнообразия морфологических и физических свойств, необходимых для селекции и генетики» (1). Ботанико-географическое изучение масличных и овощных корнеплодных растений семейства осуществлялось в ВИР под руководством Е.Н. Синской с 1921 года, капустных культур — под руководством Т.В. Лизгуновой с 1926 года. Результатами этих исследований стали монографии, в которых была описана классификация, особенности изменчивости признаков, характеристики сортов и сортоформ, генетические основы селекции (2-5).

Происхождение, эволюция и филогенетические отношения шести представителей рода *Brassica*, входящих в треугольник U (треугольник

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-90104-Мол_а.

Brassica) — *B. nigra* (L.) Koch., *B. oleracea* L., *B. rapa* L., *B. napus* L., *B. juncea* (L.) Czern., *B. carinata* A. Braun в целом определены. N. U (6) предложил графическое изображение их филогенетических взаимоотношений, когда аллотетраплоидные формы образуют стороны треугольника и находятся между слагающими их диплоидными формами, расположенными на вершинах треугольника. Согласно N. U, *B. napus* (AACC, $2n = 4 \times = 38$), *B. juncea* (AABB, $2n = 4 \times = 36$) и *B. carinata* (BBCC, $2n = 4 \times = 34$) произошли при естественной межвидовой гибридизации между парами диплоидных видов — соответственно *B. rapa* (AA, $2n = 2 \times = 20$) \times *B. oleracea* (CC, $2n = 2 \times = 18$), *B. rapa* \times *B. nigra* (BB, $2n = 2 \times = 16$) и *B. nigra* \times *B. oleracea*.

Степень морфологической вариации этих культивируемых видов огромна. Однако таксономическое положение некоторых диких представителей рода, а также внутривидовых таксонов у капусты огородной *B. oleracea* и репы *B. rapa* остается предметом дискуссии (7-9). Так, крупнейший современный ботаник и систематик семейства *Brassicaceae* С. Gomez-Campo (7) разделил виды рода *Brassica* на два подрода: *Brassica* (27 видов) и *Brassicaria* (Godr.) Gomez-Campo (11 видов). В подрод *Brassica* входят пять секций: *Brassica*, *Rapa* (Miller) Salmeen, *Micropodium* DC, *Brassicoides* Boiss. и *Sinapistrum* Willkomm. Секция *Brassica* объединяет капусту огородную *B. oleracea*, капусту абиссинскую *B. carinata* ($n = 17$, геном BC), а также родственные капусте огородной средиземноморские виды ($n = 9$, геном C). Предполагается, что гены последних интрогрессировали в вид *B. oleracea* и, следовательно, в становлении различных культурных разновидностей капусты участвовали дикие виды — *B. cretica* Lam., *B. incana* Ten, *B. rupestris* Rafin, *B. macrocarpa* Guss., *B. montana* Pourret, *B. villosa* Raimondo and Mazzola, *B. insularis* Moris., *B. hilarionis* Post., *B. botteri* Vis. В то же время Т. Gladis и К. Hammer (9) включают их в вид *B. oleracea* в ранге подвидов. Неясно таксономическое положение близких таксонов, предварительно описанных как виды, — *B. alboglabra* Bailey и единственного дикого вида на территории бывшего СССР, эндемика Крыма *B. taurica* Tzvel. Большинство исследователей относят *B. alboglabra* к *B. oleracea*, а *B. taurica* — к *B. incana* в ранге подвидов (8, 10). До сих пор остается неизвестным происхождение капусты Турнефора *B. tournefortii* Gouan. ($n = 10$).

Секция *Rapa* объединяет репу *B. rapa*, рапс *B. napus* и горчицу сарептскую *B. juncea*. Вид *B. rapa* L. включает важные масличные, овощные и кормовые культуры, листовые и корнеплодные и широко распространен на земном шаре. Вид представлен столь огромным разнообразием форм, возникшим в процессе эволюции и доместикизации, что многие внутривидовые таксоны имели в предыдущих классификациях ранг видов (11, 12). G. Olsson (13), доказав свободную скрещиваемость по Бейли (11) и общую кариологию, объединил их в один вид — *B. rapa*. Последние классификации вида (8, 9, 14) все еще носят предварительный характер из-за недостаточности знаний о происхождении, становлении и внутривидовых взаимоотношениях и требуют доработки на основе молекулярно-генетических исследований, которые также позволяют устанавливать факторы, влияющие на частоту и спектр генотипической изменчивости и определяющие морфобиологические вариации у видов рода *Brassica*.

В целом триба *Brassicaceae* содержит примерно 240 видов, включая виды рода *Brassica*. Различные методы анализа позволили разделить виды *Brassica* на две эволюционные ветви: *B. nigra* (В геном) и *B. rapa* (А)/*B. oleracea* (С), которые генетически обособились 7,9 млн лет назад. Геном А произошел от уже сформированного генома С 3,3-4,0 млн лет назад. Ге-

номная редукция, ставшая результатом делеций, была обнаружена в триплицированных блоках *B. oleracea*, *B. rapa* и *B. napus* при сравнении с соответствующими геномными районами *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Примерно у $1/3$ генов *Brassica* имеются гомологи в соответствующих областях генома арабидопсиса. Однако геном *Brassica* содержит намного больше транспозоноподобных последовательностей и псевдогенов.

Полиплоидия, столь широко представленная в роде *Brassica*, играет одну из основных ролей в эволюции растительных геномов (15). Подобный факт, вероятно, объясняется тем, что полиплоидизация не только приводит к определенному увеличению генома относительно предшествующего, но также сопровождается связанными с этим структурными и функциональными модификациями, которые, несомненно, представляют собой важный источник новообразований (16, 17). Недавние исследования продемонстрировали, что геном формирующихся полиплоидов, как правило, нестабилен, динамичен и к тому же подвержен влиянию генетической и эпигенетической регуляции (18, 19). Одним из факторов, определяющих такое состояние, могут быть мобильные генетические элементы, придающие хозяйскому геному растений пластичность, столь необходимую для адаптации организма к стрессорам.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) были описаны 60 лет назад у кукурузы. По механизму перемещения (наличие или отсутствие промежуточной РНК при транспозиции) их подразделяют на два класса: к I классу относятся ретротранспозоны, у которых перемещение происходит через образование РНК-посредника с использованием обратной транспозазы для его перевода в ДНК, ко II — ДНК-транспозоны, осуществляющие транспозицию напрямую от ДНК к ДНК. Наши исследования посвящены МГЭ II класса. Первым детально исследованным мобильным элементом стал Activator (Ac) (20, 21). Ac — просто устроенный и сравнительно небольшой (всего 4565 п.н.) автономный мобильный элемент, содержащий концевые инвертируемые повторы (TIR — terminal inverted repeats) длиной 11 п.н., у которых самые дальние от середины нуклеотиды некомплементарны (22). Благодаря размеру, структурной организации и последовательности нуклеотидов в TIR Ac имеет значительное сходство с элементом Tam3 у *Antirrhinum majus* (23), а также с hobo и P элементами у *Drosophila melanogaster* (24, 25). Нуклеотидный состав Ac тенденциозен. Так, содержание G + C на участках размером 240 п.н. с 5'- и 3'-конца составляет соответственно 45 и 40 %. В противоположность этому доля G + C в длинной нетранслируемой последовательности равна 68 %, а в кодирующей части элемента — 38 % (26). Столь невыравненная нуклеотидная композиция разных сегментов Ac отражает их неодинаковые функции. Кроме того, многочисленные CpG мотивы на концах Ac могут означать, что эти последовательности защищены белками (возможно, всегда), поскольку многие из них содержат сайт узнавания транспозаз (27, 28).

Следующий МГЭ II класса, который контролирует транспозицию мобильных элементов семейства Mutator (Mu) у кукурузы, — MuDR. Американские ученые установили, что существуют два основных MuDR-гомологических транскрипта, наличие которых коррелирует с активностью элементов Mu. Все активные формы Mutator содержат MuDR. Например, у типичных Mu-форм имеется от 5 до 30 таких элементов (29), хотя у некоторых был обнаружен всего один элемент MuDR (30, 31). В однокопийных линиях элиминация MuDR приводит к потере активности элемента Mutator (30). Мультикопийные Mu-формы, спонтанно утратившие активность, продолжают сохранять в геномах элементы MuDR (32, 33). Несмотря

на присутствие MuDR, инактивированные линии не экспрессируют транскрипты MuDR (29). Следовательно, такие транскрипты могут кодировать белки, необходимые для транспозиции элементов Mu (34). Именно поэтому мы остановили выбор на MuDR для дизайна одного из классов праймеров.

Сходством с транспозазами Mutator обладают FHY3 (far-red elongated hypocotils 3) и FAR1 (far-red impaired response) — гомологичные белки, необходимые для контролируемого фитохромом А ответа на воздействие светом дальней красной области спектра ($\lambda \approx 730$ нм) у *Arabidopsis thaliana* (35, 36). В геноме арабидопсиса существуют 12 дополнительных сопутствующих генов FHY3/FAR1. У полипептидов из этого семейства длина варьирует от 531 до 851 аминокислоты и в молекуле по всей длине от 12,0 до 82,4 % позиций представлены идентичными аминокислотами. Проработка существующих баз данных и филогенетический анализ позволили установить, что последовательности, схожие с последовательностями генов FHY3/FAR1, имеются у разных покрытосеменных растений. Они подразделяются на несколько филогенетических кластеров, перемежающихся семейством Mutator, кодирующим транспозазы, и подобными им последовательностями (36).

К характерным особенностям одной из групп транспозонов II класса, получивших название элементов САСТА, относится наличие наиболее отдаленных от середины инвертированных концевых повторов (TIR) длиной обычно 10-28 п.н., которые заканчиваются консервативным мотивом 5'-САСТА-3'. При этом внутренние последовательности элементов САСТА высоковариабельны. Кроме того, указанная группа МГЭ II класса перед инсерцией обычно образует целевой сайт дупликации из 3 п.н. Субконцевые повторы, как правило, служат местом связывания транспозаз и совместно с концевыми инвертированными повторами действуют как cis-элементы транспозонов (37, 38). Впервые элементы САСТА обнаружили в 1953 году у кукурузы (39). Это были En (Enhancer)-I (Inhibitor) и Spm (Suppressor-Mutator)-dspm МГЭ. С тех пор подобные элементы нашли у львиного зева (38), сои (40), моркови (41), сорго (42), петунии (43), гороха (44), риса (45) и арабидопсиса (46).

Следует отметить, что, несмотря на столь обширный материал баз данных и множество опубликованных результатов, среди видов растений, изученных на наличие упомянутых выше МГЭ II класса, нет представителей рода *Brassica*. Исключение составляет *A. thaliana* с полностью секвенированным геномом (www.arabidopsis.org), у которого ранее были обнаружены элементы Far1 и САСТА. Однако роды *Arabidopsis* и *Brassica* относятся к разным трибам семейства.

Сравнительный анализ, проведенный с привлечением методов биоинформатики, показал, что геномы модельного растения *A. thaliana* L. и капусты огородной *B. oleracea* L. ($n = 9$, геном CC), от которого произошел вид *B. rapa*, несут одни и те же мобильные элементы, хотя и в разных соотношениях, обусловленных в том числе различиями в размере генома (47). Этот результат соответствует высокой степени геномного консерватизма у двух видов, дивергировавших 15-20 млн лет назад (48). У *Arabidopsis*, который содержит все известные типы мобильных элементов, геном полностью секвенирован (49), тогда как у *Brassica* до сих пор только очень малая часть таких элементов изучена на молекулярном уровне, при этом главным объектом исследования были МГЭ I класса. Ранее установлено, что в геноме *B. oleracea* среди МГЭ II класса наиболее широко распространены элементы САСТА (47). В роде *Brassica* САСТА транспозон Bot1 прошел несколько раундов амплификации только в геноме *B. oleracea* в отличие от генома *B. rapa*, что сыграло главную роль в недавней диверген-

ции двух геномов (50). Теми же авторами выявлен специфичный для С-генома сегмент Bot1. В геномах *B. rapa* и *B. napus* (ААСС) они обнаружили присутствие Bot1-подобных элементов САСТА, определили их размер и идентифицировали TIR-последовательности. В наших исследованиях с помощью S-SAP анализа (sequence-specific amplification polymorphism) удалось установить, насколько широко Bot1-подобные элементы САСТА распространены в геноме *B. rapa*, и было показано, что полученные на основе их последовательностей специфичные маркеры можно использовать для уточнения внутривидовой классификации *B. rapa*. Кроме того, эти эксперименты продемонстрировали эффективность совместного применения двух типов молекулярных маркеров, созданных на основе различных групп повторяющихся последовательностей ДНК (тандемно организованных микросателлитов и дисперсно покрывающих геном мобильных элементов САСТА) для филогенетических построений у вида *B. rapa* (51).

Целью настоящей работы было установление наличия в геномах видов рода *Brassica* последовательностей, схожих с мобильными генетическими элементами II класса — Ac, MuDR, Far1 и САСТА. Это позволяет глубже раскрыть генетическую природу изменчивости, филогенетического родства и механизмов эволюции видов, что Н.И. Вавилов относил к основным задачам генетико-селекционного изучения коллекций генетических ресурсов.

Методика. Исследование проводили на генетически и морфологически разнообразных представителях четырех из пяти секций подрода *Brassica*. Всего было изучено 45 образцов из коллекции Всероссийского НИИ растениеводства (ВИР), включая горчицу полевую *Sinapis arvensis* L., содержащую геном S.

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала Трис-НСl (66 мМ, рН 8,4), сульфат аммония (16 мМ), хлорид магния (2 мМ), Твин 20 (0,1 %), глицерин (7 %), бычий сывороточный альбумин (100 мкг/мл), dNTP (по 0,2 мМ), праймер (для каждого по 5 пМ) и 1,25 ед. Таq-полимеразы. Реакцию проводили в следующих условиях: денатурация при 95 °С (1 мин), элонгация при 72 °С (1 мин), температура отжига и число циклов амплификации — оптимизированы в зависимости от эксперимента (52-54) (амплификатор С1000 фирмы «BioRad», США); электрофоретический маркер молекулярных масс — 100 kb Ladder («Gibco BRL», Великобритания, «Fermentas», Литва). Праймеры были гомологичны участкам последовательности Ac и MuDR в геноме кукурузы, а также Far1 и САСТА — в геноме арабидопсиса. Для Ac использовали праймеры (соответственно прямые и обратные) E16 (5'-AAT CCC GTA CCG ACC GTT ATC-3') и E17 (5'-AGA GAG GCA GAG CAG CGT TC-3'), E15 (5'-CAG GGA TGA AAG TAG GAT GGG A-3') и D3 (5'-GAA ACG GTC GGG AAA STA GCT C-3'), E20 (5'-TGA CAG ATG AGC CTT GGT TGT AAT-3') и E21 (5'-CGA ACG GGA TAA ATA CGG TAA TCG-3'), D2 (5'-CCC GTC CGA TTT CGA CTT T-3') и E22 (5'-TTA ACT TGC GGG ACG GAA AC-3'); для MuDR (соответственно прямые и обратные) — D12 (5'-GGT TGA AGC AGT TAA GGC CTC A-3') и D13 (5'-ATG STA TTC AAG AAA TGA GGA GGC-3'), D14 (5'-TCA TCT ACG GAA GGG TTG TC-3') и D15 (5'-GGT CGT TTA TCT CTT CGA ACC TGT-3'), E4 (5'-CGC GGT ATT TGT TGC TGA GA-3') и E5 (5'-TTG CTG AGA AGG AGG CCA AG-3'), E6 (5'-CCT CAT CGA ATG TGG TAT GGA TTA-3') и E7 (5'-TTT CCC ATA GCT CTG GAT CTT CTG-3'); для Far1 (соответственно прямые и обратные) — D10 (5'-CAT GGC TTG CTG ATT CGT GAA-3') и D11 (5'-TTG GGC AGA ACT CAA ATG CTC-3'), E11 (5'-TCG GCA TGC TTT GAT GAT TC-3') и E13 (5'-TGG TTG CAA GCT CTG TTG AGA-3'); для САСТА — D5 (5'-

CCC TTG GTT GTG CAT GAA GA-3') (прямой), а также D6 (5'-GCA CCT GAC GCA TCC AGA A-3') и D7 (5'-AGC AGT GCG GCT CTC ATA GG-3') (обратные).

Результаты. В качестве объектов изучения отобрали достаточно разнообразных генетически представителей четырех из пяти секций подрода *Brassica*, в том числе полиплоидных (табл. 1).

Для выполнения молекулярно-генетического анализа с применением ПЦР нами были сконструированы праймеры, гомологичные 5'- и 3'-области последовательности Ac в геноме кукурузы (52), а также участкам из области MudrB (53) МГЭ MuDR, имеющимся в базе данных GenBank (Na-

1. Образцы рода *Brassica* L., исследованные на наличие последовательностей, схожих с МГЭ II класса, и использованные при этом праймеры (мировая коллекция ВИР, Всероссийский НИИ растениеводства)

№ по каталогу ВИР	Название	Происхождение	Набор пар праймеров
Капуста огородная <i>Brassica oleracea</i> L. (геном С)			
<i>Белокочанная B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>capitata</i> f. <i>alba</i>			
к-2418	Белоснежка	Украина	D5-D7, E16-E17
к-2516	Русиновка	Беларусь	D5-D7, E16-E17
<i>Краснокочанная B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>			
к-172	Herbst rot	Германия	D5-D7, E16-E17
к-173	Late Winter	Нидерланды	D5-D7, E16-E17
<i>Савойская B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>sabauda</i>			
к-328	Hammer	Нидерланды	D13-D14, D5-D7, E16-E17
к-346	Chieftain Savoy	Канада	D5-D7, E16-E17
<i>Кольраби B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>gongylodes</i>			
к-231	Kashmere	Пакистан	D5-D7, E16-E17
к-279	Knaufs Ideal	Германия	D5-D7, E16-E17
<i>Брюссельская B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>gemmifera</i>			
к-151	Pilar F ₁	Нидерланды	D5-D7, E16-E17
<i>Листовая B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>acephala</i>			
к-362	Пальмира	Россия	D5-D7, E16-E17
к-363	Краски Востока	Россия	D13-D14, D5-D7, E16-E17
<i>Цветная B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>			
к-592	Отечественная	Россия	D5-D7
к-609	Cambridge 6	Великобритания	D5-D7, E16-E17
<i>Брокколи B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>italica</i>			
к-285	Slipper F ₁	Нидерланды	D5-D7
к-292	Emerald city F ₁	Япония	D5-D7
Средиземноморские виды, родственные <i>B. oleracea</i> L. (геном С)			
вр. 2	<i>B. incana</i>	Германия	D5-D7, E16-E17
к-6587	<i>B. villosa</i>	Италия	D5-D7
к-6343	<i>B. cretica</i>	Италия	D5-D7
к-7356	<i>B. insularis</i>	Италия	D5-D7
<i>B. tournefortii</i> Gouan. (геном Т)			
вр. 9	Капуста Турнефора	Франция	E11-E14, D5-D7
<i>B. rapa</i> L. (геном А)			
<i>Капуста пекинская B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> Hanelt			
к-312	Дусе	Корея	D5-D7
<i>Капуста розеточная B. rapa</i> ssp. <i>rosularis</i> Hanelt			
к-117	Сяо-байе-тацай	Китай	D5-D7
<i>B. napus</i> L. (геном АС)			
<i>Брюква B. napus rapifera</i>			
к-591	Мустиала	Швеция	D5-D7
к-264	Гофманская белая	Германия	D5-D7
к-415	Бангольмская	Германия	D5-D7
к-437	Вышегородская	Россия	E11-E14, D5-D7, E16-E17
к-679	Куузику	Эстония	D13-D14, D5-D7, E16-E17
<i>Panc B. napus oleifera</i> Metzg.			
к-4719	f. <i>annua</i> , Juvel	Швеция	E11-E14, D5-D7
к-4721	f. <i>annua</i> , Westar	Канада	E11-E14, D5-D7
к-4920	f. <i>annua</i> , Ратник	Россия	E11-E14, D5-D7
к-4963	f. <i>biennis</i> , Polo	Польша	D5-D6, D5-D7
Горчица сарептская <i>B. juncea</i> (L.) Czern. (геном АВ)			
к-4619	Тавричанка 10	Россия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
к-4630	Yalisko	Мексика	D13-D14, E11-E14, D5-D6
к-4667	Siromo	Австралия	D13-D14, D5-D6, D5-D7
к-4512	Суздальская	Россия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
Горчица черная <i>B. nigra</i> (L.) Koch. (геном В)			
к-2666	Местная	Франция	E11-E14, D5-D7
к-2669		Дания	E11-E14, D5-D6, D5-D7

к-2671	Местная	Германия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
к-2673	Alaska	Австралия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
Капуста абиссинская <i>B. carinata</i> R. Braun (геном BC)			
к-4517	BCRIDA - 171	Индия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
к-4676	Местная 3/10	Эфиопия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
к-4677	Местная 10/5	Эфиопия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
к-4704	BRA 1031/79	Австралия	E11-E14, D5-D6, D5-D7
Синтетический гексаплоид <i>B. composita</i> (геном ABC)			
к-4		Россия	D5-D7
Горчица полевая <i>Sinapis arvensis</i> L. (геном S)			
вр. 11		Франция	D5-D6, D5-D7

Примечание. МГЭ — мобильные генетические элементы. Праймеры соответствуют приведенным в таблице 2, с которыми у указанного генотипа получена амплификация. Пропуски означают, что название отсутствует.

tional Center for Biotechnology Information — NCBI). Дополнительно аналогичным образом создали праймеры, которые использовались при изучении последовательностей *FagI* и *САСТА* (54).

Проведенное изучение показало достаточно высокую степень межвидового полиморфизма между членами рода *Brassica* и близкого рода *Sinapis*. Всего наблюдали 19 полиморфных фрагментов (табл. 2) при размере амплифицированных от 150 до 1000 п.н. Были обнаружены фрагменты, видоспецифичные для всех естественных форм, содержащих В-геном: ампликоны размером 150 п.н., полученные с праймерами E11-E14, и 200 п.н. — с D5-D6, а также фрагменты, свойственные только исходному диплоидному виду (горчица черная, геном В), длиной 270, 330 и 520 п.н., полученные с праймерами E11-E14. В то же время синтетический гексаплоид *B. composita* (геном ABC) содержал только фрагмент, присутствующий у всех исследованных образцов рода *Brassica* и у горчицы полевой *Sinapis arvensis* (геном S) (200 п.н., праймеры D5-D7).

2. Частота встречаемости амплифицированных фрагментов ДНК МГЭ II класса у образцов родов *Brassica* L. и *Sinapis* L. с разными геномами (мировая коллекция ВИР, Всероссийский НИИ растениеводства)

Пара праймеров	Размер ампликона, п.н.	Число образцов, несущих аллель/общее число образцов с указанным геномом									
		А	В	С		AB	AC	BC	ABC	T	S
				культурные	дикие						
D13-D14	320	—	—	—	—	2/4	1/9	—	—	—	—
E11-E14	150	—	4/4	—	—	3/4	—	4/4	—	—	—
	270	—	2/4	—	—	—	—	—	—	—	—
	330	—	2/4	—	—	—	—	—	—	—	—
	400	—	—	—	—	3/4	4/9	—	—	—	—
	520	—	4/4	—	—	—	—	—	—	—	—
	620	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1/1
D5-D6	1000	—	4/4	—	—	1/4	—	2/4	—	—	—
	200	—	3/4	—	—	4/4	—	4/4	—	—	—
	280	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1/1
	480	—	—	—	—	—	—	2/4	—	—	—
D5-D7	820	—	3/4	—	—	—	—	—	—	—	—
	200	2/2	4/4	15/15	4/4	4/4	9/9	4/4	1/1	1/1	1/1
	320	—	—	—	1/4	—	1/9	—	—	—	—
	400	—	—	—	1/4	1/4	4/9	—	—	—	—
E16-E17	550	—	—	12/15	4/4	1/4	4/9	—	—	1/1	—
	150	—	—	2/15	—	—	—	—	—	—	—
	200	—	—	1/15	—	—	—	—	—	—	—
	370	—	—	12/15	1/4	—	2/9	—	—	—	—

Примечание. МГЭ — мобильные генетические элементы. Прочерки означают, что ампликоны соответствующего размера не выявлялись.

Отмечался фрагмент (550 п.н., праймеры D5-D7), свойственный подавляющему большинству членов видов с геномом С — капусте огородной, родственным ей диким средиземноморским видам и капусте Турнефора (*B. tournefortii*, геном Т). Такой же фрагмент наблюдали у полови-

ны образцов рапса и брюквы с геномом АС. В то же время указанный фрагмент нельзя считать специфичным для генома С, поскольку у образцов капусты абиссинской с геномом ВС он не выявлялся. Однако этим подтверждается известное заключение о близости геномов А и С и удаленности от них генома В. У некоторых разновидностей вида капусты огородной (например, у образца кольраби из Пакистана) обнаруживались редкие аллели, но насколько они специфичны для названных ботанических таксонов, предстоит выяснить в дальнейшем. Наличие общего фрагмента (370 п.н., праймеры E16-E17) у средиземноморского вида *B. incana* и некоторых образцов культурных разновидностей капусты огородной и рапса может свидетельствовать об участии *B. incana* в их формировании, возможно, в результате интрогрессии генетического материала вида в предковую форму *B. oleracea*. По результатам наших исследований можно отметить отдельное положение капусты Турнефора как вида и предположить две возможности его происхождения: вследствие интрогрессии генетического материала комплекса *B. oleracea/B. rapa* в геном горчицы черной *B. nigra* или наоборот. У капусты Турнефора мы не нашли фрагментов, общих для видов, содержащих В-геном, но обнаружили ампликон, присущий многим С-геномным видам. Фрагменты, которые были бы маркерными для генома А, выявить не удалось. Имелся фрагмент, специфичный только для горчицы полевой (280 п.н., праймеры D5-D6). На электрофоретических профилях амплифицируемые фрагменты чаще были представлены одной, редко двумя, еще реже — тремя-четырьмя полосами, то есть полиморфизм был низким.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о наличии в геномах представителей всех изученных видов рода *Brassica* последовательностей, схожих с МГЭ II класса (Ac, MuDR, Far1, САСТА).

Как уже отмечалось, объем сведений о транспозоноподобных последовательностях и псевдогенах у *Brassica* незначителен, а имеющаяся информация достаточно противоречива. Согласно недавним филогенетическим исследованиям, у шести видов рода *Brassica* удалось различить кластеры Tu1/coria и LINE-подобных элементов, а третий кластер оказался подразделен на Tu3/gypsy, Attila и вирусоподобные ветви, подтверждая, что многочисленные подветви внутри этой группы могут рассматриваться как gypsy-подобные элементы растений (55). Дендрограммы не дали ветвей, коррелирующих с известными геномными взаимоотношениями видов *Brassica* (возможно, потому, что члены семейств изученных элементов были представлены в общем предке *Brassica* в отличие от других повторяющихся последовательностей). Здесь вероятна также конвергентная эволюция или горизонтальный перенос. Полученные результаты о последовательностях ретроэлементов не позволили К. Alix с соавт. (55) сделать выводы о филогении рода, хотя Саузерн-гибридизация подтвердила, что у отдельных видов некоторые подсемейства ретроэлементов могут быть амплифицированы. Другие авторы (56) предприняли исследование по идентификации и характеристике основных повторов в центромерном и перицентромерном гетерохроматине у вида *B. rapa*. Были идентифицированы три копии центромер-специфичных ретротранспозонов *Brassica* (CRB), переменные перицентромер-специфичные ретротранспозоны (PCRBr), а также 24 копии центромерных повторов (CentBr) размером 176 п.н. Выявлена мозаичная структура, состоящая из девяти PCRBr и широких блоков тандемных повторов (TR238). Определено, что CRB — главный компонент всех центромер диплоидных и аллотетраплоидных видов *Brassica*. Однако центромерные повторы (CentBr) не были найдены в наиболее отдаленном из про-

анализированных родственных видов — *B. nigra*. Показано, что PCRВг и TR238 — главные компоненты перичентромерных гетерохроматиновых блоков четырех хромосом *B. rapa*. Эти повторяющиеся элементы не идентифицированы у *B. oleracea* и *B. nigra*, что свидетельствует об их специфичности для А-генома.

Однако все перечисленные МГЭ не относятся к тем МГЭ II класса, которые мы изучили, что позволяет считать проведенные нами исследования приоритетными. Кроме того, на основании результатов, полученных в наших экспериментах, можно сделать вывод о том, что амплифицированные последовательности МГЭ II класса благодаря разнообразию и распространенности в геномах у видов рода *Brassica* полезны при разработке молекулярных маркеров, в частности S-SAP (51), а S-SAP-маркеры могут напрямую использоваться для анализа генетического разнообразия видов рода *Brassica*, геномного картирования и филогенетических построений. К сожалению, из-за низкого полиморфизма не представляется возможным построение филогенетического древа, определяющего ботанико-систематические связи культурных и диких видов рода *Brassica*, на основе электрофоретического анализа ПЦР-ампликонов. В дальнейшем предстоит установить степень гомологии ПЦР-амплифицированных последовательностей с последовательностями известных МГЭ II класса, в том числе тех, на основе которых разрабатывались праймеры, использованные нами в работе.

Итак, в настоящей работе приведены результаты ПЦР-оценки распространения и полиморфизма маркеров на основе элементов Ac, MuDR, Far1 и САСТА у образцов, представляющих виды семейства *Brassicaceae* L. в мировой коллекции ВИР, в связи с обсуждением их филогении, эволюции и полиплоидии. Рассмотрена генетическая нестабильность геномов у видов рода *Brassica* и перспективы использования первичных нуклеотидных последовательностей, схожих с мобильными генетическими элементами (МГЭ) II класса (Ac, MuDR, Far1 и САСТА), при создании молекулярных маркеров для анализа генетического разнообразия культур модельного семейства *Brassicaceae* L. Этот подход может быть применен при изучении других семейств, что позволит глубже понять генетическую природу изменчивости, молекулярные механизмы эволюции видов и их филогенетическое родство.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции (Учение об исходном материале в селекции). Теоретические основы селекции. Т. 1. Общая селекция растений /Под ред. Н.И. Вавилова. М.-Л., 1935.: 17-74.
2. Синская Е.Н. Масличные и корнеплоды семейства *Cruciferae*. Тр. по прикл. бот., ген. и сел., 1928, 19(3).
3. Шебалина М.А. Репа, турнепс и брюква. Л., 1974.
4. Лизгунова Т.В. Культурная флора. Т. 11. Капуста. Л., 1984.
5. Шебалина М.А., Сазонова Л.В. Корнеплодные растения. Культурная флора СССР. Л., 1985.
6. U N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. Jap. J. Bot., 1935, 7: 389-452.
7. Gomez-Campo C., Prakash S. Origin and domestication. In: Biology of *Brassica* coenospecies /C. Gomez-Campo (ed.). Amsterdam-Lausanne-New-York-Shannon-Singapore-Tokyo, Elsevier Press, 1999: 33-58.
8. Specht C.E., Diederichsen A. *Brassica*. In: Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops. V. 3. /P. Hanelt (ed.). Berlin, Springer-Verlag, 2001: 1435-1465.
9. Gladis T.H., Hammer K. Die Gaterslebener *Brassica*-Kollektion — *Brassica juncea*, *B. napus*, *B. nigra* und *B. rapa*. Feddes Reportium, 1992, 103: 469-507.
10. Snogerup S. The wild forms of *Brassica oleracea* group ($2n = 18$) and their possible relations to the cultivated ones. In: *Brassica* crops and wild allies /S. Tsunoda, K. Hinata, C. Go-

- mez-Campo (eds.). Tokyo, Japan Sci. Soc. Press, 1980: 121-132.
11. Bailey L.H. The cultivated Brassicas. *Genets. Herbarum*, 1940, 4(9): 319-330.
 12. Синская Е.Н. Историческая география культурной флоры. Л., 1969.
 13. Olsson G. Crosses within the campestris group of the genus *Brassica*. *Hereditas*, 1954, 40: 398-418.
 14. Hanelt P. *Cruciferae*. Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen) /J. Schultze-Motel (ed.). Berlin, Akademie-Verlag, 1986: 272-332.
 15. Wendel J.F. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, 2000, 42: 225-249.
 16. Otto S.P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 2000, 34: 401-437.
 17. Adams K.L., Wendel J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Cur. Opin. Plant Biol.*, 2005, 8: 135-141.
 18. Albertin W., Balliau T., Brabant P. et al. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics*, 2006, 173: 1101-1113.
 19. Wang J., Wang J., Tian L., Lee H.S., Wei N.E., Jiang H., Watson B., Madlung A., Osborn T.C., Doerge R.W., Comai L., Chen Z.J. Genome-wide non-additive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics*, 2006, 172: 507-517.
 20. McClintock B. Mutable loci in maize. *Carnegie Institution of Washington Year Book*, 1951, 50: 174-181.
 21. McClintock B. Mutable loci in maize: Origins of instability at the A1 and A2 loci. Instability of Sh1 action induced by Ds. *Carnegie Institution of Washington Year Book*, 1952, 51: 212-219.
 22. Pohlman R.F., Fedoroff N.V., Messing J. The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator. *Cell*, 1984, 37: 635-643.
 23. Hehl R., Nacken W.K.F., Krause A., Saedler H., Sommer H. Structural analysis of Tam3, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the Ac element from maize. *Plant Mol. Biol.*, 1991, 16: 369-371.
 24. O'Hare K., Rubin G.M. Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, 1983, 34: 25-35.
 25. Streck R.D., Macgaffey J.E., Beckendorf S.K. The structure of hobo transposable elements and their insertion sites. *The EMBO J.*, 1986, 5: 3615-3623.
 26. Kunze R., Starlinger P., Schwartz D. DNA methylation of the maize transposable element Ac interferes with its transcription. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, 214: 325-327.
 27. Kunze R., Starlinger P. The putative transposable element Ac from *Zea mays* L. interacts with subterminal sequences of Ac. *The EMBO J.*, 1989, 8: 3177-3185.
 28. Coupland G., Baker B., Schell J., Starlinger P. Characterization of the maize transposable element Ac by internal deletions. *The EMBO J.*, 1988, 7: 3653-3659.
 29. Hershberger R.J., Warren C.A., Walbot V. Mutator activity in maize correlates with the presence and expression of the Mu transposable element Mu9. *PNAS USA*, 1991, 88: 10198-10202.
 30. Chomet P., Lisch D., Hardeman K.J., Chandler V.L., Freeling M. Identification of a regulatory transposon that controls the Mutator transposable element system in maize. *Genetics*, 1991, 129: 261-270.
 31. Qin M., Robertson D.S., Ellingboe A.H. Cloning of the Mutator transposable element MuA2, a putative regulator of somatic mutability of the *a1-Mum2* allele in maize. *Genetics*, 1991, 129: 845-854.
 32. Greene B., Walko R., Hake S. Mutator insertions in an intron of the maize *knotted1* gene result in dominant suppressible mutations. *Genetics*, 1994, 138: 1141-1150.
 33. Martienssen R., Baron A. Coordinate suppression of mutations caused by Robertson's Mutator in maize. *Genetics*, 1994, 136: 1157-1170.
 34. Hershberger R.J., Benito M.I., Hardeman K.J., Warren C., Chandler V.L., Walbot V. Characterization of the major transcripts encoded by the regulatory MuDR transposable element of maize. *Genetics*, 1995, 140(3): 1087-1098.
 35. Hudson M.E., Lisch D.R., Quail P.H. The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J.*, 2003, 34: 453-471.
 36. Lin R., Wang H. *Arabidopsis* FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.*, 2004, 136: 4010-4022.
 37. Doring H.-P., Starlinger P. Molecular genetics of transposable elements in plants. *Annu. Rev. Genet.*, 1986, 20: 175-200.
 38. Nacken W.K.F., Piotrowiak R., Saedler H., Sommer H. The transposable element TAM-1 of *A. majus* shows structural homology to the maize transposon *En/Spm* and has no sequence specificity of insertion. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 228: 201-208.
 39. Peterson P.A. A mutable palegreen locus in maize. *Genetics*, 1953, 38(1): 682-683.
 40. Vodkin L.O., Rhodes P., Goldberg R.B. A lectin gene insertion has the structural

- features of a transposable element. *Cell*, 1983, 34: 1023-1031.
41. Ozeki Y., Davies E., Takeda J. Somatic variation during long term subculturing of plant cells caused by insertion of a transposable element in a phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene. *Mol. Gen. Genet.*, 1997, 254: 407-416.
 42. Chopra S., Brendel V., Zhang J., Axtell J.D., Peterson T. Molecular characterisation of a mutable pigmentation phenotype and isolation of the first active transposable element from *Sorghum bicolor*. *PNAS USA*, 1999, 96: 15330-15335.
 43. Snowden K.C., Napoli C.A. *PsI*: a novel Spm-like transposable element from *Petunia hybrida*. *Plant J.*, 1998, 14: 43-54.
 44. Shirsat A.H. A transposon-like structure in the 5' flanking sequence of a legumin gene from *Pisum sativum*. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, 212: 129-144.
 45. Motohashi R., Ohtsubo E., Ohtsubo H. Identification of Tnr3, a suppressor-mutator/enhancer-like transposable element from rice. *Mol. Gen. Genet.*, 1996, 250: 148-152.
 46. Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K., Toyama T., Shimada H., Kakutani T. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 2001, 411: 212-214.
 47. Zhang X., Wessler S.R. Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *PNAS USA*, 2004, 101: 5589-5594.
 48. 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, 48: 597-604.
 49. AGI, Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408: 796-815.
 50. Alix K., Joets J., Ryder C.D. et al. The CACTA transposon Bot1 played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation. *Plant J.*, 2008, doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03660.x.
 51. Артемьева А.М., Будан Х., Клоке Э., Чесноков Ю.В. Использование мобильных генетических элементов CACTA для уточнения филогенетических взаимоотношений внутри вида *Brassica rapa* L. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2011, 15(2): 398-411.
 52. Дягилева А.В., Паша Л.И., Митин В.А., Туманова Л.Г., Артемьева А.М., Соловьева А.Е., Чесноков Ю.В. Мобильный элемент Activator в геноме *Brassica*? Мат. VIII Межд. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». М., 2009, т. I: 293-294.
 53. Паша Л.И., Дягилева А.В., Митин В.А., Туманова Л.Г., Соловьева А.Е., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Выявление MuDR-подобных последовательностей в геноме рода *Brassica*. Мат. VIII Межд. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». М., 2009, т. II: 213-215.
 54. Соловьева А.Е., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Идентификация последовательностей элементов Ac, MuDR, Far1 и CACTA в геномах видов рода *Brassica*. Мат. V съезда ВОГИС. М., 2009, ч. I: 329.
 55. Alix K., Heslop-Harrison J.S. The diversity of retroelements in diploid and allotetraploid *Brassica* species. *Plant Mol. Biol.*, 2004, 54: 895-909.
 56. Lim K.B., Yang T.J., Hwang Y.J., Kim J.S., Park J.Y., Kwon S.J., Kim J., Choi B.S., Lim M.H., Jin M., Kim H.I., De Jong H., Bancroft I., Lim Y., Park B.S. Characterization of centromere and peri-centromere retrotransposons in *Brassica rapa* and their distribution in related *Brassica* species. *Plant J.*, 2007, 49: 173-183.

ГНУ Всероссийский НИИ растениеводства
им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии,
190000 г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44,
e-mail: yu.chesnokov@vir.nw.ru

Поступила в редакцию
27 апреля 2012 года

CLASS II MGE-LIKE SEQUENCES IN GENOMES OF *Brassica* L. SPECIES

A.M. Artemyeva, A.G. Dubovskaya, A.E. Solov'eva, Yu.V. Chesnokov

Summary

Basing on the literature data and own results, an unstability of genomes in species of *Brassica* genus is considered, and possibility to apply the class II mobile genetic elements-like nucleotide sequences, Ac, MuDR, Far1 and CACTA, for creation of molecular markers which could be used to evaluate genetic diversity is discussed. Using PCR, a distribution and polymorphism of markers based on Ac, MuDR, Far1 and CACTA elements are investigated in samples of *Brassicaceae* L. from the world collection of the N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), with regard to their phylogeny.