

*На правах рукописи*

**МАКУХА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ  
*BRASSICA OLERACEA* L. НА УСТОЙЧИВОСТЬ К  
СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ И ФУЗАРИОЗУ**

Специальность: 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология  
растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Краснодар, 2022

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр риса» (ФГБНУ «ФНЦ риса») в 2018-2022 гг.

**Научный  
руководитель:**

**Дубина Елена Викторовна**, доктор биологических наук, профессор РАН заведующая лабораторией информационных, цифровых и биотехнологий ФГБНУ «ФНЦ риса»

**Официальные  
оппоненты:**

**Монахос Сократ Григорьевич**, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

**Кремнева Оксана Юрьевна**, кандидат биологических наук , ведущий научный сотрудник лаборатории фитосанитарного мониторинга агроэкосистем ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»

**Ведущая  
организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко»

Защита диссертации состоится «13» декабря 2022 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.258.01, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» по адресу: 350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3. Тел. (факс): (861) 205-15-55.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный центр риса», а также на сайте – <http://vniirice.ru>, с авторефератом на сайтах: Высшей аттестационной комиссии – <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» – <http://vniirice.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Л.В. Есаулова

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L.) является одной из самых распространенных овощных культур, она возделывается от полярных до субтропических регионов и по урожайности стоит на первом месте в данной группе (Литвинов, 2003). Одной из основных причин, снижающих урожайность культуры, являются болезни и вредители. Самыми вредоносными для капусты из них являются *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, бактерия, вызывающая заболевание - сосудистый бактериоз, а также *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Wollenweb.) грибок, вызывающий фузариозное увядание (Williams et al., 1980; Pu et al., 2012). Они наносят серьезный ущерб производству, приводя к снижению урожая на 25- 100 %. Наряду с прямыми потерями значительно снижается качество продукции, особенно кочанов. Наиболее действенными мерами защиты овощных культур от бактериальных и грибковых болезней являются обработки посевов химическими средствами защиты растений (Сухорукова, 1987; Асякин, Лазарев, 2002). Не отрицая важности мер химической защиты, приходится признать, что в современной экономической ситуации наиболее дешевым, надежным и современным методом борьбы с болезнями овощных культур является создание и использование в производстве устойчивых к вредным организмам сортов и гибридов. Традиционные методы селекции на устойчивость требуют создания инфекционных фонов и трудоемкую оценку каждого образца. Проведение таких работ связано со значительными затратами труда и времени (Дубина и др., 2016 б; Зеленский, 2016).

Селекция с применением молекулярно-генетических методов, а также разработка ДНК-маркерных систем по идентификации целевых генов, основанная на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием микросателлитных (SSR) маркеров позволяет создавать ценные генотипы с заданными свойствами в короткие сроки, что крайне необходимо селекционерам и сельхозпроизводителям (Дубина, 2019). Последнее позволяет проводить контроль переносимых целевых генов из одного организма в другой, сокращая тем самым селекционный процесс создания устойчивых к сосудистому бактериозу и фузариозу форм капусты белокочанной, что значительно повышает конкурентоспособность и импортозамещение отечественных гибридов. Такая практика уже успешно используется и на других важных сельскохозяйственных культурах (рис (Дубина и др., 2015 б; Дубина и

др., 2015 в), томаты (Фесенко и др., 2007) и т.д.). Поиск доноров, а также создание ускоренной схемы получения резистентных к бактериозу и фузариозу сортов и гибридов капусты является весьма актуальной проблемой для региона и страны.

**Цель исследований** – разработать технологический регламент ускоренного создания селекционного материала капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу на основе современных постгеномных технологий (молекулярное маркирование) с использованием микросателлитных (SSR) маркеров.

**Задачи исследований:**

1. Подобрать пул информативных ДНК-маркерных систем, позволяющих четко идентифицировать целевые гены и их аллельное состояние в исходном и гибридном материале капусты белокочанной.

2. Провести гибридизацию контрастных линий капусты белокочанной по устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу для получения гибридных потомств (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>-поколение).

3. С использованием отобранных(ого) SSR-маркеров(а) установить их сонаследуемость с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу на полученных сегрегирующих популяциях (F<sub>2</sub>-поколение) методом фитопатологического тестирования и сравнить его результаты с результатами ПЦР-анализа.

4. Определить кандидатные ДНК-маркерные системы локусов устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и гена устойчивости к фузариозу *FocI* и рекомендовать их в селекционный процесс для ускоренного создания устойчивых генотипов к болезням, с повышенной урожайностью и отличными потребительскими свойствами, которые позволят решить проблему импортозамещения и получения продуктов здорового питания (экологически безопасной продукции, выращенной с применением пониженного количества средств химической защиты).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Информативные ДНК-маркерные системы по идентификации в гибридном материале капусты белокочанной генов устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и внедрение их в селекционные программы.

2. Высокополиморфные ДНК-маркерные системы для визуализации гена устойчивости к фузариозу *FocI* и их аллельного состояния в генотипах гибридных растений капусты белокочанной.

3. Создание исходного материала капусты белокочанной на основе классических методов селекции и биотехнологических подходов

(молекулярное маркирование), а также на основе проведение фенотипирования по изучаемым признакам с использованием фитопатологических методов.

**Научная новизна исследования.** Впервые в России разработан технологический регламент селекционной схемы капусты белокочанной на основе применения методов молекулярного маркирования для ускоренного создания конкурентоспособных гибридов, устойчивых к сосудистому бактериозу и фузариозу. Изучено сонаследование апробированных в работе молекулярных маркеров с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу на сегрегирующих популяциях капусты белокочанной. Определены информативные кандидатные ДНК-маркерные системы: O110-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и O110-D01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*, которые рекомендованы в селекционный процесс для ускоренного создания устойчивых генотипов к сосудистому бактериозу и фузариозу.

**Научно-практическая значимость работы.** Информативные кандидатные ДНК-маркерные системы: O110-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и O110-D01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*, а также полученный в работе селекционный материал (растения F2 гибридных комбинаций 269-Яс-12п x Пи714, ДТ-46 x КБ1П) необходимо использовать для дальнейшей работы, направленной на создание гибридов нового поколения, соответствующих агроклиматическим условиям юга России, обладающих повышенной урожайностью, устойчивостью к сосудистому бактериозу и фузариозу. Это будет способствовать производству экологически безопасной продукции, экономии денежных средств овощепроизводящим предприятиям, так как позволит значительно снизить использование ядохимикатов, что повысит экологический статус отрасли овощеводства и экономику региона.

**Апробация результатов работы.** Диссертационная работа обобщает результаты исследований (2018-2022 гг.), посвященных использованию современных постгеномных технологий (молекулярное маркирование) в селекции капусты белокочанной. Ее основные положения доложены и одобрены на заседаниях методической комиссии ФГБНУ «ФНЦ риса» (2018-2022 гг.), а также были представлены на III-ей Международной научно-практической конференции «Инновационные исследования и разработки для научного обеспечения производства и хранения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции» (г. Краснодар, 19 апреля 2019 г.); Международной научно-практической

конференции с элементами школы молодых ученых «Научные приоритеты адаптивной интенсификации сельскохозяйственного производства», (г. Краснодар, 03-05 июля 2019 г.); II-ой Международной конференции молодых ученых «Наука и молодежь: фундаментальные и прикладные проблемы в области селекции и генетики сельскохозяйственных культур», (г. Зерноград, 23-25 октября 2019 г.); XI Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (г. Краснодар, 21-24 сентября, 2020 г.); Международной конференции «Исследования и последние достижения в АПК и биотехнологиях» (г. Краснодар, 24-26 мая 2021 г.); Международной научно-практической конференции «Эколого-генетические основы селекции и возделывания сельскохозяйственных культур» (г. Краснодар, 25-26 мая 2022 г.).

**Публикация результатов исследования.** По материалам исследования опубликовано 5 печатных работ, 1 из которых входит в базу РИНЦ, 2 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК, 2 – входит в наукометрическую базу Web of Science.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, выводов, рекомендаций селекционной практике и списка литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включающих 9 таблиц, 58 рисунков. Список использованной литературы включает 105 источников, в том числе - 62 иностранных авторов.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лаборатории информационных, цифровых и биотехнологий ФГБНУ «ФНЦ риса», гибридизация и фитопатологические тестирования проводились в теплицах и на опытных полевых полигонах отдела овощекартофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса» с 2018 по 2022 год. Материалом исследования послужили контрастные формы капусты белокочанной по устойчивости к сосудистому бактериозу (устойчивая изогенная линия 269-Яс12п-2 и восприимчивая изогенная линия Пи714), отобранные в отделе овощекартофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса», растения поколения F<sub>1</sub> гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 и поколения F<sub>2</sub>, полученные в результате самоопыления растений F<sub>1</sub>, а также контрастные формы капусты белокочанной по устойчивости к фузариозу (устойчивая изогенная линия ДТ-46 и восприимчивая изогенная линия Кб1П), отобранные в отделе овощекартофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса», растения поколения F<sub>1</sub> гибридной комбинации ДТ-46 x Кб1П и поколения F<sub>2</sub>, полученные в результате самоопыления

растений F<sub>1</sub>.

При проведении молекулярно-генетических исследований ДНК из листьев растений капусты белокочанной выделяли СТАВ-методом (Murray and Thompson, 1980).

Аmplификацию ДНК проводили в амплификаторах «Терцик» и «Bio Rad» с оптимизацией условий ПЦР.

Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2%-ном агарозном и 8%-ном полиакриламидном геле при напряжении 130 и 240 В, соответственно (Поморцев и др., 2004).

Визуализацию результатов электрофореза проводили с использованием бромистого этидия (BrEt) в УФ-свете и фотографировали цифровой фотокамерой. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркеры молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb и 100 bp+1 Kb (СибЭнзим).

При проведении ДНК-анализа на устойчивость к сосудистому бактериозу применяли нейтральные кодоминантные микросателлитные (SSR) маркеры, взятые из базы данных на сайте (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), разработанные для оценки полиморфизма у растений *Brassica oleracea* L.

Также для идентификации аллелей устойчивости к сосудистому бактериозу использовали SSR-маркеры, тесно сцепленные с главным локусом устойчивости *XccBo(Reiho)2* и с минорными *XccBo(Reiho)1*, *XccBo(GC)1* (Tonu et al., 2013) и SSR-маркеры, сцепленные с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу (Afrin et al., 2018).

При проведении молекулярно-генетических исследований на устойчивость к фузариозу капусты белокочанной применяли нейтральные кодоминантные микросателлитные (SSR) маркеры, взятые из базы данных VegMarks на сайте (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), расположенные в 6 группе сцепления, где расположен ген устойчивости к фузариозу *Foc 1*.

Также для идентификации аллелей устойчивости к фузариозу использовали кодоминантные InDel- маркеры (A1 и M10), выявляющие высокий полиморфизм у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной (Lv et al., 2011, 2013, 2014a), кодоминантный SSR-маркер Frg13, тесно сцепленный с геном устойчивости к фузариозу *Foc1* (0,1 cM) (Liu et al., 2017).

Иммунологическая оценка селекционного материала капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу

проводилась в отделе овощекартофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса» на стационарном инфекционном участке. Для фитопатологического тестирования на устойчивость к сосудистому бактериозу проводилась инокуляция растений капусты белокочанной в фазе 5-7 листьев путем опрыскивания растений в стадию гуттации водной суспензией бактерий. Для проведения заражения использовали изоляты *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson местной популяции патогена, относящиеся к самой распространенной в Краснодарском крае расе 1. Оценка поражаемости образцов проводили в динамике роста и развития растений по пятибалльной шкале Студенцова через 14 дней после инокуляции (Королева и др., 2012; Студенцов, Петровская, 1981). При подсчете результатов фитопатологического тестирования на устойчивость к сосудистому бактериозу растения, имеющие степень поражения 2-4 - балла, считались неустойчивыми по фенотипу, растения с 0-1 баллами – как устойчивые.

Для проведения фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу растения капусты белокочанной выращивали в кассетах с почвой, предварительно зараженной водной суспензией гриба *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, относящегося к расе 1. Оценка проявления болезни проводили через 21 после появления всходов по четырехбалльной шкале, предложенной «ВНИИ риса» (Королева и др., 2012). При подсчете результатов фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу растения с 2-3 баллами поражения считались неустойчивыми по фенотипу, а растения со степенью поражения 0-1 балл оценивали как устойчивые.

Для проведения оценки значимости различий в расщеплении в сегрегирующих популяциях между фактическим числом растений в выборке и теоретически ожидаемым использовали метод  $\chi^2$  (хи-квадрат) (Лобашев, 1969).

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

#### **3.1 Селекция капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу**

В результате анализа литературных источников установлено, что в настоящее время отсутствуют универсальные маркеры локусов и генов устойчивости для обеспечения высокой и надежной оценки по идентификации генов резистентности к сосудистому бактериозу и фузариозу. В связи с этим было принято решение о проведении

исследования по определению ДНК-маркерных систем для выявления генов устойчивости к *X. campestris* и к *F. oxysporum* для ускорения и повышения эффективности селекционного процесса на устойчивость к возбудителям сосудистого бактериоза и фузариоза. На рисунке 1 представлена схема селекционного процесса, использованная в данной работе.



Рисунок 1 - Схема селекционного процесса капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу на основе MAS

На первом этапе селекционного процесса на устойчивость к сосудистому бактериозу была проведена гибридизация гейтеногамным опылением вскрытых бутонов вручную (Лизгунова, 1984) контрастных форм капусты белокочанной: устойчивой изогенной линии 269-Яс12п-2 с восприимчивой изогенной линией Пи714 в теплице ФГБНУ «ФНЦ риса» и получено поколение F<sub>1</sub>. Параллельно проводилась апробация молекулярных маркеров на этих же контрастных изогенных линиях, в результате чего отобранные SSR-маркеры, показавшие наибольший уровень полиморфизма, были внедрены в селекционный процесс. Далее в результате принудительного самоопыления растений F<sub>1</sub> полученные растения сегрегирующей популяции F<sub>2</sub> анализировались на наличие в их генотипах целевых генов ПЦР-анализом с помощью отобранных информативных молекулярных маркеров. Одновременно с проводимым анализом ДНК полученных гибридных растений F<sub>2</sub> выполнялось их фитопатологическое тестирование. Кроме того, сопоставляя результаты двух экспериментальных опытов было изучено сопосредование апробированных маркеров с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу. Из сегрегирующей популяции были отобраны растения, имеющие в генотипе донорный аллель устойчивости в гомо- и

гетерозиготном состоянии для получения семян поколения  $F_3$ , определения точных показателей продуктивности использованных в работе линий, так как на данный момент (на этапе поколения  $F_2$ ) у капусты белокочанной наблюдается инбредная депрессия (снижение продуктивности, жизненных и репродуктивных функций растений), и достоверно оценить показатели продуктивности растений не представляется возможным (Лизгунова, 1984).

Для селекционного процесса на устойчивость к фузариозу в качестве исходных родительских форм для гибридизации использовались изогенные контрастные линии (устойчивая изогенная линия ДТ-46 и восприимчивая изогенная линия Кб1П). Схема проведения работ была такая же, как и в случае с селекционным процессом на устойчивость к сосудистому бактериозу, за исключением ДНК-анализа  $BC_1F_1$ -популяции, полученной в результате возвратного скрещивания  $F_1$ -гибрида с устойчивой родительской формой ДТ-46, и отбора растений, имеющих в генотипе донорный аллель устойчивости к фузариозу, обладающих требуемыми морфометрическими характеристиками. В случае с сосудистым бактериозом не удалось получить беккроссную популяцию по причине слабой завязываемости семян.

### **3.2 Апробация SSR-маркеров на контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу изогенных линиях и селекционных образцах капусты белокочанной**

На первом этапе при проведении молекулярно-генетических исследований по выявлению информативных ДНК-маркерных систем для идентификации аллелей устойчивости к сосудистому бактериозу SSR-маркеры, взятые из базы данных на сайте (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), были апробированы на контрастных по резистентности к сосудистому бактериозу изогенных линиях капусты белокочанной. Два из апробированных маркеров выявили полиморфизм (аллельную разницу) между исследуемыми образцами (рисунок 2, 3).

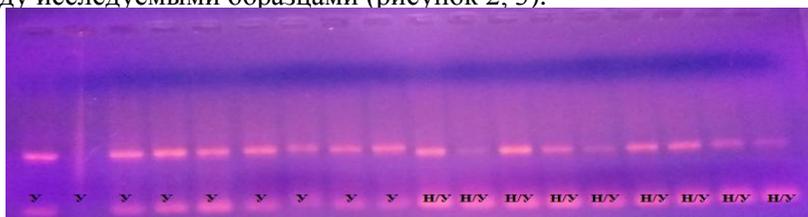


Рисунок 2 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу O110-C01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание - У – изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У-изогенная неустойчивая линия Пи714.

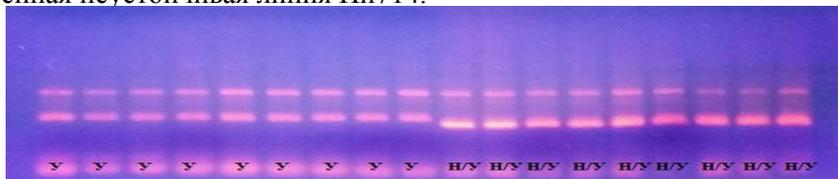


Рисунок 3 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу O111-H06 в 2%-ном агарозном геле

Примечание - У – изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У-изогенная неустойчивая линия Пи714.

На втором этапе исследований на контрастных образцах были проанализированы маркеры, тесно сцепленные с главным локусом устойчивости *XccBo(Reiho)2* расположенным в 8 хромосоме, и с минорными QTL (*XccBo(Reiho)1* и *XccBo(GC)1* – в 5 и 9 хромосоме, соответственно (таблица 2, Topu et al., 2013). Однако ни один из этих маркеров не выявил полиморфизма у контрастных образцов. Результат апробации маркера BoGMS0971, сцепленного с главным локусом *XccBo(Reiho)2* представлен на рисунке 4.

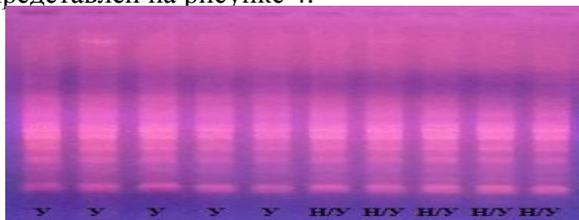


Рисунок 4 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу BoGMS0971 в 2%-ном агарозном геле

Примечание - У – изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У-изогенная неустойчивая линия Пи714.

Далее была проведена апробация эффективных микросателлитных маркеров, которые в работах Afrin выявили высокий полиморфизм и подтвердили сонаследуемость в сегрегирующей популяции (Afrin et al., 2018). Только у одного из них при апробации был обнаружен полиморфизм между контрастными изогенными линиями (рисунок 5).

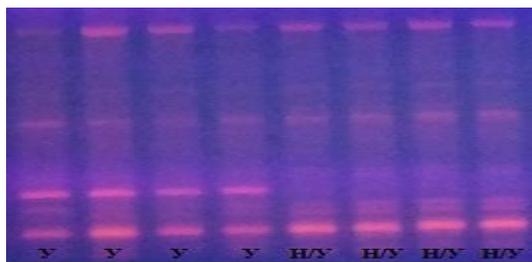


Рисунок 5 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу BoESSR726 в 2%-ном агарозном геле

Примечание - У – изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- изогенная неустойчивая линия Пи714.

В 2020 году было проведено самоопыление растений  $F_1$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 с целью получения расщепляющейся популяции, на которой впоследствии были так же апробированы отобранные ранее маркеры для изучения их сонаследования с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу, что отражено на рисунках 6, 7, 8.

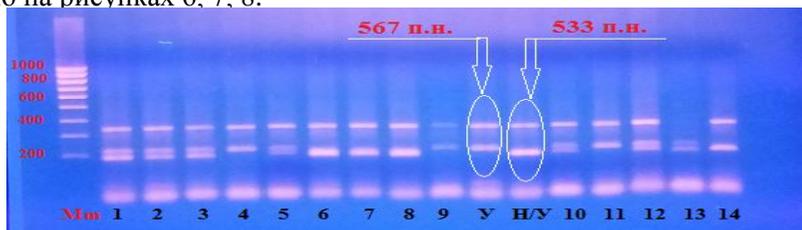


Рисунок 6 – Разделение продуктов амплификации растений поколения  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 по локусу O111-H06

Примечание – Mm – маркер молекулярной массы; 1-14 – растения поколения  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

На рисунке 6 наблюдается расщепление растений по генотипу, т.е. растения под номерами 4, 9, 11 являются гомозиготами по рецессивной аллели, размером 567 п.н. (доноры устойчивости, т.к. признак имеет рецессивный характер наследования), растения: №№6, 7, 8, 14 – гомозиготы по доминантной аллели, размером 533 п.н. (неустойчивые образцы), которые были выбракованы, а растения: №№1, 2, 3, 5, 10, 12, 13 – гетерозиготны. Однако по данному локусу имелось значительное расхождение с результатами фитопатологического

тестирования (раздел 3.3), поэтому данный маркер был исключен из дальнейшего селекционного процесса.

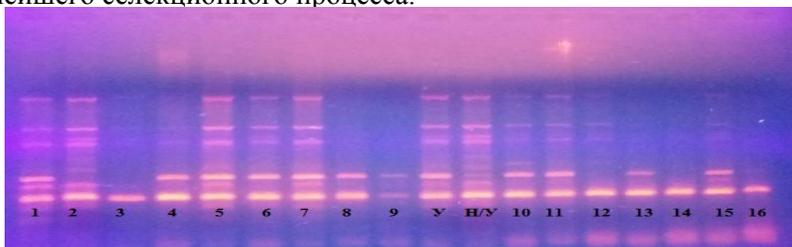


Рисунок 7 – Разделение продуктов амплификации растений поколения  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 по локусу VoESSR726

Примечание – 1-16 – растения поколения  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Как видно из рисунка 7 из проанализированных гибридных растений капусты белокочанной  $F_2$  образцы №№4-7, 11, 16 имеют одинаковый ДНК-профиль, как у устойчивой родительской формы 269-Яс12п-2. Образцы №№1 и 15 – гетерозиготы, а образец №2 имеет аллели как у неустойчивой родительской формы Пи714 и был отбракован. При согласовании результатов фитопатологического тестирования (раздел 3.2) с данными ПЦР-анализа по данному локусу было выявлено несоответствие результатов по генотипу и фенотипу, поэтому данный маркер так же был исключен из селекционного процесса.

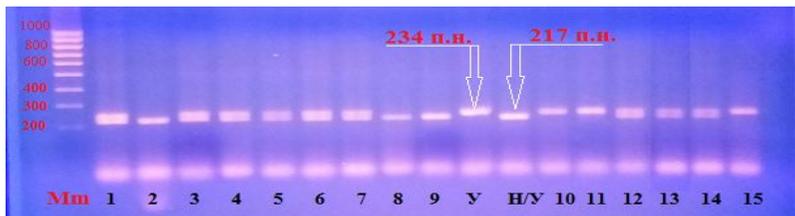


Рисунок 8 – Разделение продуктов амплификации растений поколения  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 по локусу O110-C01

Примечание – Мм – маркер молекулярной массы; 1-15 – растения поколения  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Исходя из электрофореграммы на рисунке 8, можно заметить, что уже среди первых проанализированных 15 растений поколения  $F_2$  наблюдается расщепление, и по данному локусу, как и по локусу O111-

Н06 выявляются все виды генотипов, т.е. растения №№10, 11, 15 являются гомозиготами по рецессивной аллели (несут аллель устойчивости размером 234 п.н.), растения №№2, 8, 9 гомозиготны по доминантной аллели восприимчивости размером 217 п.н., растения №№1, 3-7, 12, 13, 14 - гетерозиготны.

Так как во время работы прослеживалась положительная корреляция результатов ДНК-анализа по локусу O110-C01 и фитопатологического тестирования (раздел 3.3), был проведен анализ по данному локусу всей выборки сегрегирующей популяции (102 растения) для установления окончательного соотношения по генотипу и фенотипу.

### **3.3 Проведение фитопатологического тестирования на устойчивость к сосудистому бактериозу и сравнение полученных данных с результатами ПЦР-анализа**

В 2021 году для проверки информативности отобранных в молекулярно-генетических исследованиях маркеров проводилось фитопатологическое тестирование растений F<sub>2</sub> гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714, полученных в результате принудительного самоопыления растений F<sub>1</sub>. Оценку поражаемости образцов проводили в динамике роста и развития растений по шкале Студенцова (Королева и др., 2012). По результатам фитопатологического тестирования было установлено, что симптомы поражения сосудистым бактериозом у растений гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 соответствовали 1 и 2 баллам по шкале Студенцова, т.е. наблюдалось только поражение отдельных листьев в разной степени без почернения пучков проводящих сосудов ксилемы, что отражено на рисунках 9, 10.



Рисунок 9 – Симптомы проявления сосудистого бактериоза, соответствующие 1 баллу поражаемости

На рисунке 9 мы видим усыхание отдельных мелких пятен на краях пластинок у листьев (1 балл поражаемости).



Рисунок 10 – Симптомы проявления сосудистого бактериоза, соответствующие 2 баллам поражаемости

На представленном рисунке 10 на растениях капусты белокочанной видны отдельные, довольно крупные усыхания с краев пластинки листьев бурого или коричневого цвета, имеющие V-образную форму, окаймленную узким светло-зеленым ореолом отмирающих клеток (2 балла поражаемости).

При сравнении результатов ПЦР-анализа растений  $F_2$  с результатами фитопатологического тестирования по каждому растению было обнаружено, что только результаты апробации маркера O110-C01 имели положительную корреляцию с результатами фитопатологического тестирования. Было установлено, что растения  $F_2$  по локусу O110-C01, локализованному в 4 хромосоме, имеют следующее соотношение по генотипу: 26:52:24, что соответствует менделевскому закону расщепления 1:2:1. По фенотипу растения делятся в таком отношении: 64 (неустойчивые): 38 (устойчивые), что не удовлетворяет менделевскому 3:1, так как устойчивость к сосудистому бактериозу – полигенный признак. Из 52 гетерозигот 38 оказались неустойчивыми по фенотипу, так как устойчивость к бактериозу – рецессивный признак (Kifuji et al., 2013), а 14 по фенотипу – устойчивыми. Судя по всему, в генотипе этих устойчивых гетерозиготных образцов имеются еще другие гены/локусы резистентности, для которых необходимо выявлять другие информативные молекулярные маркеры, чтобы четко идентифицировать гены *Xsc* и их аллельное состояние. Оценка соответствия полученных данных с теоретически ожидаемыми проводилась методом  $\chi^2$  (хи-квадрат) (раздел 3.7).

Таким образом, маркер O110-C01 является информативным кодоминантным микросателлитным маркером, который выявляет все типы аллельных состояний гена в селекционном материале, что является одним из условий идеального молекулярного маркера (Дубина, 2019; Супрун, 2005), является сонаследуемым с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу

### 3.4 Апробация молекулярных маркеров на контрастных по устойчивости к фузариозу изогенных линиях и селекционных образцах капусты белокочанной

На первом этапе при проведении молекулярно-генетических исследований по выявлению информативных ДНК-маркерных систем для идентификации аллелей устойчивости к фузариозу SSR-маркеры, взятые из базы данных на сайте (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), расположенные в 6 группе сцепления, где находится ген устойчивости к фузариозу *Foc 1*, были апробированы на контрастных по резистентности к фузариозу изогенных линиях капусты белокочанной. Из этих маркеров информативным оказался только O110-D01, результаты апробации которого представлены на рисунке 11.

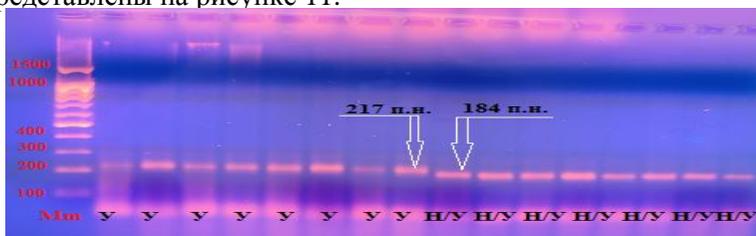


Рисунок 11 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу O110-D01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание - У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У-изогенная неустойчивая линия КБ1П.

На представленной электрофореграмме видна четкая аллельная разница между изучаемыми контрастными по устойчивости к фузариозу изогенными линиями. Размер устойчивого аллеля – 217 п.н., неустойчивого – 184 п.н.

На следующем этапе была проведена апробация 2 кодоминантных InDel маркеров (A1 и M10), выявляющих высокий полиморфизм у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной (Lv et al., 2013), и SSR-маркера *Frg13*, тесно сцепленного с геном устойчивости к фузариозу *Foc1* (0,1 cM) (Liu et al., 2013).

Результат электрофоретического разделения ПЦР-продуктов по данным локусам представлен на рисунках 12, 13.

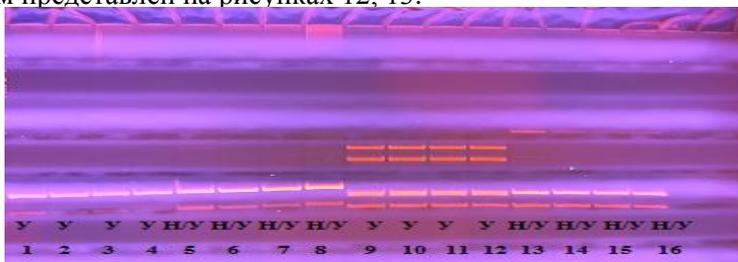


Рисунок 12 - Визуализация продуктов ПЦР по локусам А1 и М10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П; 1-8 – растения, анализируемые по локусу А1, 9-16– растения, анализируемые по локусу М10.

Из рисунка 12 видно, что по локусу А1 не имеется аллельной разницы в ПААГ между устойчивыми и неустойчивыми образцами, и их ДНК-профили одинаковы. А по локусу М10 у контрастных по устойчивости образцов видны полиморфные аллели в полиакриламидном геле. Таким образом, из этих двух маркеров только М10 в полиакриламидном геле можно использовать в дальнейших исследованиях на селекционных образцах.

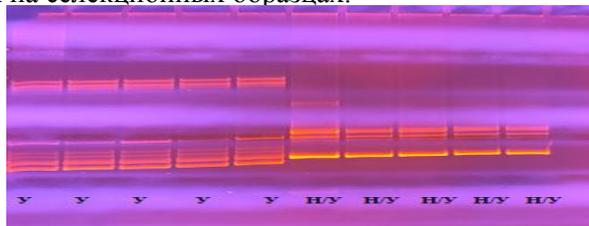


Рисунок 13 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из рисунка 13 видно, что по локусу Frg13, близко расположенному к гену устойчивости к фузариозу *Foc1*, также наблюдается аллельная разница между контрастными формами. Следовательно, имело смысл изучить сонаследование данного маркера на сегрегирующей F<sub>2</sub>-популяции по признаку устойчивости к фузариозу.

Далее растения  $F_2$  гибридной комбинации ДТ-46 х К61П были проанализированы с помощью информативных молекулярных маркеров отобранных ранее, что отражено на рисунках 14-16.

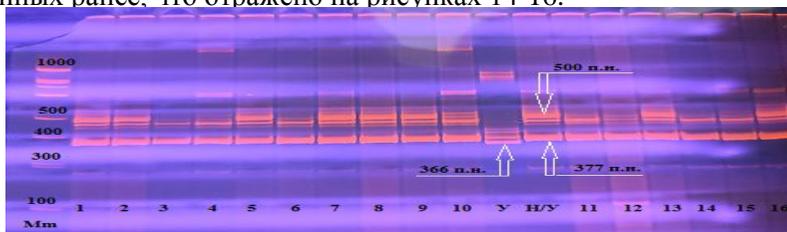


Рисунок 14 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – Мм- маркер молекулярной массы; 1-16 – растения поколения  $F_2$  гибридной комбинации ДТ-46 х К61П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия К61П.

Из рисунка 14 видно, что по локусу Frg13 не наблюдается расщепление растений по генотипу на гомо- и гетерозиготы, как это должно быть согласно второму закону Менделя, поэтому данный маркер не пригоден для ранжирования селекционных образцов капусты белокочанной по признаку устойчивости к фузариозу.

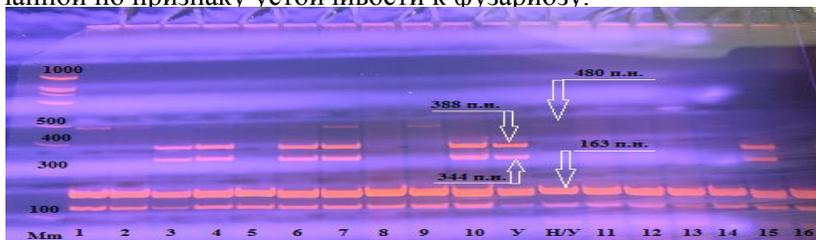


Рисунок 15 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу M10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – Мм- маркер молекулярной массы; 1-16 – растения поколения  $F_2$  гибридной комбинации ДТ-46 х К61П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия К61П.

При анализе электрофореграммы рисунка 15 можно заметить, что уже среди первых проанализированных растений выявляется расщепление по генотипу, т.е. растения №№1, 2, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 16 имеют аллели восприимчивости размером 163 и 480 п.н., растения №№3, 15 имеют в генотипе аллели устойчивости размером 344 и 388 п.н., а растения №№4, 6, 7, 10 гетерозиготны.



Рисунок 16 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу O110-D01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание – 1-16 – растения поколения F<sub>2</sub> гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У – изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На электрофореграмме рисунка 16 представлено аллельное разнообразие по локусу O110-D01 уже среди первых проанализированных растений сегрегирующей популяции. Можно увидеть, что растения №№1, 2, 7, 9 14, 15 являются гомозиготами по рецессивной аллели, растения №№5, 6, 16 являются гомозиготами по доминантной аллели, а растения №№3, 4, 11, 12, 13 гетерозиготны.

Так как во время работы прослеживалась положительная корреляция результатов ДНК-анализа по локусам O110-D01, M10 и фитопатологического тестирования (раздел 3.5), был проведен анализ по данному локусу всей выборки сегрегирующей популяции (62 растения) для установления окончательного соотношения по генотипу и фенотипу.

### **3.5 Проведение фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу и сравнение полученных данных с результатами ПЦР-анализа**

В 2022 году для проверки информативности отобранных в молекулярно-генетических исследованиях маркеров проводилось фитопатологическое тестирование растений F<sub>2</sub> гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П, полученных в результате принудительного самоопыления растений F<sub>1</sub>. Оценку поражаемости образцов проводили в динамике роста и развития растений по шкале, разработанной «ВНИИ риса» (Королева и др., 2012). По результатам фитопатологического тестирования было установлено, что симптомы поражения фузариозом у растений сегрегирующей популяции капусты белокочанной соответствовали 1 и 2 баллам, т.е. наблюдалось только поражение отдельных листьев без остановки роста и гибели семян, что отражено на рисунках 17, 18.



Рисунок 17 – Симптомы поражения фузариозом, соответствующие 1 баллу поражения

На рисунке 17 видны пожелтение, увядание и усыхание семядольных листьев, что соответствует 1 баллу поражаемости.



Рисунок 18 – Симптомы поражения фузариозом, соответствующие 2 баллам поражения

На рисунке 18 видно, что у растений сегрегирующей популяции  $F_2$  капусты белокачанной, помимо усыхания и увядания семядольных листьев, наблюдается пожелтение настоящих листьев, что указывает на 2 балла поражения фузариозом.

На завершающем этапе исследования проводился сравнительный анализ результатов ДНК-анализа с использованием молекулярных маркеров (M10 и O110-D01), выявивших все типы аллельного состояния гена устойчивости к фузариозу у растений  $F_2$  с результатами фитопатологического тестирования, из которого следует, что растения  $F_2$  по локусу O110-D01 имеют следующее соотношение по генотипу: 16:31:15, что соответствует менделевскому закону расщепления 1:2:1 и подтверждается статистическим анализом (раздел 3.7.), а по локусу M10 – 9:17:36, что не удовлетворяет закону Менделя. Окончательное

соотношение по фенотипу следующее: 48 (устойчивые): 14 (неустойчивые), что удовлетворяет менделевскому 3:1, т.к. устойчивость к фузариозу имеет моногенный доминантный тип (Ramirez-Villupadua et al., 1985), и подтверждается методом хи-квадрат (раздел 3.7).

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что по результатам сравнительного анализа растений капусты белокочанной по генотипу и фенотипу маркер O110-D01 является информативным кодоминантным маркером, сонаследуемым с признаком устойчивости к фузариозу.

### 3.6 Апробация информативного SSR-маркера O110-D01 на BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>-популяции

С помощью информативного SSR-маркера O110-D01, выявленного на предыдущем этапе исследования были проанализированы растения BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>-популяции, полученные в результате скрещивания F<sub>1</sub>-гибрида комбинации ДТ-46 х Кб1П с рекуррентной устойчивой родительской формой ДТ-46 с целью проверки эффективности его работы и отбора растений с донорным геном устойчивости. Результаты одного из анализов растений BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> представлены на рисунке 19.

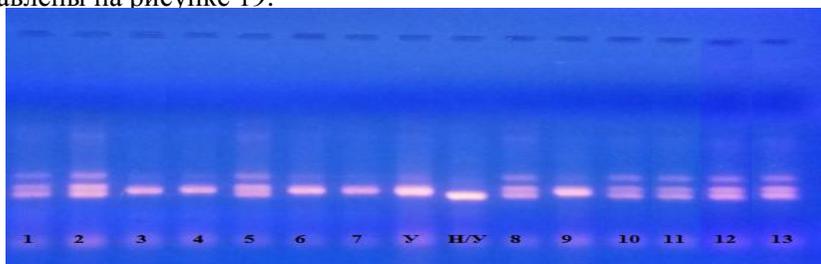


Рисунок 19 – Результаты ДНК-анализа растений BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> по локусу O110-D01

Примечание – 1-13 – растения поколения BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х ДТ-46; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из электрофореграммы рисунка 19 видно, что растения №№ 1, 2, 5, 8, 10-13 являются гетерозиготами, растения №№ 3, 4, 6, 7, 9 – гомозиготы по донорному аллелю устойчивости.

В результате проведения ДНК-анализа всех 55 растений BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>-популяции по локусу O110-D01 установлено, что 29 растений имеют в генотипе только донорный аллель устойчивости, т.е. гомозиготны по доминантной аллели, 26 - гетерозиготны по изучаемому локусу, что

удовлетворяет теоретически ожидаемому расщеплению по генотипу в беккроссной популяции 1:1 и подтверждается статистической проверкой методом хи-квадрата ( $\chi^2$ ) (раздел 3.7). Впоследствии проанализированные растения, обладающие положительными морфометрическими характеристиками, будут отобраны для ведения дальнейшего селекционного процесса капусты белокочанной на устойчивость к фузариозу и получения последующих поколений.

### 3.7 Статистическая проверка достоверности полученных данных методом хи-квадрата ( $\chi^2$ )

Статистический анализ расщепления полученных растений капусты белокочанной в сегрегирующих популяциях  $F_2$  и  $BC_1F_1$  по генотипу и фенотипу и определение его соответствия менделевскому закону расщепления проводили путем расчета показателя  $\chi^2$  для каждого класса расщепления, определения суммарного показателя хи-квадрата  $\chi^2(\text{сум.})$  для каждой популяции и его сравнения с критическим значением  $\chi^2(\text{крит.})$  из таблицы Фишера (Лобашев, 1969). Учитывали, что уровень значимости в данном исследовании составляет 0,5.

Для расщепления в  $F_2$ -популяции по генотипу по локусу O110-C01  $\chi^2$  (крит.) с учетом числа степеней свободы, равного 2, составляет 1,39, а  $\chi^2(\text{сум.})$  равно 0,23, т.е.  $\chi^2(\text{сум.}) < \chi^2(\text{крит.})$ , следовательно, отклонение между фактическим расщеплением и теоретическим несущественно и носит случайный характер, т.е. оно соответствует менделевскому 1:2:1. Для расщепления в  $F_2$ -популяции по локусу O110-D01  $\chi^2$  (крит.) так же составляет 1,39, а  $\chi^2(\text{сум.})$  равно 0,09, т.е.  $\chi^2(\text{сум.}) < \chi^2(\text{крит.})$ , поэтому оно так же удовлетворяет менделевскому закону 1:2:1. Для расщепления в  $BC_1F_1$ -популяции по локусу O110-D01  $\chi^2$  (крит.) с учетом числа степеней свободы, равного 1,  $\chi^2$  (крит.) составляет 0,46, а  $\chi^2(\text{сум.})$  равно 0,18, следовательно, и в данном расщеплении  $\chi^2(\text{сум.}) < \chi^2(\text{крит.})$ , и оно удовлетворяет расщеплению в беккроссной популяции 1:1.

Оценка расщепления в исследованных популяциях по фенотипу проводилась с учетом уровня значимости 0,5 и степени свободы, равной 1. При данных параметрах  $\chi^2$  (крит.) по таблице Фишера составляет 0,46. Для расщепления в  $F_2$ -популяции гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 по признаку устойчивости к сосудистому бактериозу  $\chi^2(\text{сум.})$  равно 7,43, т.е.  $\chi^2(\text{сум.}) > \chi^2(\text{крит.})$ , поэтому отклонения носят неслучайный характер и данное расщепление не соответствует менделевскому по фенотипу 3:1, что объясняется прежде всего тем, что устойчивость к данной болезни у капусты белокочанной имеет полигенный рецессивный характер наследования (Kifuji et al., 2013). Для расщепления в  $F_2$ -популяции гибридной комбинации ДТ-46 x К61П по признаку устойчивости к фузариозу  $\chi^2(\text{сум.})$  равно 0,34, и

$\chi^2(\text{сум.}) < \chi^2(\text{крит.})$ , т.е. оно соответствует менделевскому 3:1 и объясняет моногенный доминантный тип наследования устойчивости (Ramirez-Villupadua et al., 1985).

## ВЫВОДЫ

1. С помощью ПЦР-анализа апробированы нейтральные микросателлитные (SSR) маркеры из базы данных VegMarks и молекулярные маркеры из литературных источников на контрастных по резистентности к сосудистому бактериозу и фузариозу образцах капусты белокочанной. Установлено, что микросателлитные маркеры O110-C01, O111-H06 и VoESSR726 выявляют полиморфизм между контрастными по устойчивости к сосудистому бактериозу образцами капусты белокочанной, а InDel маркер M10 и SSR-маркеры Frg13 и O110-D01 – между контрастными по резистентности к фузариозу образцами капусты белокочанной.

2. Проведена гибридизация контрастных линий капусты белокочанной по устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу, и получены гибридные потомства ( $F_1$ ,  $F_2$ -поколение).

3. Проведены ПЦР-анализ на растениях  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс-12п x Пи714 с помощью SSR-маркеров O110-C01, O111-H06 и VoESSR726, фитопатологическое тестирование полученных растений  $F_2$  и сравнение его результатов с результатами ПЦР-анализа. Установлено, что SSR-маркер O110-C01 является сонаследуемым с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу. Выделены 15 растений  $F_2$  гибридной комбинации 269-Яс-12п x Пи714 с генами устойчивости к сосудистому бактериозу и переданы в селекционный процесс для создания устойчивой к сосудистому бактериозу генплазмы капусты белокочанной. Проведены ПЦР-анализ на растениях  $F_2$  гибридной комбинации ДТ-46 x К61П с помощью InDel-маркера M10 и SSR-маркеров Frg13 и O110-D01, фитопатологическое тестирование полученных растений  $F_2$  и сравнение его результатов с результатами ПЦР-анализа. Установлено, что SSR-маркер O110-D01 является сонаследуемым с признаком устойчивости к фузариозу.

4. Определены информативные кандидатные ДНК-маркерные системы: O110-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и O110-D01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*.

## ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Рекомендовать выявленные информативные маркерные системы по идентификации целевых генов устойчивости к сосудистому бактериозу (*Xcc*) и фузариозному увяданию (*Foc1*) капусты

белокочанной O110-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу Хсс и O110-D01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*, в селекционный процесс для ускоренного создания устойчивых генотипов к сосудистому бактериозу и фузариозу, с повышенной урожайностью и отличными потребительскими свойствами, которые позволят решить проблему импортозамещения и получения продуктов здорового питания (экологически безопасной продукции, выращенной с применением пониженного количества средств химической защиты).

Полученный селекционный материал: 15 растений F<sub>2</sub> гибридной комбинации 269-Яс-12п x Пи714 с генами устойчивости к сосудистому бактериозу и растения ВС<sub>1</sub>F<sub>1</sub> гибридной комбинации (ДТ-46 x Кб1П) x ДТ-46 с генами устойчивости к фузариозу и обладающие положительными морфометрическими характеристиками - использовать для дальнейшей программы по созданию перспективной генетической плазмы капусты белокочанной, обладающей резистентностью к данным болезням.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Макуха Ю.А. Разработка методологии оценки устойчивости капусты белокочанной к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* с применением SSR-маркеров / Ю.А. Макуха, Е.В. Дубина // Материалы Международной научно-практической конференции «Научные приоритеты адаптивной интенсификации сельскохозяйственного производства». Краснодар, 3-5 июля 2019 г. - С. 101-106.
2. Макуха Ю.А. Разработка методологии оценки устойчивости капусты белокочанной к *Xanthomonas campestris* с применением SSR-маркеров / Ю.А. Макуха, Е.В. Дубина // Рисоводство. – 2019. - № 3 (44). – С. 27-32.
3. Makukha Yu. PCR identification of genes of resistance to black rot in white cabbage using SSR-markers / Yu. Makukha // BIO Web of Conferences.- 2020. – V. 21. – 5 p.
4. Makukha Yu. Molecular marking in breeding Brassica oleracea L. for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / Yu. Makukha, E. Dubina // E3S Web of Conferences. – 2021. - V.285. – 6 p.
5. Дубина Е.В. Изучение полиморфизма SSR-локусов устойчивости к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* у капусты белокочанной / Е.В. Дубина, Ю.А. Макуха // Рисоводство. - 2021 г.- № 3 (52).- С. 43-48.