

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РИСА»
(ФГБНУ «ФНЦ риса»)

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор РАН
Е.В. Дубина

Краснодар, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Биология капусты белокочанной (<i>Brassica oleracea</i> L.).....	10
1.2 Проблема сосудистого бактериоза капусты белокочанной.....	11
1.2.1 Симптомы сосудистого бактериоза.....	13
1.2.2 Расовый состав <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	14
1.2.3 Устойчивость к сосудистому бактериозу капусты белокочанной. .	15
1.3 Проблема фузариозного увядания капусты белокочанной.....	16
1.3.1 Расовый состав и <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> и наследование устойчивости к фузариозу.....	17
1.4 Использование полимеразной цепной реакции в генетических исследованиях.....	18
1.5 Типы ДНК-маркеров.....	20
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
2.1 Выделение ДНК из листьев растений капусты белокочанной.....	24
2.2 Подбор оптимальных условий для проведения ПЦР.....	26
2.3 Проведение электрофореза.....	29
2.4 Молекулярные маркеры используемые в исследовании.....	30
2.4.1 SSR-маркеры на устойчивость к сосудистому бактериозу.....	30
2.4.2 Молекулярные маркеры на устойчивость к фузариозу.....	34
2.5 Методика проведения фитопатологического тестирования.....	37
2.6 Статистический анализ расщепления.....	39
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	40
3.1 Селекция капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу.....	40
3.2 Апробация SSR-маркеров на контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу изогенных линиях и селекционных образцах	

капусты белокочанной.....	43
3.3 Проведение фитопатологического тестирования на устойчивость к сосудистому бактериозу и сравнение полученных данных с результатами ПЦР-анализа.	62
3.4 Апробация молекулярных маркеров на контрастных по устойчивости к фузариозу изогенных линиях и селекционных образцах капусты белокочанной.....	73
3.5 Проведение фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу и сравнение полученных данных с результатами ПЦР- анализа.....	89
3.6 Апробация информативного SSR-маркера Ol10-D01 на BC ₁ F ₁ - популяции.....	96
3.7 Статистическая проверка достоверности полученных данных методом хи-квадрата (χ^2)	99
ВЫВОДЫ.	103
ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	106
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

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.) – гриб, 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 в; 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 а), 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_1 , F_2 -поколение).
3. С использованием отобранных(ого) SSR-маркеров(а) установить их сонаследуемость с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу на полученной сегрегирующей популяции (F_2 -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 *Foc1* и рекомендовать их в селекционный процесс для ускоренного создания устойчивых генотипов к данным 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 генов устойчивости к фузариозу *Foc1* 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 проведения 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: Ol10-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc*

и Ol10-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: Ol10-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и Ol10-D01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*, а также полученный в работе селекционный материал (растения F₂ гибридных комбинаций 269-Яс-12п х Пи714, ДТ-46 х 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» (2019-2022 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. Зеленоград, 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.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя состоит в теоретической подготовке и разработке плана исследований, постановке и проведении научных экспериментов, опытов, синтезе и анализе полученных результатов, в частности: непосредственном участие в проведении научных исследований, сборе экспериментальных данных, их анализе и обработке; апробации результатов исследований; подготовке и опубликованию результатов исследований в научных изданиях, включая рекомендуемые перечнем ВАК Минобрнауки РФ и WOS.

Экспериментальные результаты получены автором лично при совместном сотрудничестве с селекционерами и фитопатологами отдела овощекartoфелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса».

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук, профессору РАН Дубина Елене Викторовне за всестороннюю обширную поддержку и помощь в проведении исследований, интерпретации полученных результатов и написании диссертационной работы, а также предоставлении необходимых технических

возможностей для проведения лабораторных и вегетационных экспериментов, кандидату сельскохозяйственных наук Королевой Светлане Викторовне за предоставленный исходный материал (родительские формы) для проведения исследований и ценные советы, Дякунчак Светлане Александровне за методическую и консультативную помощь при выполнении фитопатологических тестов. Также выражаю благодарность своему коллективу за плодотворное сотрудничество, поддержку и помощь. Глубокую благодарность выражаю своим родителям и всем друзьям, поддерживавшим меня в работе.

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 119 страницах машинописного текста, включающих 9 таблиц, 58 рисунков, 1 приложение. Список использованной литературы включает 105 источников, в том числе - 62 иностранных авторов.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биология капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.)

Капуста белокочанная – двулетнее растение. В первый год растение образует укороченный толстый густо облиственный стебель (кочерыга), несущий на себе розетку листьев и заканчивающийся кочаном. На второй год из верхушечной почки образуются мощные высокие (1,0 – 1,8 м) цветonoсные побеги (стебли), на которых в дальнейшем формируются стручки с семенами (Прохоров и др., 1997; Путьрский, 2004). Корневая система капусты мощная, хорошо разветвлённая, мочковатая при рассадном способе выращивания культуры и стержневая при безрассадном. Стебли прямостоячие или полуприподнятые, ветвистые. Стебель короткий у раннеспелых сортов и удлинённый у позднеспелых сортов. Стебель (кочерыга) высотой до 15 см считается низким, 16 – 20 см – средним и более 20 см – высоким. Листья у капусты очередные, нижние часто образуют розетку. Нижние листья черешковые, раскидистые, а верхние – сидячие. Пластинка листа крупная, с толстыми жилками. Лист бывает короткочерешковым (4 – 10 см), средне черешковым (10 – 15 см), длиннoчерешковым (более 15 см). Форма листовой пластинки – удлинённая, округлая, широкая. Величина листовой пластинки (характеризуют по длине) может быть мелкая (25 – 40 см), средняя (40 – 50 см), крупная (более 50 см), а её поверхность листа – плоская, вогнутая и выпуклая. Поверхность ткани листьев – гладкая и морщинистая (морщинистость мелкая, средняя и крупная). Окраска листьев варьируется от светло- и серо-зелёной до темно-зелёной и фиолетовой разной интенсивности, часто с восковым налетом разной степени (Белик, 1992). Кочан представляет собой разросшуюся верхушечную почку, в которой откладываются запасные питательные вещества, служащие на следующий год для построения цветочного стебля и

органов плодоношения. У разных сортов кочаны могут сильно отличаться по размеру и форме. Диаметр кочана от 10 до 45 см и более (Балашов, 1981). Цветки собраны в соцветие кисть. Цветок обоеполый, среднего размера. Околоцветник свободный, состоит из четырех чашелистиков и четырех лепестков. Лепестки желтые или белые, гладкие и слабо гофрированные. Тычинок шесть: две наружные короткие, четыре внутренние длинные. Пестик образован двумя плодолистиками, имеет головчатое рыльце, короткий столбик и длинную верхнюю завязь (Белик, 1992). Период цветения в зависимости от сорта 20 – 50 дней. Отдельный цветок цветет около трех дней. Капуста – перекрестноопыляющееся растение. Пыльцу переносят насекомые, главным образом пчелы, и частично ветер. Семена созревают через 3 – 3,5 месяца после высадки семенников (Балашов, 1981). Плод – стручок с коническим носиком, имеет цилиндрическую и плоскоцилиндрическую форму, ровную или в разной мере бугорчатую поверхность. В стручке до 25 – 35 семян. Семена округлые или шаровидные со слабо мелкоячеистой поверхностью. Окраска от коричневой до черной. Масса 1000 штук – 2,5 – 5,0 г (Белик, 1992). Капуста белокочанная — холодостойкая культура, переносит заморозки до минус 3 – минус 4 °С, оптимальная температура для роста +15 – +17 °С. Она очень влаголюбива, но вместе с тем не переносит переувлажнение почвы. Предпочитает плодородные, окультуренные почвы с pH не ниже 5,5. Помимо этого культура отзывчива на удобрения (органические и минеральные). В начале вегетации наиболее требовательна к азоту (N), во время формирования кочана – к фосфору (P) и калию (K) (Лизгунова, 1984).

1.2 Проблема сосудистого бактериоза капусты белокочанной

Сосудистый бактериоз капусты встречается на всех континентах, где выращивают эту культуру (Bradbury, 1986), но наибольший вред наносит в

областях с теплым и влажным климатом. Это заболевание может снизить урожайность капусты в благоприятных условиях более чем на 50% (Williams, 1980). В результате климатических изменений, в частности потепления, сосудистый бактериоз станет в будущем весьма существенной проблемой в северных регионах Европы, занимающихся овощеводством (Vicente, Holub, 2013). Впервые сосудистый бактериоз обнаружили в штатах Кентуки и Висконсин в конце 1880-х годов, и с тех пор заболевание присутствует во всех штатах США (Williams, 1980).

В России основной зоной высокой вредоносности считаются Центральный, Черноземный, Западно-Сибирский регионы, Краснодарский край, Поволжье, Приморский край (Игнатов, Лазарев, 2013). В зависимости от региона сосудистый бактериоз вызывает потери 23-57% у восприимчивых сортов капусты (Игнатов, 1992; Dzhililov, Tiwari, 1995). В эпифитотийные годы в Московской области поражение растений достигало 90-100% (Рогачев, 1991). В Воронежской области пораженные растения достигало 15-53% у раннеспелых сортов, и 6-8% у среднеспелых сортов капусты. В Алтайском крае и в Омской области пораженность растений достигало 10-25% (Лазарев и др., 2017). В 2017 году на территории Российской Федерации из 25,48 тыс. га обследованных полей капусты белокочанной сосудистый бактериоз был распространен на площади 2,32 тыс. га (Говоров и др., 2018). Вредоносность сосудистого бактериоза состоит также в том, что даже незначительное или бессимптомное поражение приводит к усиленному развитию других болезней, таких как мокрая (мягкая) бактериальная гниль и альтернариоз (Dzhililov, Tiwari, 1995).

Селекцию устойчивых сортов считают наиболее эффективным способом снижения экономического ущерба от болезни. Во многих регионах мира с субтропическим климатом используют только сорта, устойчивые к сосудистому бактериозу (Лазарев и др., 2017).

1.2.1 Симптомы сосудистого бактериоза

Сосудистый бактериоз вызывается бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – граммотрицательной, неспороносной палочкой размером 0,6-0,7 x 1,2-1,7 мкм с полярным жгутиком, которая является облигатным аэробом. Оптимальная температура размножения 25-30 °С, максимальная – 38-39 °С, минимальная – 5 °С. Характерной особенностью *X. campestris* pv. *campestris* является синтез ксантана (Saddler, Bradburry, 2005). Этот полисахарид образует слизистую капсулу, которая защищает клетку от высыхания и играет важную роль в прикреплении бактерии к клеточной стенке растения (Во Тхи Нгок Ха, 2015; García-Ochoa et al., 2000). Патоген перезимовывает в почве преимущественно в растительных остатках (Джалилов, Тивари, 1995); на сорных растениях семейства Капустные (Schaad, Dianese, 1981) и в семенах (Schaad, 1982; Franken, 1992). Патоген может сохраняться в семенах до трех лет (Bazzi, 1991), в почве - от 14 до 42 дней. В пораженных растительных остатках возбудитель сохраняется до 244 дней (Schaad, White, 1974). Этот период сохранения жизнеспособности зависит от климата и может варьировать от двух месяцев в тропиках до двух лет в сухом и прохладном регионе (Strandberg, 1973).

Поражение капустных растений проявляется на всех стадиях выращивания культуры: на всходах, рассаде, растущих в поле растениях первого года и семенниках (Джалилов, 1996). Проникновение патогена в растение может происходить через механические повреждения, устьица и гидатоды. На листьях появляются по краям хлоротичные пятна, которые затем принимают V-образную форму. У пораженного растения сосуды становятся темными – от коричневого до черного цвета (Goto, 1992). При системном поражении наблюдаются увядание и опадение пораженных листьев (Matsumoto, 1975). К начальным симптомам можно отнести появление сетки потемневших сосудов (Schaad, Thaveechai, 1983). В

некоторых случаях на листьях появляются округлые некротические пятна. Иногда увядание и некротизация сосудов ксилемы не приводит к пожелтению листьев. При высокой температуре симптомы у пораженных растений белокочанной и цветной капусты могут быть сходными с симптомами слизистого бактериоза (Ignatov et al., 1992). В связи с повышением вирулентности патогена *X. campestris*, в последний годы отмечают новые виды симптомов, такие как появление на листьях темно-зеленых водянистых пятен, с последующим их хлорозом и опадением (Tatjana et al., 2013). Системное поражение растений развивается в результате размножения бактерий в проводящей ткани. После заражения через гидатоды, бактерии передвигаются из межклеточного пространства паренхимы в сосуды ксилемы и затем распространяются по черешку, стеблю и корню. Размножение бактерий приводит к нарушению нормального развития растений. При раннем заражении больные растения не формируют кочан, что приводит к значительным потерям урожая. В поле симптомы системного поражения сосудистым бактериозом сходно с фузариозным увяданием, вызываемым грибом *Fusarium oxysporum*. Для точной диагностики этих болезней необходимо разрезать кочерыгу в поперечном направлении. При этом в случае сосудистого бактериоза сосуды будут иметь черную окраску, а не буро-коричневую как при фузариозе. Сосудистый бактериоз с некрозом сосудов принято считать типичным проявлением болезни (Ахатов и др., 2006).

1.2.2 Расовый состав *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Создание устойчивых сортов капусты к сосудистому бактериозу – достаточно сложная задача, так как возбудитель обладает высокой степенью генетической, серологической и биологической изменчивости (Alvares et al., 1994; Tsygankova et al., 2004). Анализ расового состава дает информацию о

генах вирулентности в популяциях патогенов, что играет важную роль в селекции устойчивых сортов и их районировании. На основе изучения взаимодействия штаммов возбудителя сосудистого бактериоза *X. campestris* pv. *campestris* с различными сортами и гибридами *Brassica rapa* и *Brassica juncea* S. Kamoun с соавторами (1992) впервые выделили пять рас патогена по способности заражать растения-дифференциаторы с тремя расово-специфическими генами устойчивости. Семь патогенных рас были идентифицированы на основе взаимодействия между сортами-дифференциаторами видов *Brassica* и различными штаммами *Xcc* (Jensen et al., 2010). Позже эта модель была расширена до девяти рас *Xcc*. (Fargier, Manceau, 2007; Vicente, Holub, 2013). В 2017 году в Португалии были зарегистрированы еще две новые расы этого организма: раса 10 и раса 11 (Cruz et al., 2017). В России преобладают изоляты возбудителя сосудистого бактериоза, относящиеся к расам 1 и 4, в меньшей степени распространены расы 0 и 3 (Монахос, 2009).

1.2.3 Устойчивость к сосудистому бактериозу

Безусловно, наиболее радикальным методом защиты от сосудистого бактериоза является создание и выращивание устойчивых сортов и гибридов F_1 капусты белокочанной. Процесс выведения устойчивых сортов и гибридов капусты белокочанной осложняется наличием у патогена большого количества физиологических рас. Отсутствие на рынке F_1 -гибридов капусты белокочанной не поражаемых сосудистым бактериозом объясняется отсутствием у растений *B. oleracea* генов, обеспечивающих устойчивость ко всем расам возбудителя заболевания (Монахос, Елышко, 2015).

Предполагается, что резистентность к разным расам *Xcc* контролируется разными *R*-генами и QTL (*Xcc*). Источники устойчивости к основным поражающим расам *Xcc* (1 и 4) в основном связаны с А и В

геномами (*B. rapa* и *B. nigra*) и редко встречаются в геноме С (*B. oleracea*) (Taylor et al., 2002; Vicente, Holub, 2013). В исследованиях Монахоса (2015) было установлено, что доминантный ген устойчивости *Rb* у линии PI 199947 *B. carinata* является сильным, и устойчивость к расам 1, 3 и 4, контролируемая им, не зависит от концентрации возбудителя и способа инокуляции. Однако, попытки его переноса из *B. carinata* в *B. oleracea* пока не увенчались успехом (Монахос, 2015).

Резистентность к сосудистому бактериозу может проявляться в мезофилле (листовая устойчивость) (Самохвалов и др., 1995), окружающем гидатоды и сосудах ксилемы (стеблевая устойчивость) (Ситников, Дякунчак, 2009), которая контролируется разными генами и носит полигенный характер наследования (Беренсен и др., 2019).

1.3 Проблема фузариозного увядания капусты белокочанной

Возбудителем фузариозного увядания капусты белокочанной является почвенный гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wollenweb.) (Snyder, Hansen, 1940). Колонизация растения этим грибом ведет к пожелтению листьев, увяданию, дефолиации (у старых растений), прекращению роста и, в конце концов, к гибели растения. В результате, урожай претерпевает значительные потери (Walker, 1930). Теплая погода является благоприятным условием для развития болезни, и, учитывая растущие уровни производства культуры в регионах с умеренным климатом, эта болезнь становится настоящей проблемой (Bosland et al., 1988; Farnham et al., 2001). Глобальное потепление также может спровоцировать увеличение количества случаев заболевания фузариозом (Berrocal-Lobo, Molina, 2007).

В последние годы фузариоз является наиболее распространенным заболеванием капусты на Кубани и поражает растения как в открытом, так и в защищенном грунте. Заболевание проявляется во всех фазах вегетации

растения. В отдельные годы гибель растений от фузариоза может составлять 20-30 и более процентов. Неустойчивые к патогену образцы выпадают от фузариоза практически полностью. Так, например, в 2010 году фузариозом в Краснодарском крае поразились более 30 % сортов и гибридов капусты белокочанной отечественной и зарубежной селекции (Королева и др., 2012).

Высокая поражаемость культуры фузариозом свидетельствует, с одной стороны, о недостаточности эффективности проводимых работ в селекции на устойчивость к этому патогену, и, с другой стороны, о необходимости проведения региональной селекции и экологического испытания новых гибридов.

Использование овощных севооборотов с короткой ротацией культур и увеличение в них доли зернового клина также приводит к накоплению фузариума в почве, что ухудшает фитосанитарную обстановку на посевах капусты. Но основной причиной поражаемости этой культуры является выращивание неустойчивых к этому патогену сортов и гибридов. Поэтому поиск и создание доноров резистентности к фузариозу представляет особую актуальность (Park et al., 2002).

1.3.1 Расовый состав *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* и наследование устойчивости к фузариозу

В настоящее время известно 2 расы *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Booth, 1971; Armstrong, 1981). Первая раса является преобладающей и распространена по всему миру (Walker, Blank, 1934; Ramirez-Villupadua et al., 1985), в то время как вторая раса зарегистрирована только в США и России (Bosland, Williams, 1988; Morrison et al., 1994).

Сорта капусты, несущие гены устойчивости к фузариозу, были изначально получены в США в начале 21 века (Walker et al., 1927; Anderson, 1933). Поколения растений, полученные от скрещиваний между

устойчивыми и восприимчивыми сортами были проанализированы с целью определить генетическую основу устойчивости капусты белокочанной к фузариозу (Walker, 1930; Walker, Smith, 1930; Blank, 1937). Зарегистрировано 2 типа устойчивости к фузариозу: тип А и тип В (Blank, 1937). Тип А контролируется одним доминантным геном устойчивости к фузариозу, вызываемому первой расой *Fusarium oxysporum*. Он эффективен при любой температуре почвы и уровне минерального питания (Walker, 1930; Walker, Hooker 1945). Тип В наследуется полигенно и становится нестабильным при температуре выше 24 °С (Walker, Smith, 1930; Blank, 1937; Walker, 1953). Механизм наследования устойчивости к расе 2 к настоящему моменту неизвестен (Bosland, Williams, 1987). Тип А устойчивости активно применяется при селекции капусты белокочанной, так как является удачной моделью длительного моногенного доминантного типа устойчивости (Dixon, 2007).

Традиционные методы защиты от фузариоза, такие как химический контроль или применение севооборота почти не помогают в решении данной проблемы. Отмечено, что наиболее эффективным методом контроля болезни является выращивание устойчивых сортов (Arden, 1979; Keinath, et al. 1998). В последние годы применение MAS в селекции капусты белокочанной на устойчивость к фузариозу является эффективным методом борьбы с данной болезнью. Особенно эффективным является применение ПЦР-анализа с использованием SSR- и InDel-маркеров (Collard et al., 2005; Vali et al., 2008; Lv et al., 2011).

1.4 Использование полимеразной цепной реакции в генетических исследованиях

Методы генетического анализа на основе ПЦР (полимеразно-цепной реакции) основаны на реализованном в 1985 году способе амплификации

(размножении копий) фрагмента ДНК (Маниатис и др., 1984). Этот процесс повторяет все естественные механизмы репликации ДНК.

Сначала при анализе выделяют молекулу ДНК, которую затем нагревают. Это приводит к ее распаду на две нити. После этого добавляют специфичные праймеры, и полученную смесь охлаждают. В случае наличия в ДНК искомого гена, специфичные праймеры связываются с его комплементарными участками.

Далее к смеси ДНК и праймеров добавляют Таq-полимеразу и нуклеотиды, устанавливая температуру, которая является оптимальной для Таq-полимеразы (температура равна 37 °С). В данных условиях в случае комплементарности ДНК гена и праймера, нуклеотиды присоединяются к 3'-концам праймеров, и в результате синтезируются две копии гена. Цикл повторяется снова и снова большое число раз, и количество ДНК гена увеличивается каждый раз вдвое. Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. Процесс ПЦР отражен на рисунке 1.

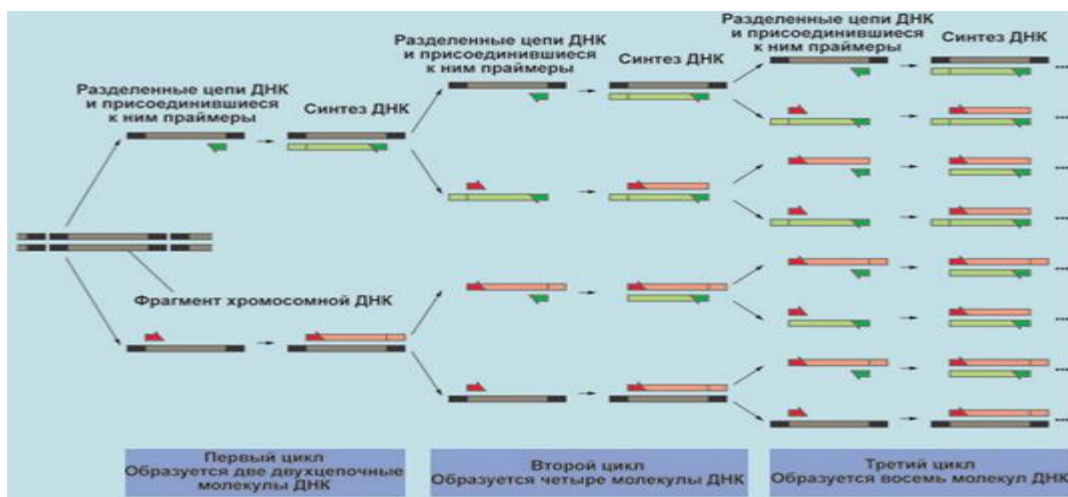


Рисунок 1 — Общая схема полимеразной цепной реакции

Следующий этап анализа — разделение полученных фрагментов ДНК методом электрофореза и получение электрофореграммы, выступающей в

качестве визуального отображения генетического спектра исследуемого фрагмента ДНК, что видно из рисунка 2.

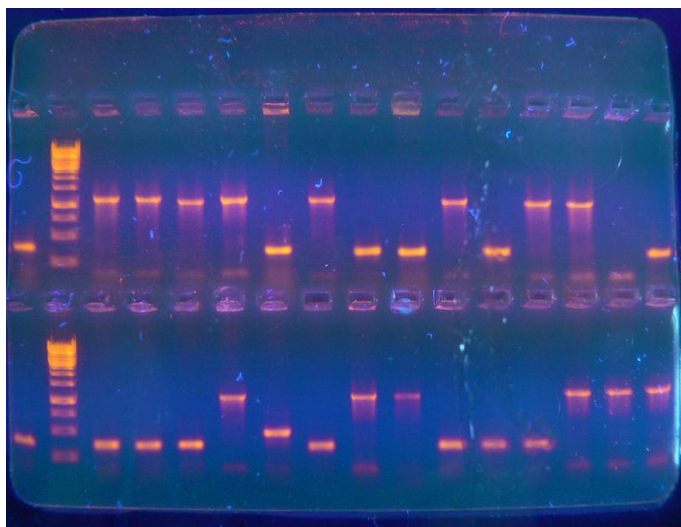


Рисунок 2 — Результат электрофоретического разделения продуктов
ПЦР

Развитие науки техники сделало ПЦР-анализ доступным для реализации в условиях несложной лаборатории и широкого практического применения (Глик, Пастернак, 2002).

1.5 Типы ДНК-маркеров

Описание метода ПЦР-анализа без рассмотрения типов ДНК-маркеров является весьма условным. Метод принципиально интересен тем, что позволяет не только получить «генетический» спектр, но и сравнить его с некоторым образцом или стандартом (Матвеева и др., 2011). Сравнение возможно благодаря использованию ДНК-маркеров – полиморфных признаков, определяемых методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК, для каждого гена или для иного участка хромосомы при сравнении различных генотипов, особей, пород, сортов, линий (Смарагдов, 2009).

В настоящее время разработано большое количество типов молекулярно-генетических маркеров, которые основаны на различных классах последовательностей геномной ДНК. Они позволяют выявлять генетическое разнообразие на молекулярном уровне организации ДНК, что является базисом, на котором основаны все дальнейшие теоретические и прикладные исследования. При отборе нужных генотипов в расщепляющихся популяциях, селекционер сталкивается обычно с различными проблемами, помочь решить которые может использование близкосцепленных с признаком молекулярных маркеров, полученных различными методами (Карлов, 2010).

Для практического применения в первую очередь важна эффективность использования молекулярно-генетических маркеров, как на уровне белков, так и ДНК, РНК, для решения многих задач генетики, селекции, сохранения биоразнообразия, изучения механизмов эволюции, картирования хромосом. Исследованию эффективности использования молекулярных маркеров было посвящено большое количество научных работ, опубликованных в последние годы. Результатом этих работ стало создание обширных баз данных ДНК-маркеров (Дубина, 2015; Карлов, 2010; Монахоз, 2009, Чесноков, 2016 и т.д.).

Если рассматривать наиболее изученные типы то, в целом, молекулярно-генетические маркеры можно подразделить на следующие группы: маркеры участков структурных генов, кодирующих аминокислотные последовательности белков (электрофоретические варианты белков), маркеры некодирующих участков структурных генов и маркеры различных последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам на данный момент изучено недостаточно, распределение коротких повторов по геному (RAPD – случайно амплифицируемая полиморфная ДНК; ISSR – инвертированные повторы; AFLP – полиморфизм в сайтах рестрикции) и микросателлитные локусы (тандемные повторы с длиной элементарной

единицы в 2-6 нуклеотидов).

Микросателлиты (SSR-маркеры) – это особый класс ДНК-маркеров, представляющих собой фрагменты ДНК, содержащие большое количество – до сотни и даже выше – tandemно (последовательно) повторяющихся идентичных «мотивов», обычно называемых «повторами»: короткими последовательностями из нескольких (как обычно принято считать – от одной до шести) пар нуклеотидов (Büscher et al., 1993; Гостимский и др., 2005). Микросателлиты высокополиморфны, с десятками аллелей в каждом локусе и высокими темпами мутирования. Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга длиной, в основном числом повторов. Небольшие размеры микросателлитных локусов позволяют применить метод полимеразной цепной реакции в целях генотипирования и обеспечить высокую воспроизводимость результатов в различных лабораториях. Для типирования микросателлитов требуется небольшое количество ДНК, которую можно экстрагировать даже из сильно деградированного биологического материала. Микросателлиты встречаются в большом количестве у всех эукариотических организмов и сейчас используются для изучения, как природных популяций, так и популяций сельскохозяйственных животных и растений (Гостимский, 1999). На рисунке 3 можно увидеть аллели микросателлитных локусов.

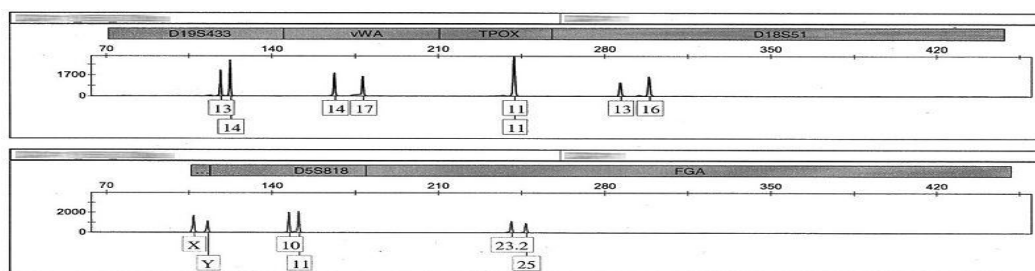


Рисунок 3 — Результат ДНК-анализа с использованием методики капиллярного электрофореза. На электрофореграмме — участок профиля коротких tandemных повторов (аллелей микросателлитных локусов)

Микросателлиты используются как молекулярные маркеры определения генетического разнообразия и родства организмов и популяций, а также для исследования процессов трансформации ДНК протекающих при эволюции и селекции (Geiser, 2004).

Микросателлиты стали удобными и предпочтительными маркерами и нашли самое широкое применение при оценке генетического разнообразия культурных растений (Дубина, 2019; Грушецкая и др., 2007; Фесенко и др., 2007). Научным сообществом широко используются электронные базы данных, в которых содержится актуальная информация о результатах исследования микросателлитных локусов (Butler, Reeder, 2010).

Высокая воспроизводимость маркеров и их большая дискриминационная способность позволяет использовать их для паспортизации сортов и линий сельскохозяйственных культур (Ashkenazi et al., 2001).

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 овощекartофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса» с 2018 по 2022 год. Материалом исследования послужили контрастные формы капусты белокочанной (устойчивая изогенная линия 269-Яс12п-2 и восприимчивая изогенная линия Пи714) к сосудистому бактериозу растения, отобранные в отделе овощекartофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса», растения поколения F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 и поколения F_2 , полученные в результате самоопыления растений F_1 , а также контрастные формы капусты белокочанной (устойчивая изогенная линия ДТ-46 и восприимчивая изогенная линия Кб1П) к фузариозу растения, отобранные в отделе овощекartофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса», растения поколения F_1 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П, поколения F_2 , полученные в результате самоопыления растений F_1 , поколения BC_1F_1 , полученные в результате скрещивания растений F_1 с рекуррентной устойчивой родительской формой ДТ-46.

2.1 Выделение ДНК из листьев растений капусты белокочанной

Для выделения ДНК при проведении молекулярно-генетических исследований были использованы зеленые листья растений капусты белокочанной, контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу, фузариозу, а также селекционных образцов, изогенных линий отдела овощекartофелеводства, используемых в программе по созданию резистентных форм к данным заболеваниям. Экстракцию ДНК проводили,

используя СТАВ-метод (Murray and Thompson, 1980) по следующей схеме: навески свежей растительной ткани (ткань листа) массой 2 г отбирали в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл и растирали. Затем в пластиковые микропробирки вносили 500 мкл прогретого до 60°C 2×СТАВ буфера, содержащего 2% СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4М хлористый натрий, 0,1М Трис-гидрохлорид, 20мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). Смесь инкубировали при 65°C в течение 1,5 часов, тщательно перемешивая каждые 30 минут. После к гомогенату вносили равный объем хлороформа и перемешивали в течение 20 минут. На следующем этапе образцы центрифугировали 10 минут при 5000 об/мин. К отобранному супернатанту, перенесённому в чистую микропробирку, добавляли 0,2 объема 5×СТАВ буфера, содержащего 5% СТАВ и 350мМ ЭДТА, и экстрагировали 10 минут при 60 °C. После супернатанту давали остыть до комнатной температуры и затем в пробирки с образцами вносили равный объем хлороформ-изоамилового спирта (24:1), медленно перемешивали в течение 20 минут и затем центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. После центрифугирования верхнюю фракцию переносили в чистые пробирки, добавляли равный объем буфера для преципитации (1% СТАВ, 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Центрифугировали при 5000 об/мин и образовавшийся осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1М NaCl, 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА), добавляли 1 мл изопропилового спирта и выдерживали 2-3 часа при -20 °C. При добавлении изопропилового спирта ДНК выпадала в осадок. По истечении этого времени образцы центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин, образовавшийся осадок промывали 70% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 100 мкл 0,1×TE буфера. При ограниченном количестве растительного материала использовали меньшие навески сырого материала, пропорционально уменьшая объемы реактивов для выделения и очистки ДНК.

Наличие выделенной ДНК в пробирке определяли методом электрофореза в двухпроцентном агарозном геле с добавлением 1 мкг/мл бромистого этидия и 10 нг ДНК (Маниатис и др., 1984). Результаты выделения ДНК из некоторых образцов растений капусты белокочанной представлены на рисунке 4.

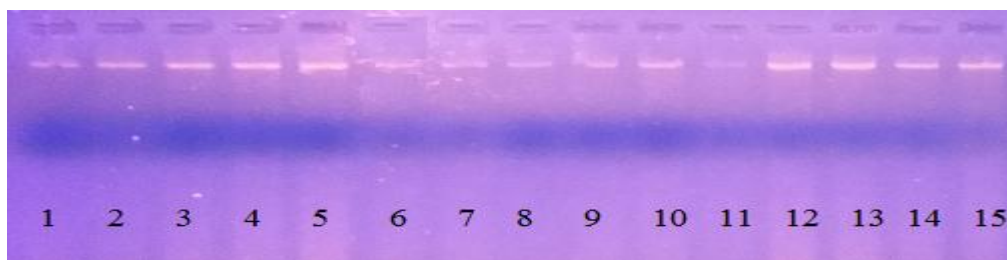


Рисунок 4 – ДНК образцов растений капусты белокочанной

Примечание - 1-15 – анализируемые на наличие ДНК образцы капусты белокочанной.

По наличию бендов, показанных на рисунке 4, можно сделать вывод о том, что ДНК присутствует во всех исследуемых образцах.

2.2 Подбор оптимальных условий для проведения ПЦР

Для идентификации генов устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу у капусты белокочанной использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию амплификации проводили в ДНК-амплификаторе «BioRad», производства Германия. При этом подбирали параметры ПЦР: реакционный состав ПЦР-смеси, температура отжига праймеров, количество циклов ПЦР.

Для проведения ПЦР использовали следующие компоненты реакционной смеси:

- ДНК-матрица;
- два праймера, комплементарные противоположным концам

требуемого фрагмента ДНК;

- термостабильная Taq-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК – *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза);
- смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- ионы магния, необходимые для работы полимеразы;
- 10x buffer, обеспечивающий необходимые условия реакции – pH, ионную силу раствора, содержит сульфаты, бычий сывороточный альбумин.
- нейтральные микросателлитные маркеры, взятые из базы данных VegMarks и из литературных источников.

Теоретическую температуру отжига для каждой праймерной пары рассчитали по формуле, учитывающей количество пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований, соответствующих ее сиквенсу, взятому из базы данных VegMarks и из литературных источников (Dieffenbach et al., 1995):

$$T = 4^{\circ}\text{C} \times (G + C) + 2^{\circ}\text{C} \times (A + T) - 3 \quad (1)$$

где G, C, A, T – количество гуаниновых, цитозиновых, адениновых и тиминовых оснований в нуклеотидной последовательности праймера, соответственно.

В дальнейшем корректировали (уменьшали или повышали) температуру отжига для каждой праймерной пары в зависимости от качества ПЦР-продукта, получаемого при рассчитанной температуре. Таким образом, экспериментально подбирали оптимальные условия ПЦР, обеспечивающие высокий выход амплифицированного продукта наряду с минимальным количеством синтезированных неспецифичных фрагментов ДНК.

Впоследствии нами были разработаны протоколы оптимального состава реакционной смеси и программы реакции амплификации, при которых продукты ПЦР четко визуализировались.

ПЦР проводили в конечном объеме реакционной смеси 25 мкл с 40-50 нг ДНК, состоящей из: 0,1 μM dNTPs, 25mM KCL, 60 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,1% Тритон X-100б 10 mM 2-меркаптоэтанола, 1,5 mM MgCl_2 , 1 единицы Taq-полимеразы и 0,3 μM прямого и обратного праймеров. В пробирки с реакционной смесью добавляли минеральное масло для предотвращения испарения жидкости.

После апробации рассчитанной температуры отжига проводили по необходимости её оптимизацию до достижения идеальных условий, при которых наблюдался высокий выход ампликонов.

В программе по созданию устойчивых к сосудистому бактериозу и фузариозу генотипов капусты белокочанной при апробации SSR-маркеров из базы данных VegMarks использовали протокол программы реакции амплификации, который содержит 45 циклов: первичную денатурацию проводили 15 минут при 95°C – 1 цикл; денатурацию при 94 °C продолжительностью 2 минуты – 1 цикл; следующие 25 циклов: 2 мин денатурация при 94 °C, 1 мин денатурация при 94 °C, 30 секунд отжиг праймеров при 65 °C, 45 секунд синтез при 72 °C; затем каждый второй цикл температуру отжига понижают на 1 °C до достижения температуры 55 °C и остальные 20 циклов: 1 мин денатурация при 94 °C, 30 секунд отжиг праймеров при 55 °C, 45 секунд синтез при 72 °C, завершающий цикл синтеза 1 минута при 72 °C.

При проведении апробации молекулярных маркеров на сцепленность с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу, взятых из литературных источников (Afrin et al., 2018, Tonu et al., 2013) использовали другой протокол программы, включающий: первичную денатурацию при 95 °C (5 мин) – 1 цикл, следующие 35 циклов: денатурация при 95 °C (30 сек), отжиг праймеров при определенной температуре в зависимости от пары праймеров (51 – 55 °C) – 30 сек, элонгация при 72 °C – 30 сек; финальная элонгация при 72 °C в течение 5 мин.

При проведении амплификации ДНК с праймерами, разработанными для оценки полиморфизма по признаку устойчивости к фузариозу (Lv et al., 2011; Lv et al., 2013, Lv et al., 2014a; Liu et al., 2017) опирались на следующую программу: первичную денатурацию при 94 °C (5 мин) – 1 цикл, следующие 36 циклов: денатурация при 94 °C (30 сек), отжиг праймеров при 55 °C – 30 сек, элонгация при 72 °C – 45 сек; финальная элонгация при 72 °C в течение 7 мин.

2.3 Проведение электрофореза

Визуализацию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в течение 80 минут при напряжении 130 V с использованием 0,5 ×Трис-боратного буфера. В лунки геля вносили по 10 мкл продуктов амплификации, предварительно смешав их с буфером нанесения (40% сахара, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% ксилен цианол), при этом соблюдали соотношение: продукты ПЦР/буфер нанесения = 5/1. Затем гелевую пластину фотографировали в ультрафиолетовом свете в приборе GelDocXR+, используя специальную программу, и проводили анализ полученных данных.

Также для разделения ампликонов применяли электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) на основе 1×Трис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М борной кислоты, 2мМ ЭДТА, pH=8,2) в камере для вертикального электрофореза (Helicon), так как такой гель имеет высокую разрешающую способность и позволяет различить фрагменты, отличающиеся на небольшое количество нуклеотидов (Поморцев и др., 2004). Полимеризацию геля проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве катализаторов полимеризации использовали 40 мкл ТЕМЕДа (100% раствор) и 350 мкл аммония персульфата 10%-ного на 40 мл раствора геля. После чего вносили в лунки геля по 15 мкл продуктов амплификации, предварительно смешав их с буфером нанесения.

Электрофорез проводили в течение 3 часов, после чего проводили визуализацию результатов в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве стандарта молекулярных длин фрагментов использовали маркеры молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb и 100 bp+1 Kb (СибЭнзим).

2.4 Молекулярные маркеры, используемые в исследовании

Применение в селекционных программах капусты белокочанной, специализированных ДНК-маркеров, ассоциированных с устойчивостью к сосудистому бактериозу и фузариозу, обеспечивает четкий контроль наследования целевого локуса в гибридном материале, что в итоге снижает временные и материальные затраты при моделировании и создании перспективной генетической плазмы. При выполнении ПЦР-анализа и маркерной селекции самым первым и одним из наиболее важных этапов является отбор информативных маркеров, полиморфных между контрастными по данным признакам сортами.

С этой целью проводился скрининг и отбор микросателлитных молекулярных маркеров (SSR), показывающих высокий уровень полиморфизма между контрастными сортообразцами на гены устойчивости к сосудистому бактериозу – *Xcc* и фузариозу – *Foc1*.

2.4.1 SSR-маркеры на устойчивость к сосудистому бактериозу

При проведении ДНК-анализа на устойчивость к сосудистому бактериозу применялись нейтральные кодоминантные микросателлитные (SSR) маркеры, взятые из базы данных на сайте www.VegMarks.ru (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), разработанные для оценки полиморфизма у растений *Brassica oleraceae* L. Их сиквенс представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность праймеров для *B. oleracea*

№	Название маркера	Дизайн последовательности праймеров
1	AF458409	F- AGAAAGCAGACGGGAATGG R- TGGTTAAAGCGAAAGTGTGC
2	BZ523957	F- ATTATGACGCCTGGTTTTA R- TTGGTTAGAAGTTATGGGAAC
3	CC969431	F- AAGCCACCTCACCTTAGCC R- GAAATCCCAGAGACTGAAAACC
4	CC969459	F- CCAAAGATTCAGAGGAAATGG R- GCGTCAAAAACGGTGTGC
5	Ol10-B04	F- ATCTTCCTCCACGTTTCATGC R- CGAATCTTGAAGTTCTGACCC
6	Ol10-B08	F- AAGCTGTTCGATGAAATGCC R- ACTTGTTTGCATCCATTGCC
7	Ol10-C01	F- ATGACTGCTTAAACAGCGCC R- CTTCTCCAACAAAAGCTCGG
8	Ol10-C10a	F- AAGAAGGCGTAGAGATTGCC R- GCAGATAAGATTCGAGTCCCC
9	Ol10-C10b	F- AAGAAGGCGTAGAGATTGCC R- GCAGATAAGATTCGAGTCCCC
10	Ol10-D01	F- TCTCTGCCAAAAGCAAATAGC R- CTTGGCTCTCTCTCACCACC
11	Ol10-D02	F-CATTTCTCAATGATGAATAGTTTTGG R- CCATTGATATGGAGATGGGG
12	Ol10-D08	F- TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R- GAGCTGTATGTCTCCCGTGC
13	Ol10-F06	F- CATTGGTTTAGTCATTTTCGTCG R- AATTCAAAAACGCGGAACG
14	Ol10-G05	F- TCAATGCTCTTGTAGTCTTTGACC R- AGAATGAGAGCGTGGAGAGG
15	Ol11-B05	F- TCGCGACGTTGTTTTGTTC R- ACCATCTTCCTCGACCCTG
16	Ol11-H06	F- TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R- TTCTTCACTTCACAGGCACG
17	Ol11-H09	F- CCCTTTTCCCCTTCTATTGG R- GTGCGACTTGGAATTTCTCC

Продолжение таблицы 1

№	Название маркера	Дизайн последовательности праймеров
18	Ol12-A04	F- TGGGTAAGTAACTGTGGTGGC R- AGAGTTCGCATACTCTGGAGC
19	Ol12-G04	F- CGAACATCTTAGGCCGAATC R- GGTTAACCTGCGGGATATTG
20	Ol13-C12	F- AGAGGCCAACAAAGAACACC R- GAAGCAGCACCCAGTGACAAG

N. Tonu вместе с коллегами использовал QTL, ответственные за контроль устойчивости растений капусты белокочанной к сосудистому бактериозу, вызываемому возбудителем (*Xcc*), относящимся к 1 расе. Главный локус устойчивости *XccBo(Reiho)2* расположен в 8 хромосоме, а два других минорных QTL (*XccBo(Reiho)1* и *XccBo(GC)1* – в 5 и 9 хромосоме, соответственно (Tonu et al., 2013). SSR- маркер BoGMS0971 сцеплен с главным локусом устойчивости *XccBo(Reiho)2*, pW114 и pW164 сцеплены с *XccBo(Reiho)1*, а pX117 pW143 – с локусом *XccBo(GC)1*. В таблице 2 представлены последовательности этих праймеров, которые мы также использовали в исследовании для проверки их сонаследования на отечественных образцах капусты белокочанной.

Таблица 2 – Нуклеотидная последовательность праймеров, сцепленных с QTL устойчивости к *Xcc* расы 1

№	Название маркера	Дизайн последовательности праймеров
1	BoGMS0971	F- TAATCCGAACAACACGAA R- CACCCAATAAGCGATGAG
2	pW114	F - TTCCCAATGTTGGAGGCGAGT R - TATATATCGCTCAAGCTCAATC
3	pW164	F - CAGCAGCACGATAACGAGGTGCA R - CGTGTGATCGTAACGAGCAATTGG
4	pX117	F - CGTCCCTTACCTTCCTCCG R - TCCTCCGTAGATAACGGTTCG

Продолжение таблицы 2

№	Название маркера	Дизайн последовательности праймеров
5	pW143	F - ATGAGCAGAGCACAAGATCCACCGA R - ACAACGGCTTCTCAGAGACCG

Также с SSR-маркерами в своих исследованиях по идентификации генов устойчивости капусты белокочанной к сосудистому бактериозу работал Afrin et al. (Afrin et al., 2018). Данные маркеры представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Нуклеотидная последовательность праймеров, сцепленных с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу

№	Название маркера	Дизайн последовательности праймеров
1	SSR Na14-G02	F –TTCCCTTTATTGAGCAAGCTG R -TCCCGGTCGCTAAGATATTG
2	BoESSR291	F - AAGCTGGGGATGGAGAAGAT R - GCACCTAATCGAACCCCTTA
3	BoESSR216	F - GGTTTCCGCTATGTCCAGAA R - CGGAAGAAGACGTTGAGGAG
4	BoESSR089	F - ATGATCAGCGAAACCACTCC R - TGATACATCCCGTTTGCTCA
5	BoESSR145	F - GGGCGAGGATGGTTACTACA R - TCATACCCCAAGGCTATTTT
6	BoESSR726	F - CAATGGGTTACGCATGGTTT R - CGTTTGTGAAACAGCCATTG
7	SSR739	F - TAGGGTGAAAGGGAAGCTCA R - CGCTAATAATGGCGCTAAGG
8	BnGMS301	F - AATATGCAGCATTCTAGACAAA R - ATCATTCTCGTGATGACACA
9	OI10G06	F - GACAAGTTCCCTTGTAATGGC R - TGTAATCATCACACATTTTGGG

Использованные праймеры синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (г. Москва).

2.4.2 Молекулярные маркеры на устойчивость к фузариозу

При проведении молекулярно-генетических исследований на устойчивость к фузариозу капусты белокочанной применялись нейтральные кодоминантные микросателлитные (SSR) маркеры, взятые из базы данных VegMarks на сайте <https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>, разработанные для оценки полиморфизма у растений *Brassica oleraceae* L., локализованные в разных группах сцепления. Некоторые из них расположены в 6 группе сцепления, где и был идентифицирован ген устойчивости к *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (*Foc1*). Последовательность данных праймеров представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Нуклеотидная последовательность праймеров для капусты белокочанной

№	Название маркера	Последовательности праймеров
1	AF458409	F- AGAAAGCAGACGGGAATGG R- TGGTTAAAGCGAAAGTGTGC
2	BZ523957	F- ATTATGACGCCTGGTTTTA R- TTGGTTAGAAGTTATGGGAAC
3	CC969431	F- AAGCCACCTCACCTTAGCC R- GAAATCCCAGAGACTGAAAACC
4	CC969459	F- CCAAAGATTCAGAGGAAATGG R- GCGTCAAAAACGGTGTGC
5	Ol10-B04	F- ATCTTCCTCCACGTTTCATGC R- CGAATCTTGAAGTTCTGACCC
6	Ol10-B08	F- AAGCTGTTTCGATGAAATGCC R- ACTTGTTTGCATCCATTGCC
7	Ol10-C01	F- ATGACTGCTTAAACAGCGCC R- CTTCTCCAACAAAAGCTCGG
8	Ol10-C10a	F- AAGAAGGCGTAGAGATTGCC R- GCAGATAAGATTCGAGTCCCC
9	Ol10-C10b	F- AAGAAGGCGTAGAGATTGCC R- GCAGATAAGATTCGAGTCCCC

Продолжение таблицы 4

№	Название маркера	Последовательности праймеров
10	Ol10-D01	F- TCTCTGCCAAAAGCAAATAGC R- CTTGGCTCTCTCTCACCACC
11	Ol10-D02	F-CATTTCTCAATGATGAATAGTTTTGG R- CCATTGATATGGAGATGGGG
12	Ol10-D08	F- TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R- GAGCTGTATGTCTCCCGTGC
13	Ol10-F06	F- CATTGGTTTAGTCATTTTCGTCG R- AATTCAAAAAGTCCGAACG
14	Ol10-G05	F- TCAATGCTCTTGTAAGTCTTTGACC R- AGAATGAGAGCGTGGAGAGG
15	Ol11-B05	F- TCGCGACGTTGTTTTGTTC R- ACCATCTTCCTCGACCCTG
16	Ol11-H06	F- TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R- TTCTTCACTTCACAGGCACG
17	Ol11-H09	F- CCCTTTTCCCCTTCTATTGG R- GTGCGACTTGGAATTTCTCC
18	Ol12-A04	F- TGGGTAAGTAACTGTGGTGGC R- AGAGTTCGCATACTCTGGAGC
19	Ol12-G04	F- CGAACATCTTAGGCCGAATC R- GGTTAACCTGCGGGATATTG
20	Ol13-C12	F- AGAGGCCAACAAGAACACC R- GAAGCAGCACCAGTGACAAG
21	Na12-G11	F – TCAACAAAATCTAACCAGTAAAGC R - TTCCTTGCCTTGAATCATCC
22	KBrB022L13F	F – AGATATCCGGATCCGTAAGTTTAA R - GTTTGTAATATCCCGATTTGCATCCT
23	BRMS-227	F – ACCATCTCGCTATTTATTTATGAAG R - GACGATTTGATAGAGGAAAGGAAT
24	KBrH101E14F	F – ATTCGAAATCAAATCAAACCGCTC R - GTTTCATCCAACCACGTTTTTCACAGA
25	BRMS-252	F – ACTGGACTTATGTCTGAACAAGGAC R - CTGGCCAACATCAACATATAAACTA
26	BRMS-201	F – GTAAATAACAGTTCTGCCTCTGCTC R - CTGCTGAATTAATTGCTGCTTCT
27	KBrH107C03R	F – ACAAGCTCTGTATTTTGGATTCCG R - GTTTCGCCGAATAGTCTTTCCTTTTTTCG

Продолжение таблицы 4

№	Название маркера	Последовательности праймеров
28	BRMS-235	F – GGATCACAATCGTGTCTAGTAATC R - AGCATATCCATCAAGAGCTGGT
29	KBrH071B03R	F – AGACCGGCACGTATATTACCTGAA R - GTTTCATCGAGATCCGAGAAACGAAC
30	KBrB027H17F	F – AGCAGATTCATCAAGATCCAAAAC R - GTTCTTCAAGGCAAGGAAGATCAG

Hong-hao Lv с коллегами в своих исследованиях применял 2 кодоминантных InDel маркера (A1 и M10), выявляющих высокий полиморфизм у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной (Lv et al., 2011; Lv et al., 2013; Lv et al., 2014a). А Liu использовал кодоминантный SSR-маркер Frg13, тесно сцепленный с геном устойчивости к фузариозу *Foc1* (0,1 cM) (Liu et al., 2017). Поэтому данные маркеры также апробировались в данном исследовании (таблица 5).

Таблица 5 – Маркеры для идентификации гена устойчивости к фузариозу *Foc1*

№	Название маркера	Последовательности праймеров
1	Frg13 (SSR)	F- ACCAGAGGCAGTTTTGGTTG R- TCTTGCAACCCATGTCAAAA
2	A1 (InDel)	F- TGACATAACCACTAGGAGCA R- GCAGAAGCTTTGATGAAGTT
3	M10 (InDel)	F- CACTTGCTCCAGTTTCTGTA R- AACTATGGATAAAAGGCGTG

Вышеперечисленные праймеры так же были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (г. Москва).

2.5 Методика проведения фитопатологического тестирования

Иммунологическая оценка селекционного материала капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу проводилась в отделе овощекartофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса» на стационарном инфекционном участке. Растения капусты белокочанной выращивались в кассетах до фазы 5-7 листьев. Затем проводилась инокуляция 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. Патоген выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение 48 часов при температуре 26-28 °С. Титр бактерий в водной суспензии составлял 10^5 в 1 мл, согласно оптическому стандарту мутности. Оценку 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):

0 – признаков поражения нет;

1 – усыхание отдельных мелких пятен на краях пластинок у листьев нижнего и других ярусов;

2 – отдельные, довольно крупные усыхания с краев пластинки листьев бурого или коричневого цвета, имеющие V-образную форму, окаймленную узким светло-зеленым ореолом отмирающих клеток. На отдельных листьях заболевание поражает целый сектор, вершина которого доходит до центральной жилки листа;

3 – свертывание усыхающего сектора и края пластинок большинства листьев с частичным или полным потемнением сосудов в черешке;

4 – большая часть листьев близка к отмиранию. Наблюдается опадание отдельных листьев. При удалении кочана хорошо заметны почерневшие

пучки проводящих сосудов.

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.

Реакция одних и тех же сортов и гибридов в разные годы неоднозначна, что указывает на взаимодействие генов, контролирующих признак устойчивости, с условиями среды (Ramires-Villapudua, 1989).

На образцах, относительно устойчивых к патогену, возможно поражение нижних листьев. Затем они опадают, а на формирующемся кочане появляются симптомы болезни, характерные для первого балла поражения. На толерантных образцах степень развития сосудистого бактериоза может достигать 45-50 и более процентов, но продуктивность кочанов при этом заметно не снижается (Королева и др., 2012).

Практический интерес для селекции капусты представляют образцы с возрастной устойчивостью к сосудистому бактериозу. В основном, это гибриды F_1 , на которых отмечается отрицательная динамика развития болезни, в то время как на восприимчивых образцах инфекция развивается по нарастающей, достигая максимальных значений в конце вегетации (Ситников, Дякунчак, 2009).

Для проведения оценки селекционного материала капусты белокочанной на устойчивость к фузариозу использовали изоляты местной популяции гриба *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, относящегося к расе 1. Патоген выращивали на картофельно-глюкозном агаре с добавлением стрептомицина (0,5 г на 1 л среды) для подавления бактериальной микрофлоры при температуре 24-26 °С в термостате в течение 14 суток. Затем приготавливали водную суспензию *F. oxysporum* с титром конидий 10^6 в 1 мл и опрыскивали ею стерильную почву, помещенную в растильни, которые потом накрывали стеклом и ставили на неделю в термостат при

температуре 24-26 °С. После инкубации в зараженную почву сеяли семена изучаемых образцов. Температура почвы при выращивании сеянцев составляла 26-28 °С. Оценку проявления болезни проводили через 21 после появления всходов по четырехбалльной шкале, предложенной «ВНИИ риса» (Королева и др., 2012):

- 0 – признаков поражения нет;
- 1 – поражены семядольные листья (пожелтение, увядание);
- 2 – поражены 1-2 листа (пожелтение, увядание);
- 3 – усыхание, гибель сеянцев.

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 – как устойчивые.

2.6. Статистический анализ расщепления

Для проведения оценки значимости различий в расщеплении в сегрегирующих популяциях между фактическим числом растений в выборке и теоретически ожидаемым использовали метод χ^2 (хи-квадрат). Для этого необходимо рассчитать значения χ^2 (отношение квадрата отклонения между фактическим и теоретическим числом растений к теоретически ожидаемому числу растений) для каждого класса расщепления в популяции, суммировать их и получить показатель χ^2 для популяции. Затем по таблице Фишера находят критический показатель χ^2 (крит.) с учетом уровня значимости для данного исследования и числом степеней свободы для количества классов расщепления. Если $\chi^2 < \chi^2$ (крит.), то различия между фактическими данными и теоретически ожидаемыми носят случайный характер и расщепление соответствует теоретически ожидаемому (Лобашев, 1969).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Селекция капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу

В мировой и отечественной практике производства капусты белокочанной большой ущерб наносят фитопатогенные грибы и бактерии. Среди бактерий наиболее опасен *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, вызывающий заболевание сосудистый бактериоз, а среди патогенов - *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Williams et al., 1980; Pu et al., 2012). Предотвратить их распространение возможно только методом создания устойчивых инбредных линий и гибридов (Орынбаев, 2017). Использование в данном направлении ДНК-маркеров позволит значительно сократить затраты труда и ускорить селекционный процесс, контролируя тем самым перенос генов устойчивости к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - Хсс и к *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* - Foc1 от одного организма другому (Дубина и др., 2015а; Makukha, 2021). Это повышает конкурентоспособность отечественных гибридов и сортов, а также помогает в решении проблемы импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны (Дубина, 2019; Makukha, 2020). В результате анализа литературных источников по данному вопросу 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 5 представлена схема получения селекционного

материала, на котором проводился подбор информативных ДНК-маркерных систем и изучение их сонаследования с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу, использованная в данной работе.

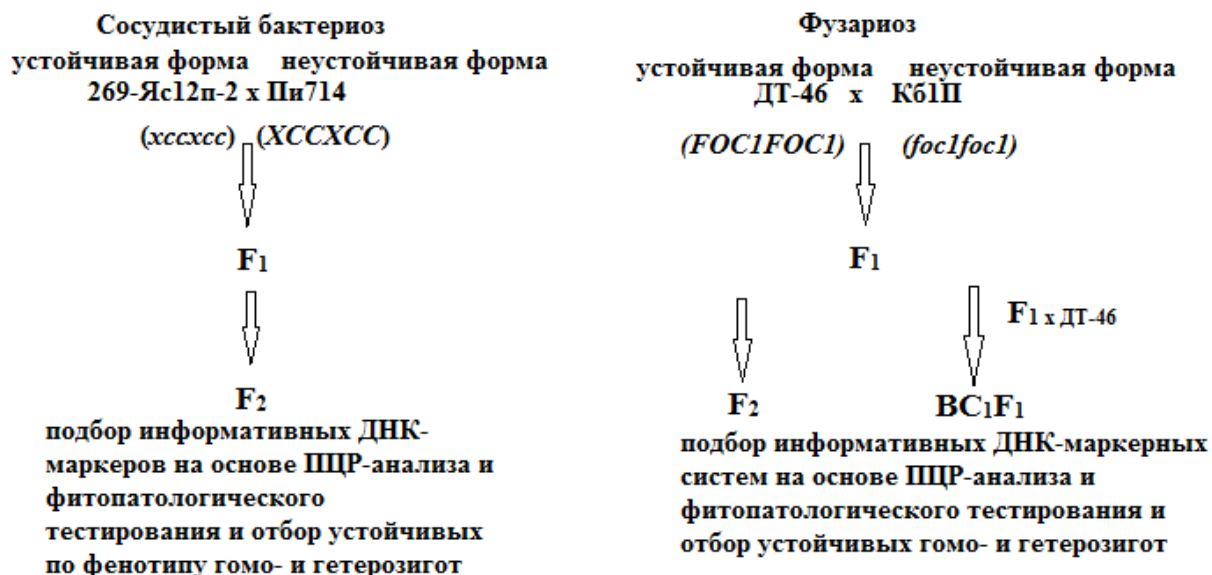


Рисунок 5 - Схема селекционного процесса капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу на основе MAS

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 F₁. 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 F₁ полученные растения сегрегирующей популяции F₂ 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_2 выполнялось их фитопатологическое тестирование. Кроме того, сопоставляя результаты двух экспериментальных опытов было изучено сонаследование 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 . В настоящий момент они высеяны на опытном участке для дальнейшего определения общей комбинационной способности (ОКС) путем скрещивания с линией-тестером. Далее линии, имеющие наибольший гетерозисный эффект от скрещивания с тестером, будут вовлекаться в систему диаллельного скрещивания для определения специфической комбинационной способности (СКС) линий и выявления комбинаций, которые будут обладать наилучшей продуктивностью (положительными морфометрическими характеристиками по признакам кочана (средняя масса кочана, индекс кочана, плотность кочана, процент внутренней кочерыги и сухого вещества)). В зависимости от полученных результатов можно будет определить точные показатели 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 F₁-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-генетического исследования было апробировано 20 нейтральных микросателлитных маркеров, взятых из базы данных VegMarks, локализованных в разных хромосомах, на контрастных по признаку устойчивости к сосудистому бактериозу формах капусты белокочанной (растениях устойчивой изогенной линии 269-Яс12п-2 и восприимчивой линии Пи714). Два из апробированных маркеров выявили полиморфизм (аллельную разницу) между исследуемыми образцами. Результаты апробации этих маркеров представлены на рисунках 6-7.

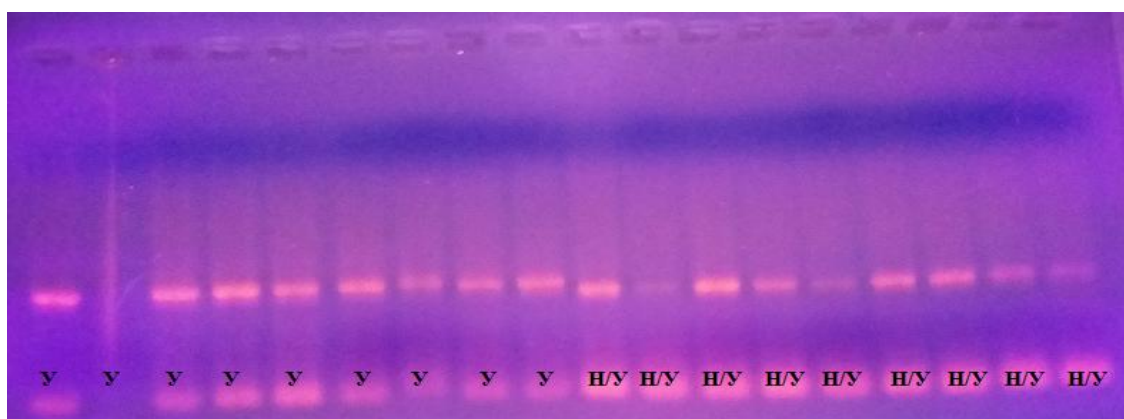


Рисунок 6 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-C01 в 2%-ном агарозном геле

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

Рисунок 6 демонстрирует аллельное разнообразие анализируемых контрастных по устойчивости к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* генотипов капусты белокочанной по локусу Ol10-C01 (4 хромосома локализации).

На электрофореграмме чётко видна аллельная разница между устойчивыми и неустойчивыми генотипами (изогенными линиями), что позволяет использовать данный маркер для ранжирования генотипов по устойчивости к заболеванию. Идентификация изученных линий выполнялась на основании данных об аллельном состоянии использованного маркера у каждого отдельно взятого генотипа с использованием программы Gel-Pro Analyzer 3.1.

На рисунке 7 представлены результаты ПЦР – анализа по локусу Ol11-H06 (9 хромосома локализации).

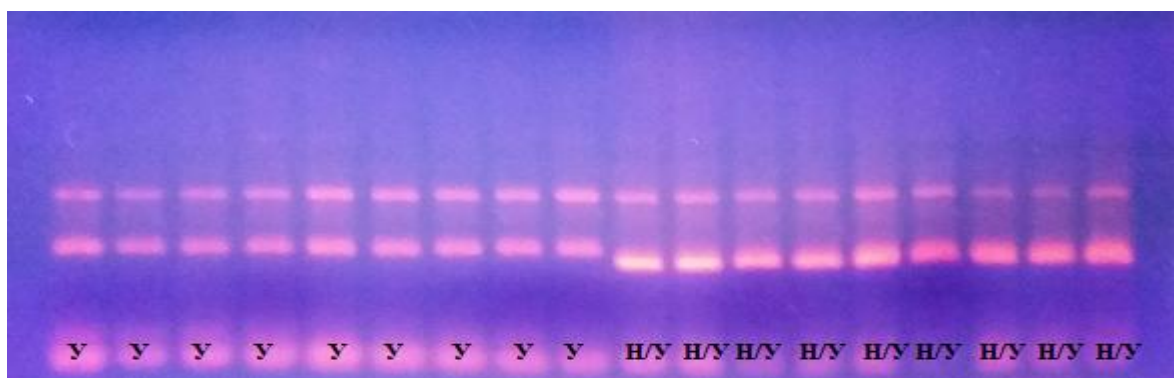


Рисунок 7 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol11-H06 в 2%-ном агарозном геле

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

Рисунок 7 также демонстрирует аллельную разницу между изучаемыми контрастными по устойчивости к сосудистому бактериозу изогенными линиями *Brassica oleracea* L.

При изучении оставшихся 18 маркеров аллельной разницы между контрастными формами обнаружено не было. Результаты анализа некоторых таких маркеров представлены на рисунках 8-12.

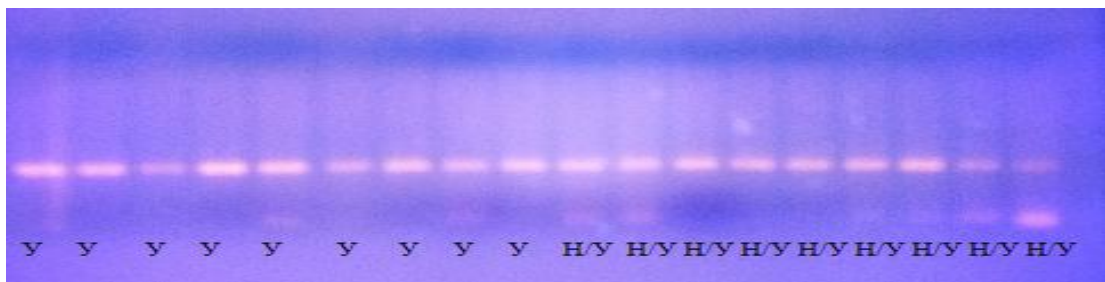


Рисунок 8 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-D08 в 2%-ном агарозном геле

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

Рисунок 8 демонстрирует отсутствие аллельной миграции в ДНК-профилях анализируемых контрастных растений по локусу Ol10-D08. Следовательно, данный маркер не может использоваться для ранжирования донорных и рецессивных аллелей гена Хсс.

Далее представлены результаты апробации микросателлитных маркерных систем, не показавших полиморфизм аллельной миграции донорных и рецессивных аллелей среди контрастных образцов капусты белокочанной (рис. 9-12).

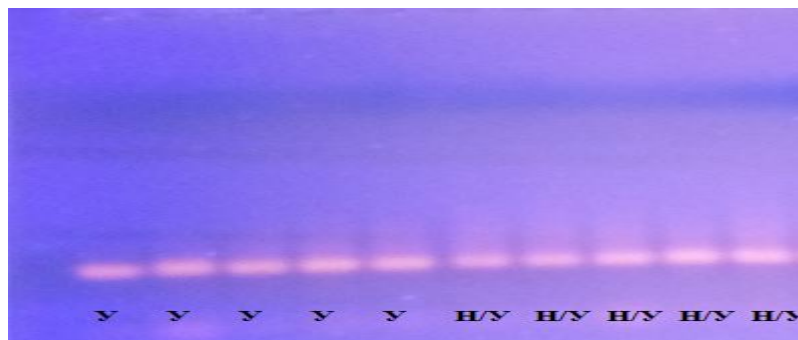


Рисунок 9 – Визуализация продуктов ПЦР по локусу O110-B04 в 2%-ном агарозном геле

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

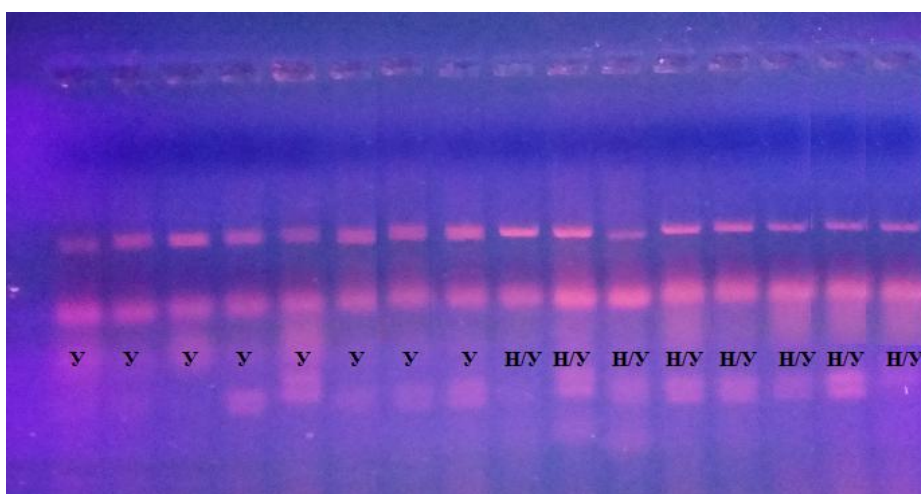


Рисунок 10 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу O110-G05 в 2%-ном агарозном геле

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

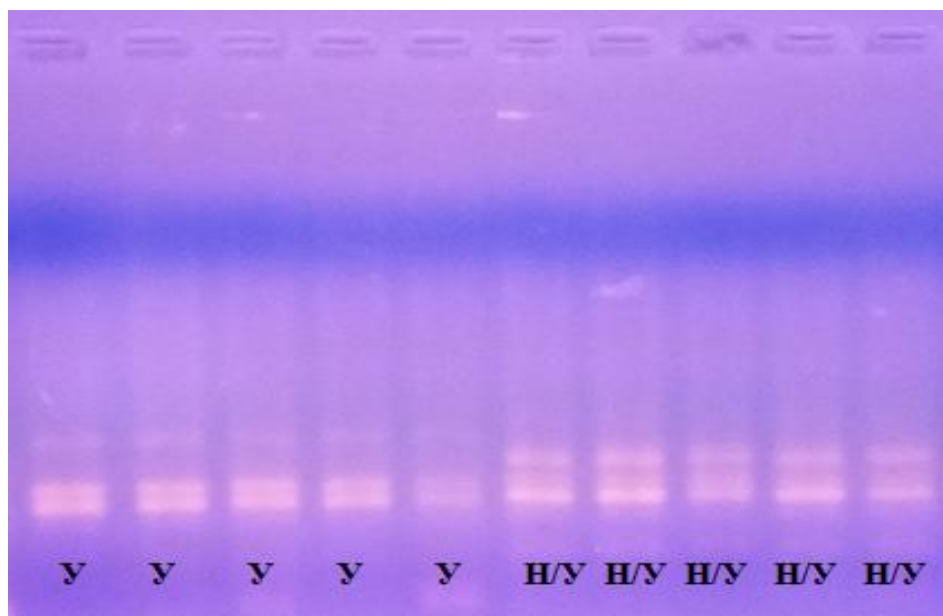


Рисунок 11 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-F06 в 2%-ном агарозном геле

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

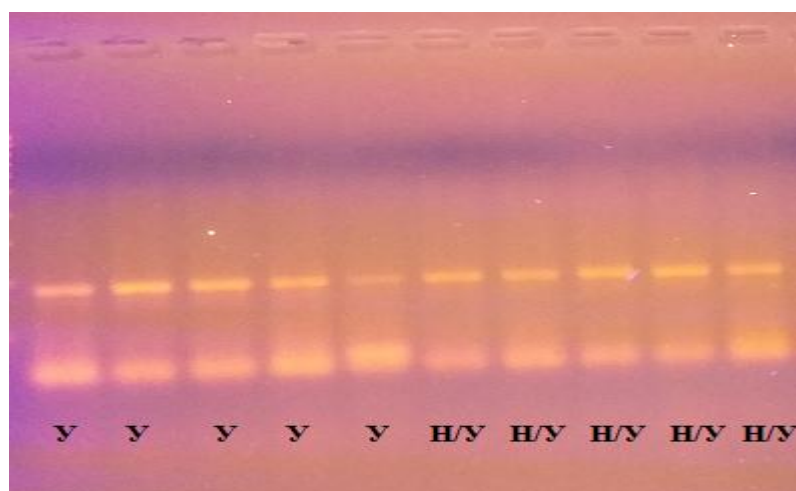


Рисунок 12 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol11-B05 в 2%-ном агарозном геле

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

Таким образом, из 20 апробированных кодоминантных микросателлитных маркеров, взятых из базы данных на сайте www.VegMarks, отобрано 2 информативных SSR: Ol10-C01 и Ol11-H06, локализованных на 4 и 9 хромосомах, соответственно, для ранжирования селекционных образцов по признаку устойчивости к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

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, Топу 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 13.

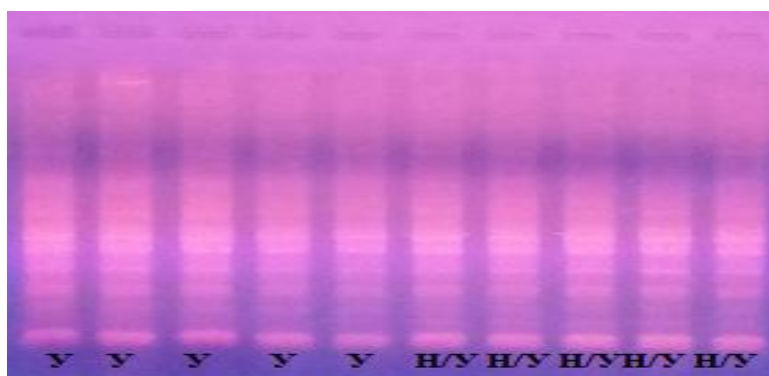


Рисунок 13 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу BoGMS0971 в 2%-ном агарозном геле

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

Как видно из рисунка 13, и устойчивые, и неустойчивые образцы капусты белокочанной имеют одинаковый ДНК-профиль, и полиморфизма между ними не обнаружено.

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 14).

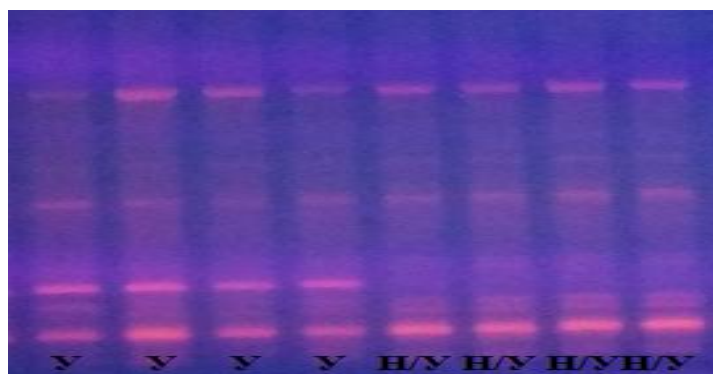


Рисунок 14 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу BoESSR726 в 2%-ном агарозном геле

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

На электрофореграмме рисунка 14 продемонстрирован полиморфизм у изучаемых контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу линий. Поэтому данный маркер был нами использован далее в селекционном процессе для проверки его сонаследования на сегрегирующей популяции F_2 -поколения.

В 2019 году была проведена гибридизация контрастных изогенных линий 269-Яс12п-2 и Пи714, и получено поколение F_1 . Далее SSR-маркеры, отобранные для дальнейшего ведения селекционного процесса, были апробированы на этих растениях F_1 с целью проверки их единообразия по генотипу согласно закону Менделя. Результаты молекулярно-генетического исследования данных образцов растений капусты белокочанной поколения F_1

гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 представлены на рисунках 15-17.

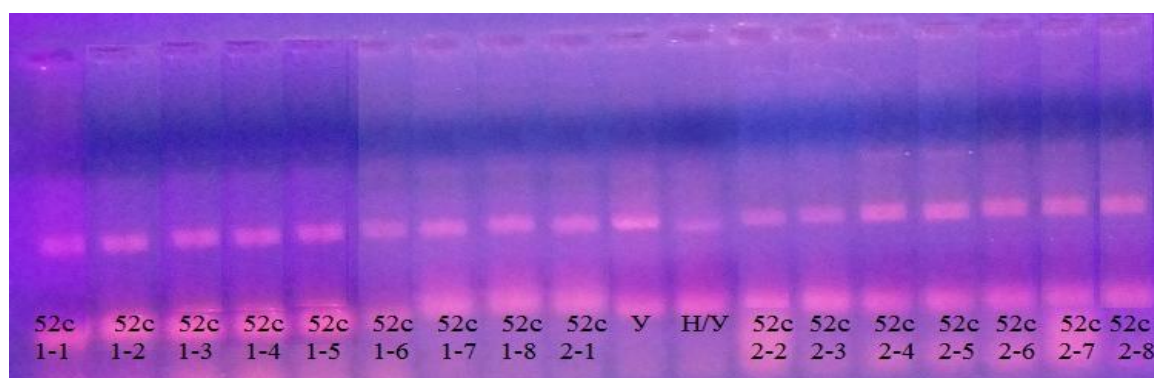


Рисунок 15 – Разделение продуктов амплификации растений гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание - 52с 1-1 – 52с 2-8 – образцы растений капусты белокочанной поколения F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из рисунка 15 видно, что анализируемые образцы капусты белокочанной имеют и аллель устойчивости и аллель восприимчивости, т.е. являются гетерозиготами по данному признаку, что соответствует закону Менделя о единообразии гибридов первого поколения.

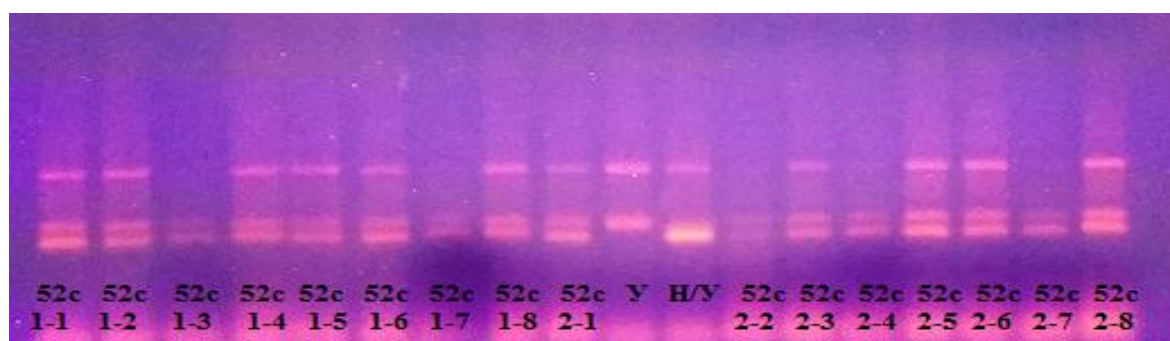


Рисунок 16 – Разделение продуктов амплификации растений гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol11-H06

Примечание - 52с 1-1 – 52с 2-8 – образцы растений капусты белокочанной поколения F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из рисунка 16 видно, что анализируемые образцы капусты белокочанной имеют аллели устойчивости и восприимчивости, т.е. являются гетерозиготами по данному признаку, что также соответствует закону Менделя о единообразии гибридов первого поколения.

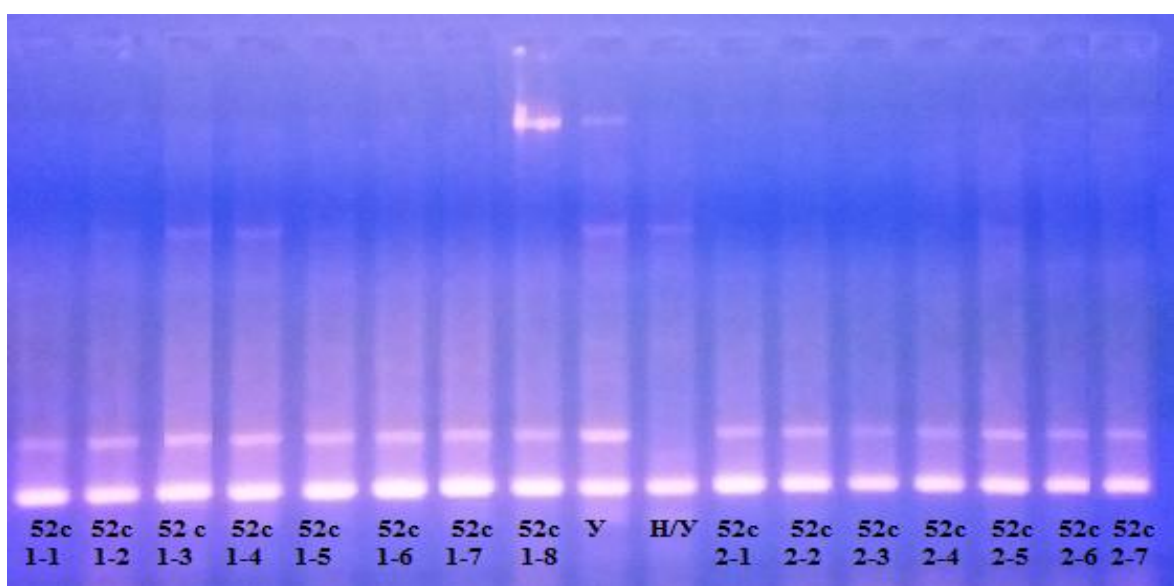


Рисунок 17 – Разделение продуктов амплификации растений гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу BoESSR726

Примечание - 52с 1-1 – 52с 2-8 – образцы растений капусты белокочанной поколения F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из электрофореграммы рисунка 17 видно, что все исследуемые образцы так же имели и аллель устойчивости, и аллель восприимчивости, т.е. были единообразны согласно первому закону Менделя.

В 2020 году было проведено самоопыление растений F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х 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 18-20.

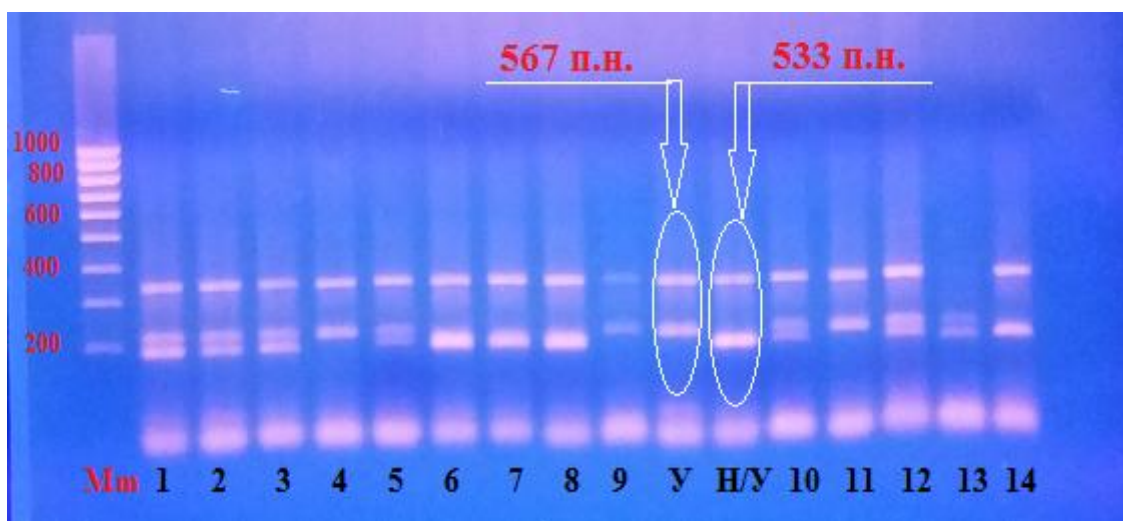


Рисунок 18 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol11-H06

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

На рисунке 18 показано аллельное разнообразие между изучаемыми растениями поколения F_2 . Здесь наблюдается расщепление растений по генотипу, т.е. растения под номерами 4, 9, 11 являются гомозиготами по рецессивной аллели (доноры устойчивости, т.к. признак имеет рецессивный характер наследования), растения: №№6, 7, 8, 14 – гомозиготы по доминантной аллели (неустойчивые образцы), которые были выбракованы, а растения: №№1, 2, 3, 5, 10, 12, 13 – гетерозиготны. Было установлено, что донорный аллель устойчивости имеет ПЦР - продукт размером 567 п.н., аллель восприимчивости – 533 п.н.

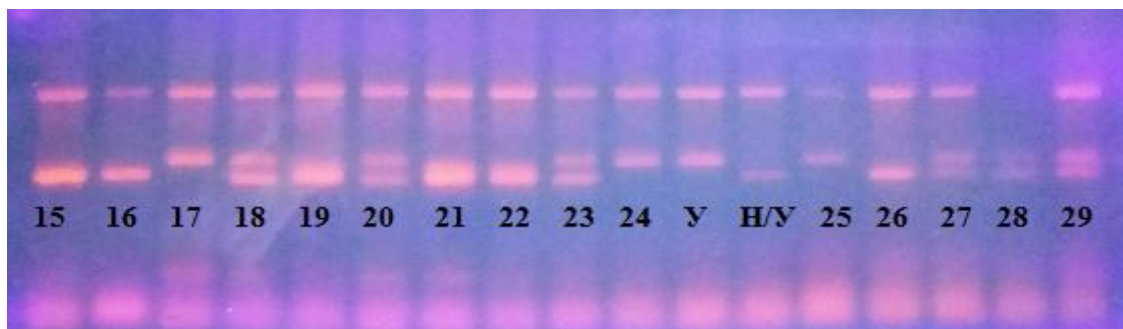


Рисунок 19 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol11-H06

Примечание – 15-29 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из представленной электрофореграммы рисунка 19 видно, что растения 17, 24, 25 являются гомозиготами по рецессивной аллели и были отобраны для дальнейшей работы, растения под номерами 15, 16, 19, 21, 22, 26 – гомозиготны по доминантной аллели и выбракованы, а растения №№18, 20, 23, 27-29 – гетерозиготны по изучаемому локусу и отобраны для получения F_3 -популяции.

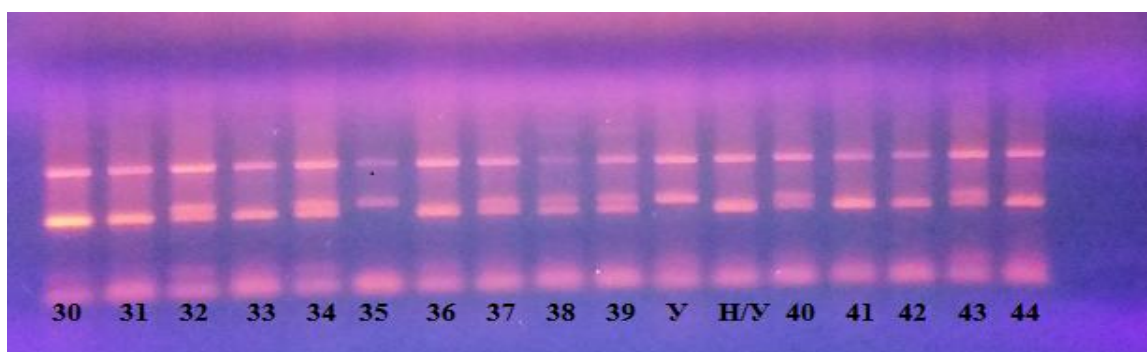


Рисунок 20 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol11-H06

Примечание – 30-44 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

На данной электрофореграмме (рисунок 20) видно, что растение под номером 35 является гомозиготой по рецессивной аллели, растения №№32, 34, 37, 38, 39, 40, 43 – гетерозиготны, с них собраны семена для получения последующих поколений, а растения №№30, 31, 33, 36, 41, 42, 44 – гомозиготны по доминантной аллели и были выбракованы из последующей работы.

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа 44 растений по локусу Ol11-H06 установлено, что 17 растений имеют в генотипе только доминантный аллель (гомозиготны по доминанте), 19 растений имеют обе аллели (гетерозиготны), а 7 растений имеют только рецессивный аллель устойчивости (гомозиготны). Однако, несмотря на то, что данный маркер выявляет все типы аллельного состояния генов растений поколения F_2 (гомо- и гетерозиготы), как это и должно быть согласно второму закону Менделя, при сравнении результатов ПЦР-анализа данных 44 растений с результатами фитопатологического тестирования (раздел 3.3) было обнаружено значительное расхождение результатов, т.е. в большинстве случаев не было совпадений по генотипу и фенотипу. Поэтому данный маркер более не применялся при изучении остальных растений F_2 .

Далее растения сегрегирующей популяции были изучены с помощью SSR-маркера BoESSR726 для проверки его сонаследования с признаком устойчивости к *X. campestris*. Результаты исследования по данному маркеру представлены на рисунках 21, 22.

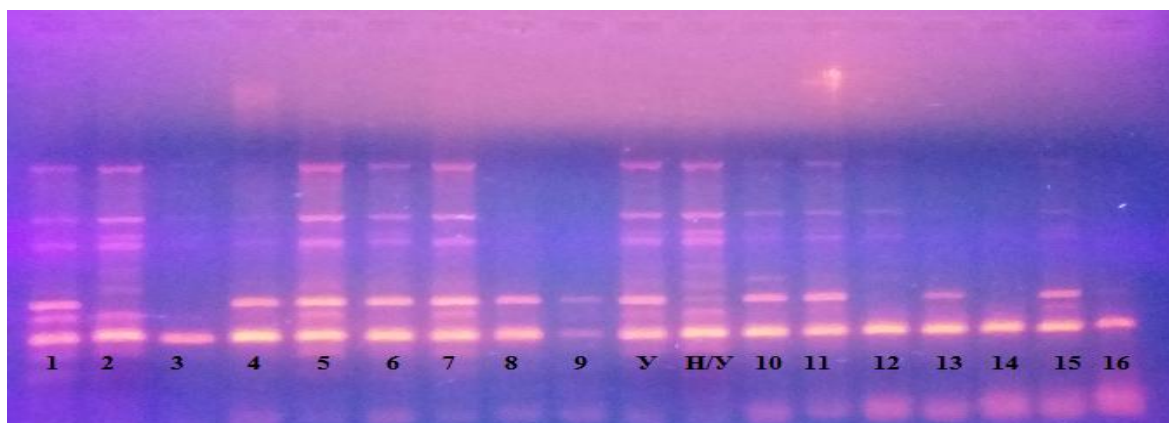


Рисунок 21 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу BoESSR726

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

Как видно из рисунка 21 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.

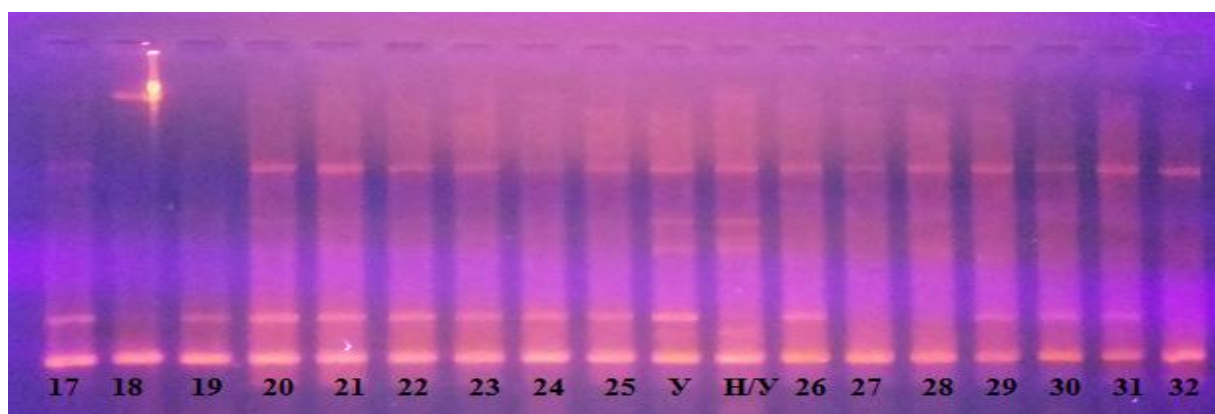


Рисунок 22 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу BoESSR726

Примечание – 17-32 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из представленной электрофореграммы рисунка 22 видно, что среди проанализированных растений есть растения с ДНК-профилем, соответствующим устойчивой линии №№20, 21, 28) и растения с ДНК-профилем как у контроля восприимчивости (№№ 18, 27, 32), которые в дальнейшей работе не использовались. Однако среди данных растений невозможно различить гетерозиготы, так как разница аллелей у исследуемых образцов заключается в наличии (у устойчивого образца) и отсутствии (у неустойчивого образца) полиморфного аллеля, что свидетельствует о том, что данный маркер носит доминантный характер наследования. Такой маркер не является предпочтительным в селекции, так как он не дает возможность выявлять гетерозиготные растения (Дубина, 2019, Чесноков, 2016). К тому же при согласовании результатов фитопатологического тестирования (раздел 3.3) с данными ПЦР-анализа было выявлено несоответствие результатов по генотипу и фенотипу. Учитывая все вышесказанное, было принято решение не использовать данный маркер в дальнейшем селекционном процессе.

На следующем этапе молекулярно-генетического исследования на растениях поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 также был апробирован микросателлитный маркер Ol10-C01, который, по результатам ДНК-анализа контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу растений капусты белокочанной и гибридов F_1 комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714, проведенного в 2019 году, показал полиморфизм у изучаемых образцов и, как и маркеры Ol11-H06, BoESSR726 выявил единообразие гибридов первого поколения. Аллельное разнообразие растений F_2 по локусу Ol10-C01 представлено на рисунках 23-29.

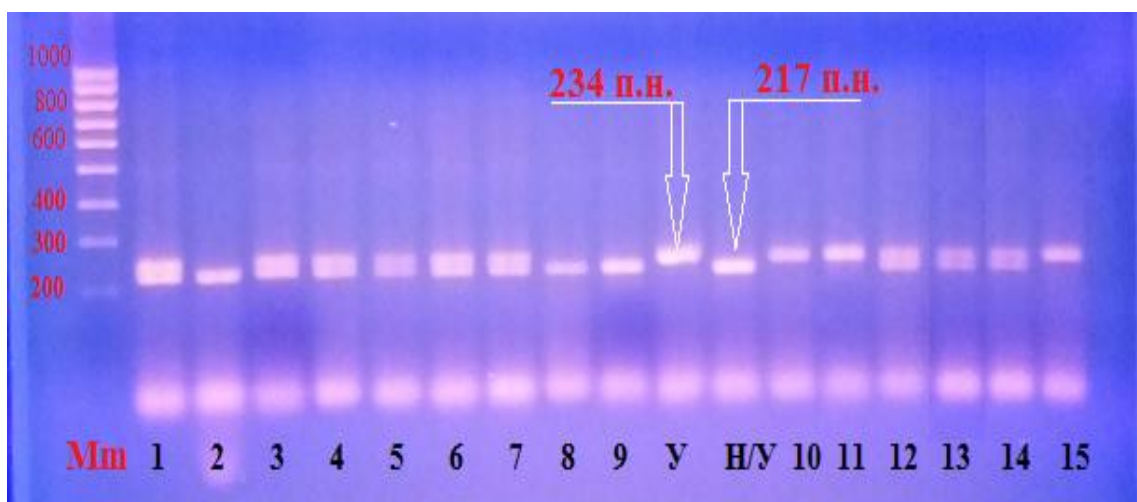


Рисунок 23 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – Mm – маркер молекулярной массы; 1-15 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; Y- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; H/Y- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Исходя из электрофореграммы на рисунке 23, можно заметить, что уже среди первых проанализированных 15 растений поколения F_2 наблюдается расщепление, и по данному локусу, как и по локусу Ol11-H06 выявляются все виды генотипов, т.е. растения №№10, 11, 15 являются гомозиготами по рецессивной аллели (несут аллель устойчивости), растения №№2, 8, 9 гомозиготны по доминантной аллели восприимчивости, растения №№1, 3-7, 12, 13, 14 - гетерозиготны. Также был определен размер аллелей: доминантный аллель восприимчивости имеет ПЦР-продукт величиной 217 п.н., а донорный аллель устойчивости – 234 п.н.

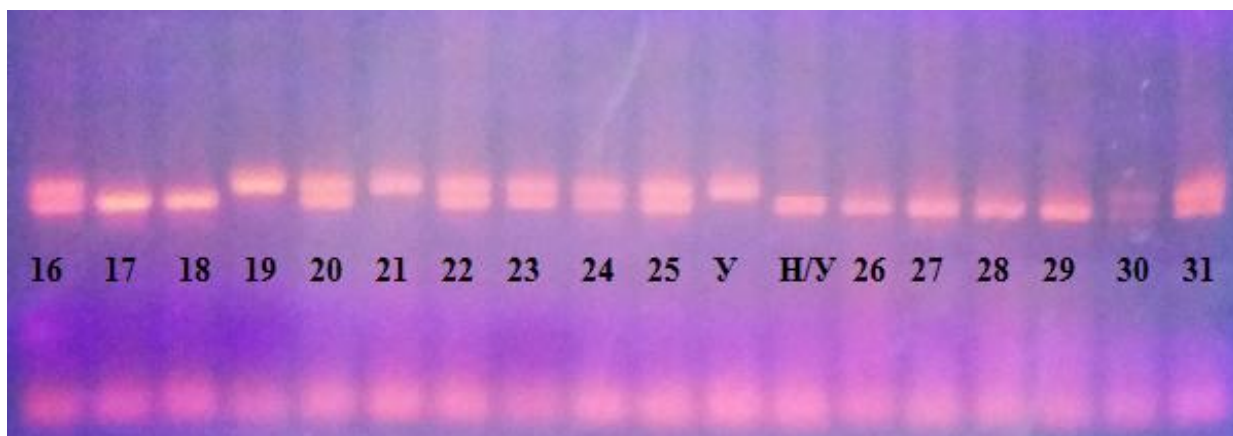


Рисунок 24 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – 16-31 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из рисунка 24 так же видно, что у анализируемых образцов капусты имеется расщепление по генотипу, т.е. растения №№19, 21 являются гомозиготами по рецессиву, растения №№17, 18, 26-29 гомозиготны по доминанте, а растения №№16, 20, 22, 23-25, 30, 31 являются гетерозиготами.

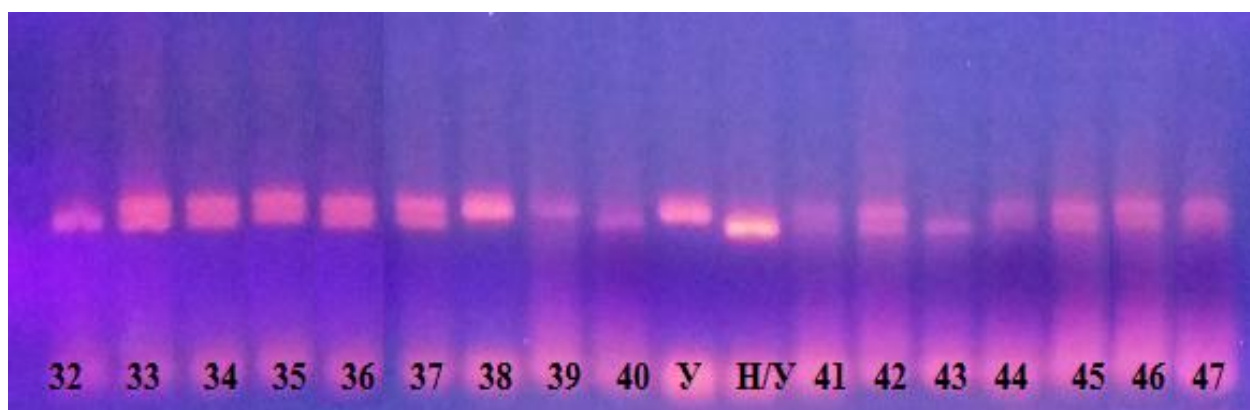


Рисунок 25 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – 32-47 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

На рисунке 25 так же, как и на остальных электрофореграммах имеется аллельное разнообразие по изучаемому локусу. Растения №№38, 39 несут донорный аллель устойчивости, растения №№32, 40, 43 имеют только аллель восприимчивости, а растения №№33-37, 41, 42, 44-47 гетерозиготны по данному локусу.

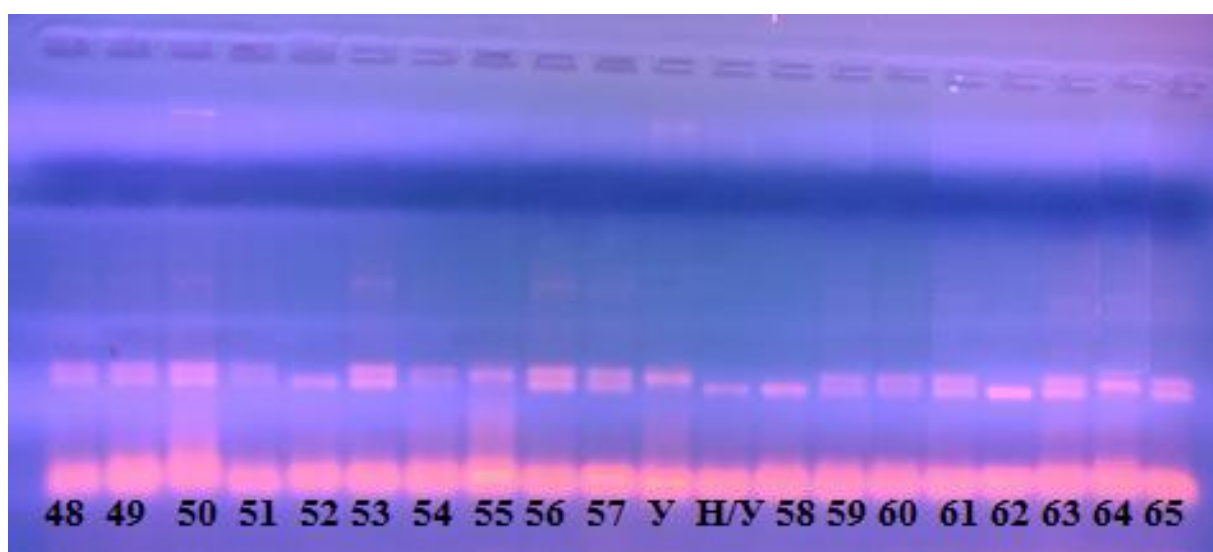


Рисунок 26 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – 48-65 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из данной электрофореграммы (рисунок 26) видно, что растения №№52, 58, 62 являются гомозиготами по доминантному аллелю (восприимчивы), растения №№55 и 64 являются гомозиготами по рецессивному аллелю (устойчивы), растения №№48-51, 53, 54, 56, 57, 59-61, 63 и 65 являются гетерозиготами по изучаемому локусу.

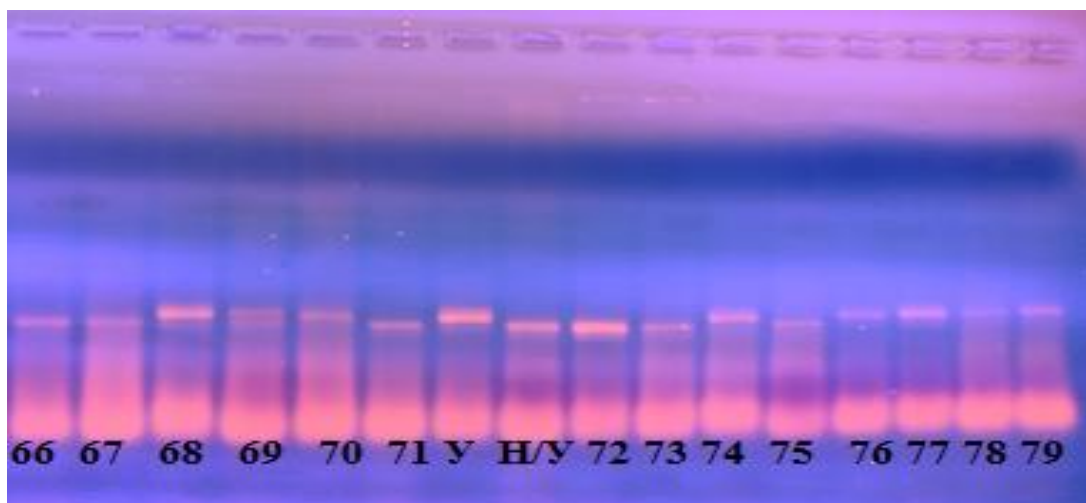


Рисунок 27 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – 66-79 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

На данной электрофореграмме (рисунок 27) можно увидеть, что образцы №№66, 67, 71, 72, 73, 75 гомозиготны по доминантной аллели, растения №№68, 70, 74, 76-79 гомозиготны по рецессивной аллели, а образец №69 является гетерозиготой.

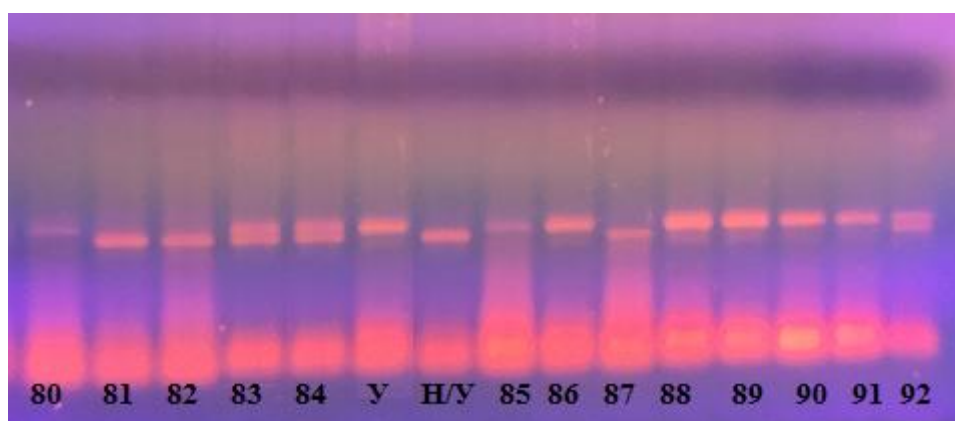


Рисунок 28– Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – 80-92 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

На рисунке 28 так же представлено аллельное разнообразие растений F_2 по изучаемому локусу. Здесь растения №№80, 85, 86, 88-91 несут в генотипе только донорный аллель устойчивости, растения №№81, 82, 87 имеют в генотипе только аллель восприимчивости, растения №№83, 84, 92 - гетерозиготны.

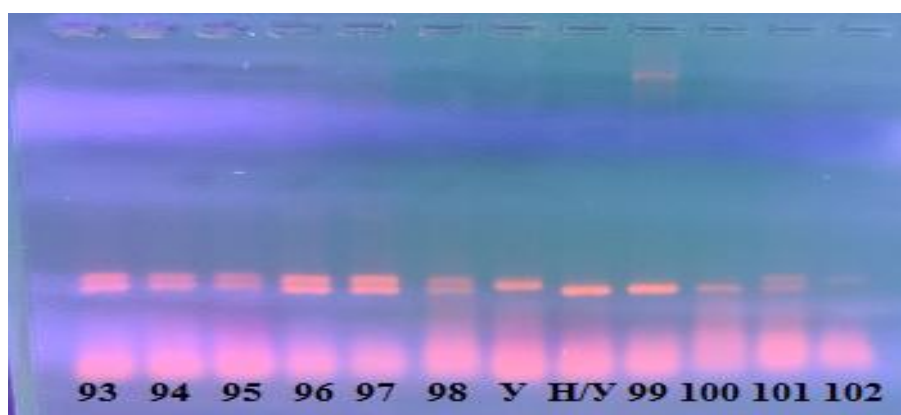


Рисунок 29 – Разделение продуктов амплификации растений поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01

Примечание – 80-92 – растения поколения F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714; У- изогенная устойчивая линия 269-Яс12п-2; Н/У- неустойчивая изогенная линия Пи714.

Из электрофореграммы рисунка 29 видно, что растения №№99, 100 являются гомозиготами по доминантному аллелю, растение №102 гомозиготно по рецессивной аллели, а растения №№93-98 и 101 являются гетерозиготами.

Таким образом, в результате проведения молекулярно-генетических исследований всех 102 растений поколения F_2 по локусу Ol10-C01 установлено, что 26 из них имеют в генотипе только аллель восприимчивости

(гомозиготны по доминантному аллелю), 52 растения являются гетерозиготами по данному локусу, 24 растения имеют в генотипе только донорный аллель устойчивости (гомозиготны по рецессивному аллелю). И окончательное соотношение по генотипу по локусу Ol10-C01 следующее: 26:52:24, что соответствует менделевскому расщеплению у гибридов поколения F_2 1:2:1.

Также одновременно с ДНК-анализом проводилось фитопатологическое тестирование растений F_2 на устойчивость к сосудистому бактериозу. Так как во время работы прослеживалась положительная корреляция результатов ДНК-анализа по локусу Ol10-C01 и фитопатологического тестирования (раздел 3.3), имело смысл провести анализ по данному локусу всей выборки растений сегрегирующей популяции для установления окончательного соотношения по генотипу и проверки сонаследования маркера Ol10-C01 по признаку устойчивости к сосудистому бактериозу.

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

В сентябре 2019 года в отделе овощекartофелеводства ФГБНУ «ВНИИ риса» было проведено фитопатологическое тестирование селекционного материала капусты белокочанной: растений поколения F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 (52с) и изогенных линий 269-Яс12п-2 (53с) и Пи714 по методике, разработанной ФГБНУ «ВНИИ риса» в 2012 году, с поправкой в 2018 году (Королева, 2012). При проведении фитопатологического теста анализируемых образцов проводилось опрыскивание растений бактериальной суспензией первой расы *X. campestris*, и на 14 сутки проводилась оценка на наличие признаков поражения

сосудистым бактериозом по шкале Студенцова (Студенцов, Петровская, 1981) и подсчет количества устойчивых биотипов по каждому анализируемому образцу растений капусты белокочанной, что отражено на рисунке 30. 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.

По результатам фитопатологического тестирования отцовская форма Пи714 имела 100 %-ное поражение болезнью, что подтверждается и данными ДНК-анализа (наличие специфичного ПЦР-продукта на фореграмме). На материнской форме - 269-Яс12п-2, признаков поражения болезнью выявлено не было (100 %-ная устойчивость). Гибридные растения, полученные от этой комбинации имели соотношение по фенотипу 2 : 1, т.е. 66 % (16 растений) – не устойчивы, а 34 % (8 растений) были устойчивы к *X. campestris*.



Рисунок 30 – Фитопатологический тест изогенной линии 269-Яс12п-2 (а) и растений F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 (б)

Резистентность к сосудистому бактериозу может проявляться в мезофилле (листовая устойчивость) (Самохвалов и др., 1995), окружающем

гидатоды и сосудах ксилемы (стеблевая устойчивость) (Ситников, Дякунчак, 2009), которая контролируется разными генами и носит полигенный характер наследования (Беренсен и др., 2019). И полученное такое соотношение в F_1 , может быть объяснено тем, что взятая нами для гибридизации в качестве устойчивого донора изогенная линия 269-Яс12п-2 обладает стеблевой и листовой устойчивостью, а отцовская форма Пи714 восприимчива и к той, и к другой формам и, возможно, в первом поколении сочетание двух видов устойчивости и дает такое количество резистентных растений.

В тепличные условия были высажены только устойчивые генотипы для дальнейшего изучения, что отражено на рисунке 31.



Рисунок 31 - Растения поколения F_1 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714 (52с)

Далее в 2021 году для проверки информативности отобранных в молекулярно-генетических исследованиях маркеров проводилось фитопатологическое тестирование растений F_2 гибридной комбинации 269-Яс12п-2 x Пи714, полученных в результате принудительного самоопыления растений F_1 . Инокуляцию растений проводили так же путем опрыскивания растений бактериальной суспензией. Для проведения заражения

использовали изоляты *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson местной популяции патогена, относящиеся к самой распространенной в Краснодарском крае расе 1. Оценку поражаемости образцов проводили в динамике роста и развития растений так же по шкале Студенцова. По результатам фитопатологического тестирования было установлено, что симптомы поражения сосудистым бактериозом у растений первого и второго поколения гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х 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 32, 33.



Рисунок 32 – Симптомы проявления сосудистого бактериоза, соответствующие 1 баллу поражаемости

На рисунке 32 мы видим усыхание отдельных мелких пятен на краях пластинок у листьев (1 балл поражаемости).



Рисунок 33 – Симптомы проявления сосудистого бактериоза, соответствующие 2 баллам поражаемости

На представленном рисунке 33 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).

По результатам фитопатологического тестирования F_1 и F_2 - поколений растений 269-Яс12п-2 х Пи714 было обнаружено, что окончательное соотношение по фенотипу было одинаковым в обоих случаях (2:1): для первого поколения – 16 (неустойчивые): 8 (устойчивые), для второго поколения – 65 (неустойчивые): 37 (устойчивые), что не соответствует менделевским законам. Это объясняется тем, что устойчивость к сосудистому бактериозу носит полигенный характер, и поэтому в гибридной популяции среди гетерозигот всегда будут и устойчивые, и восприимчивые образцы.

Таким образом, для ускорения селекционного процесса и облегчения определения устойчивых и восприимчивых форм капусты белокочанной к сосудистому бактериозу проведена работа по поиску информативных

молекулярных маркеров, которые точно различают целевые гены и их аллельное состояние в гибридном селекционном материале. На этапе молекулярно-генетических исследований выявлено 3 микросателлитных маркера (Ol10-C01, Ol11-H06, BoESSR726), которые показывают высокий уровень полиморфизма на контрастных по устойчивости изогенных линиях капусты белокочанной. Однако при сравнении результатов ПЦР-анализа растений F₂ с результатами фитопатологического тестирования по каждому растению было обнаружено, что только результаты апробации маркера Ol10-C01 имели положительную корреляцию с результатами фитопатологического тестирования. Сравнительный анализ результатов ДНК-анализа растений F₂ по локусу Ol10-C01 с результатами фитопатологического тестирования представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Сравнительный анализ результатов ДНК-анализа растений F₂ по локусу Ol10-C01 и фитопатологического тестирования

Номер образца	Результаты	
	ДНК-анализ	Фитопатологический тест
1	±	+
2	—	—
3	±	+
4	±	—
5	±	—
6	±	—
7	±	—
8	—	—
9	—	—
10	+	+
11	+	+

Продолжение таблицы 6

Номер образца	Результаты	
	ДНК-анализ	Фитопатологический тест
12	±	—
13	±	+
14	±	+
15	+	+
16	±	—
17	—	—
18	—	—
19	—	—
20	±	—
21	+	+
22	±	—
23	±	+
24	±	+
25	±	—
26	—	—
27	—	—
28	—	—
29	—	—
30	±	—
31	±	+
32	—	—
33	±	—
34	±	—
35	±	+

Продолжение таблицы 6

Номер образца	Результаты	
	ДНК-анализ	Фитопатологический тест
36	±	—
37	±	—
38	+	+
39	+	+
40	—	—
41	±	—
42	±	—
43	—	—
44	±	—
45	±	—
46	±	—
47	±	—
48	±	+
49	±	+
50	±	—
51	±	—
52	—	—
53	±	—
54	±	—
55	+	+
56	±	—
57	±	+
58	—	—
59	±	—

Продолжение таблицы 6

Номер образца	Результаты	
	ДНК-анализ	Фитопатологический тест
60	±	+
61	±	+
62	—	—
63	±	—
64	+	+
65	±	—
66	—	—
67	—	—
68	+	+
69	±	—
70	+	+
71	—	—
72	—	—
73	—	—
74	+	+
75	—	—
76	+	+
77	+	+
78	+	+
79	+	+
80	+	+
81	—	—
82	—	—
83	±	+

Продолжение таблицы 6

Номер образца	Результаты	
	ДНК-анализ	Фитопатологический тест
84	±	+
85	+	+
86	+	+
87	±	—
88	+	+
89	+	+
90	+	+
91	+	+
92	±	—
93	±	—
94	±	—
95	±	—
96	±	—
97	±	—
98	±	—
99	—	—
100	—	—
101	±	—
102	+	+

Примечание – по фитопатологическому тесту: «+» - устойчивый образец, «—» - неустойчивый образец; по результатам ДНК-анализа: «+» - наличие в генотипе донорного аллеля устойчивости (гомозигота по рецессивному аллелю), «—» - отсутствие в генотипе донорного аллеля

устойчивости (гомозигота по доминантному аллелю) , «±» - гетерозиготный образец.

Из таблицы 6 видно, что растения F_2 по локусу Ol10-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. Соответствие полученных соотношений подтверждается статистическим анализом расщепления (раздел 3.7). Также из таблицы следует, что все образцы, которые имеют в генотипе только донорный аллель устойчивости оказались устойчивыми после проведения фитопатологического тестирования, а образцы, имеющие в генотипе только неустойчивый аллель в генотипе, оказались так же неустойчивыми. 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 Хсс и их аллельное состояние.

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что маркер Ol10-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 по признаку устойчивости к сосудистому бактериозу, и, следовательно, его можно рекомендовать практической селекции в качестве ДНК-маркерной системы по идентификации генов резистентности в программах по созданию устойчивых к сосудистому бактериозу современных гибридов капусты белокочанной.

Также по результатам молекулярно-генетического анализа и фитопатологического тестирования выделены 15 растений F₂ гибридной комбинации 269-Яс-12п х Пи714 с генами устойчивости к сосудистому бактериозу и переданы в селекционный процесс для создания устойчивой к сосудистому бактериозу генплазмы капусты белокочанной, о чем имеется акт внедрения (приложение 1).

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

На первом этапе молекулярно-генетических исследований контрастные изогенные линии по устойчивости к фузариозу (устойчивая (ДТ-46) и восприимчивая (Кб1П)) были проанализированы с помощью нейтральных микросателлитных маркеров из базы данных VegMarks, расположенных в разных группах сцепления (1-20 маркер из таблицы 4). Из этих 20 маркеров информативным оказался только Ol10-D01, результаты апробации которого представлены на рисунке 34.

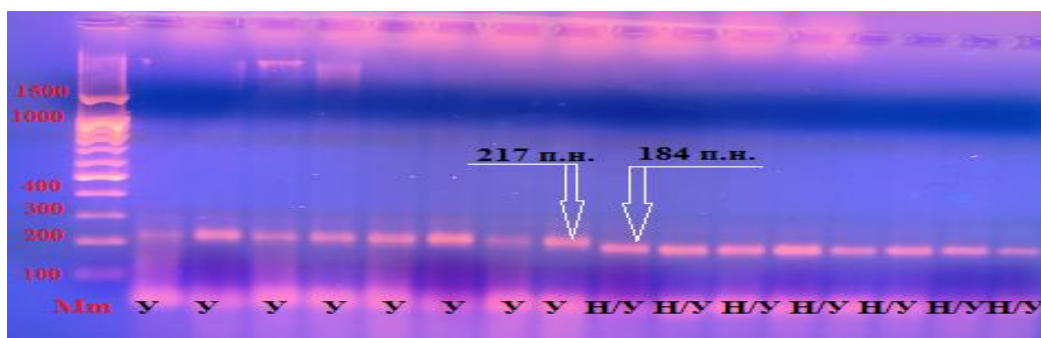


Рисунок 34 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-D01 в 2%-ном агарозном геле

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. Поэтому данный маркер можно использовать в дальнейшем селекционном процессе для изучения его сонаследования с признаком резистентности на сегрегирующей популяции. Размер донорного аллеля устойчивости составил 217 п.н., неустойчивого аллеля – 184 п.н.

Маркер Ol10-D01 локализован в 6 группе сцепления, как и доминантный ген устойчивости к фузариозу *Foc1* в работе Hong hao Lv (Lv et al., 2011; Lv et al., 2013; Lv et al., 2014a), поэтому для выявления дополнительных кандидатных маркеров этого гена устойчивости мы апробировали еще несколько маркеров из 6 группы сцепления от Na12-G11 до KBrB027H17F (21-30 маркер в таблице 4), расположенных на карте сцепления (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), в том же участке хромосомы, что и маркер Ol10-D01 (рисунок 35). Однако ни один из этих маркеров не выявил полиморфизма у контрастных изогенных линий. Результат ДНК анализа с применением одного из таких маркеров представлен на рисунке 36.

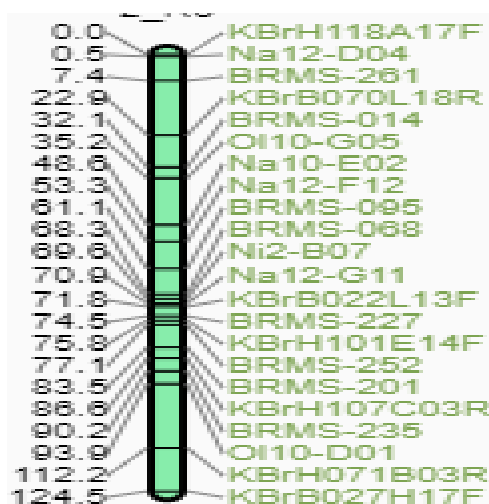


Рисунок 35 – Молекулярная карта 6 группы сцепления капусты белокочанной (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>)

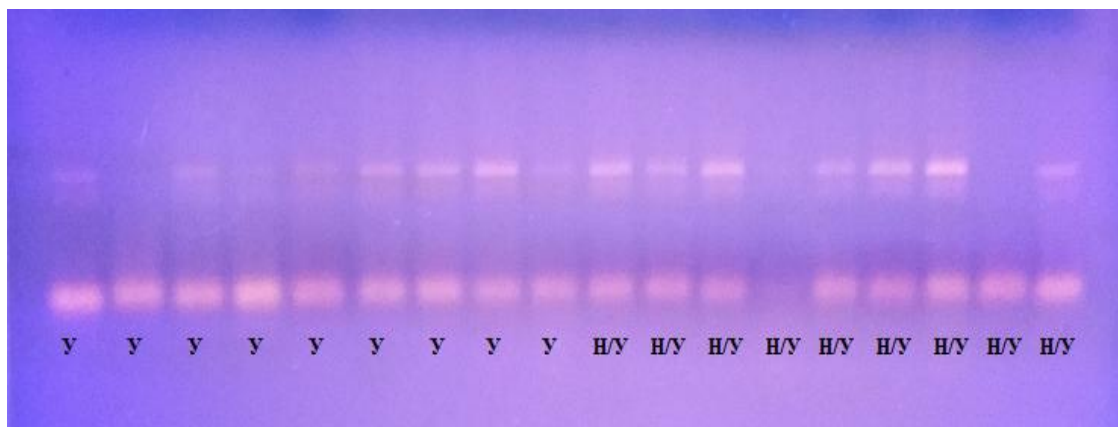


Рисунок 36 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу KBrV027H17F в 2%-ном агарозном геле

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

На рисунке 36 видно, что данный маркер не выявляет аллельную разницу между устойчивыми и неустойчивыми образцами, как и все остальные из этого же перечня, следовательно, они не предназначены для ведения селекции на признак устойчивости к фузариозу.

На следующем этапе была проведена апробация 2 кодоминантных InDel маркеров (A1 и M10), выявляющих высокий полиморфизм, по данным Lv с коллегами, у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной (Lv et al., 2011; Lv et al., 2013; Lv et al., 2014a), а также кодоминантный SSR-маркер Frg13, тесно сцепленный с геном устойчивости к фузариозу *Foc1* (0,1 cM) (Liu et al., 2017) (таблица 5). Результат электрофоретического разделения ПЦР-продуктов по данным локусам представлен на рисунках 37-39.

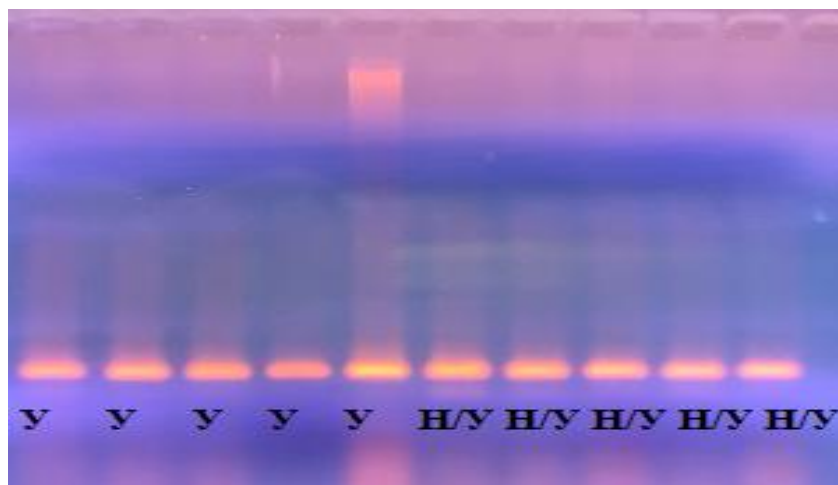


Рисунок 37 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу A1 в 2%-ном агарозном геле

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

Как видно из рисунка 37 аллельный полиморфизм между устойчивыми и восприимчивыми формами капусты белокочанной отсутствует. И данная маркерная система, соответственно, не пригодна для проведения исследований в данном направлении.

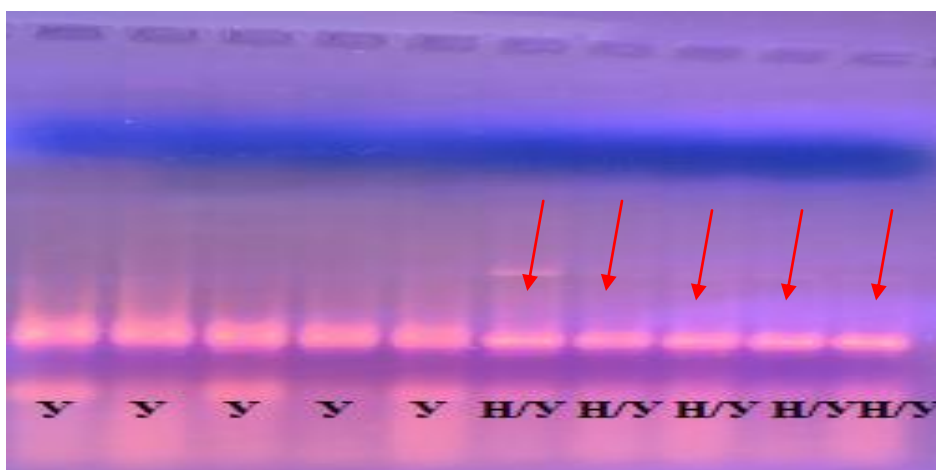


Рисунок 38 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу M10 в 2%-ном агарозном геле

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

Локус M10 (рисунок 38) показал небольшую аллельную разницу, но для четкой интерпретации результатов анализа ДНК гибридных растений она не пригодна в 2%-ном агарозном геле.

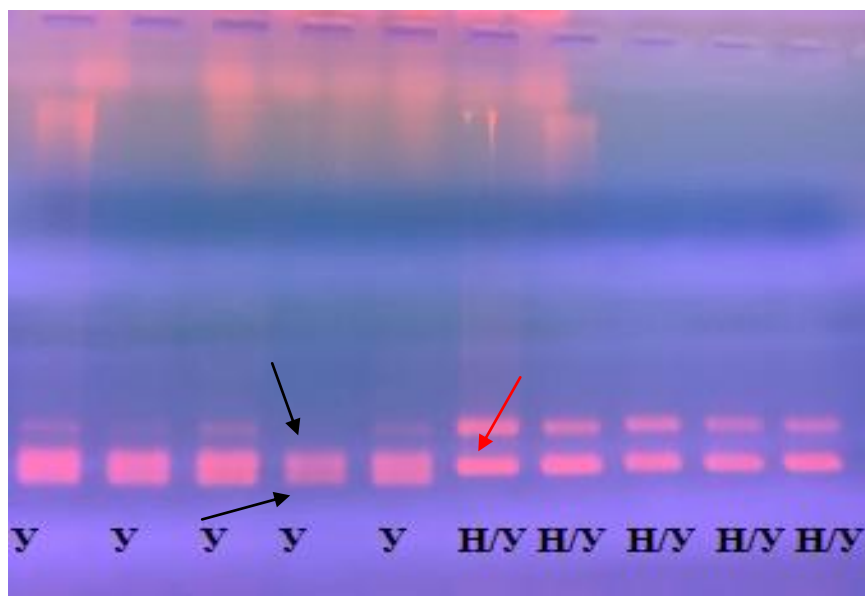


Рисунок 39 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 2%-ном агарозном геле

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

Из рисунка 39 видно, что по исследуемому локусу Frg13 аллельная разница имеется, но для идентификации гетерозигот визуализировать результаты ПЦР-продукта будет затруднительно из-за маленькой аллельной разницы в размере целевых ампликонов (указано стрелками на рисунке).

Поэтому, так как в работах Hong hao Lv (2011, 2013, 2014 год) и Liu (2017 год) говорится о высоком полиморфизме данных маркеров и их близком расположении к гену устойчивости к фузариозу *Foc1* было решено провести электрофорез в полиакриламидном геле, поскольку хоть он и является длительным методом, но имеет высокую разрешающую

способность, позволяющую выделить даже минорные компоненты ДНК у исследуемых образцов (Дубина, 2019). Результаты анализа в полиакриламидном геле представлены на рисунках 40, 41.

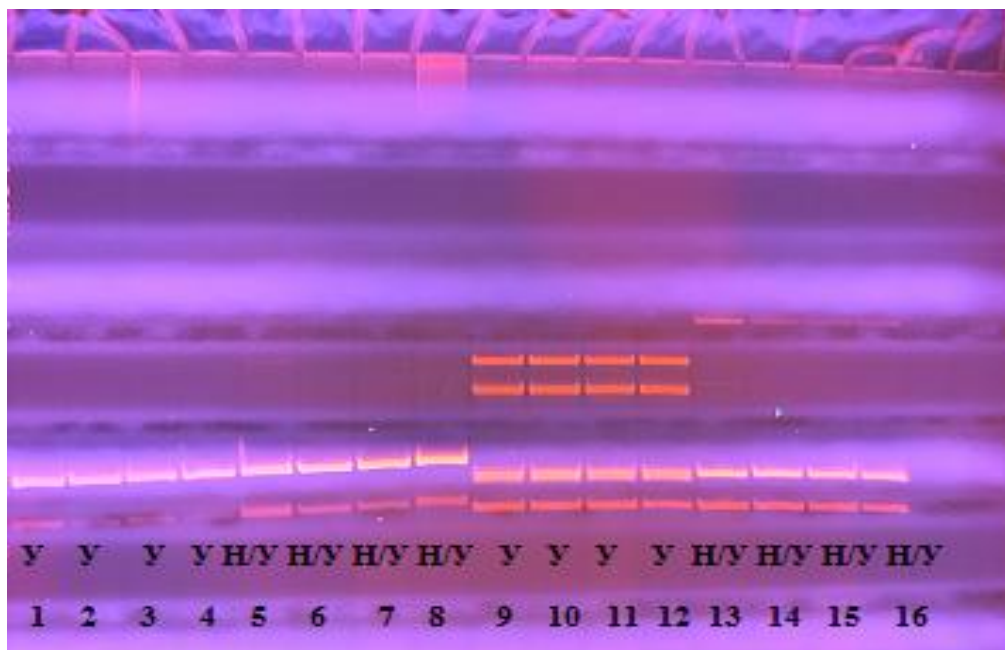


Рисунок 40 - Визуализация продуктов ПЦР по локусам A1 и M10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П; 1-8 – растения, анализируемые по локусу A1, 9-16– растения, анализируемые по локусу M10.

Из рисунка 40 видно, что по локусу A1 не имеется аллельной разницы в ПААГ между устойчивыми и неустойчивыми образцами, и их ДНК-профили одинаковы. А по локусу M10 у контрастных по устойчивости образцов видны полиморфные аллели в полиакриламидном геле. Таким образом, из этих двух маркеров только M10 в полиакриламидном геле можно использовать в дальнейших исследованиях на селекционных образцах.

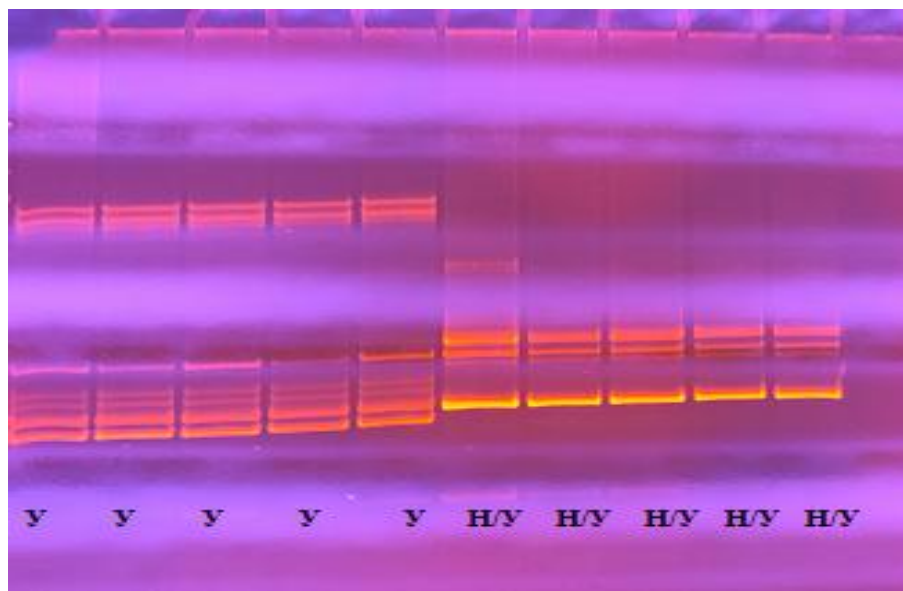


Рисунок 41 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле

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

Из рисунка 41 видно, что по локусу Frg13, близко расположенному к гену устойчивости к фузариозу *Foc1*, также наблюдается аллельная разница между контрастными формами. Следовательно, имеет смысл изучить сонаследование данного маркера на сегрегирующей F₂-популяции по признаку устойчивости к фузариозу.

В 2021 году было проведено самоопыление растений F₁ гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П с целью получения расщепляющейся популяции, на которой впоследствии были так же апробированы данные маркеры для изучения их сонаследования с признаком устойчивости к фузариозу, что отражено на рисунках 42-44.

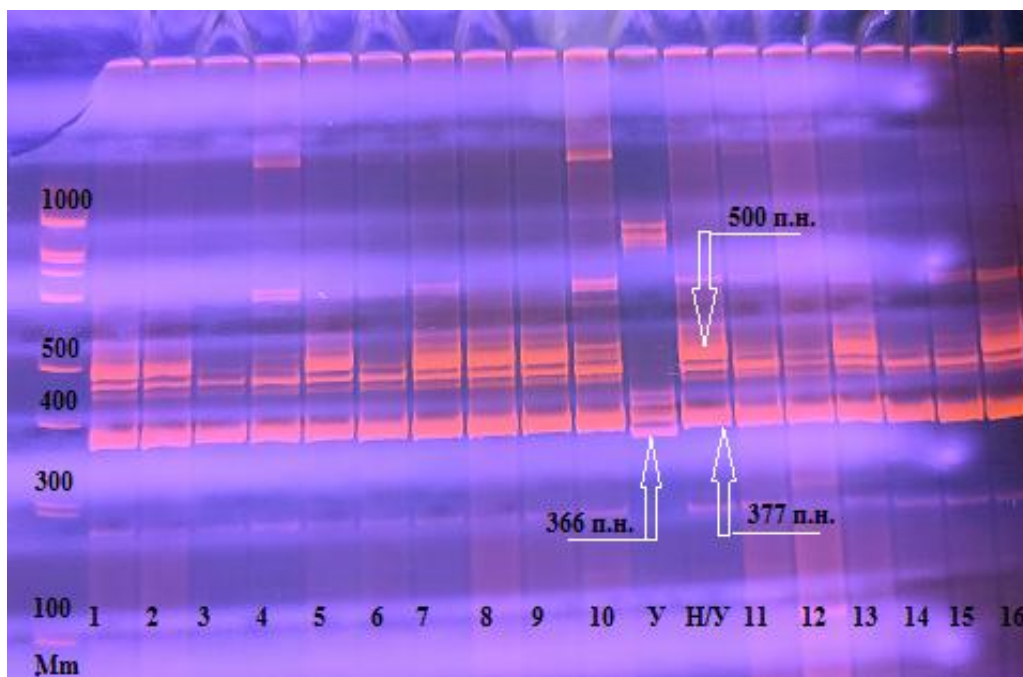


Рисунок 42 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – Мм- маркер молекулярной массы; 1-16 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На рисунке 42 представлен результат ДНК-анализа растений F_2 по локусу Frg13. Определен размер ПЦР-продуктов для контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной. Для устойчивого образца размер полиморфного аллеля составил 366 п.н., для неустойчивого – 377 п.н. и 500 п.н. Из представленной электрофореграммы видно, что первые 16 растений сегрегирующей популяции имеют ДНК-профиль как у неустойчивого контроля (изогенной линии Кб1П).

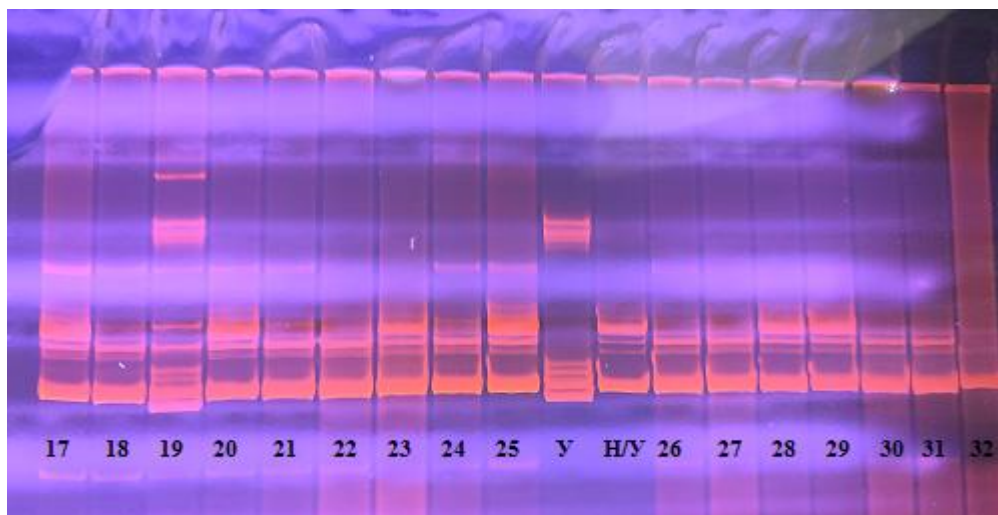


Рисунок 43 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – 17-32 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; Y – изогенная устойчивая линия ДТ-46; H/Y- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На электрофореграмме рисунка 43 видно, что растение 19 имеет ДНК-профиль как у устойчивого контроля, а все остальные растения имеют только неустойчивый аллель в генотипе.

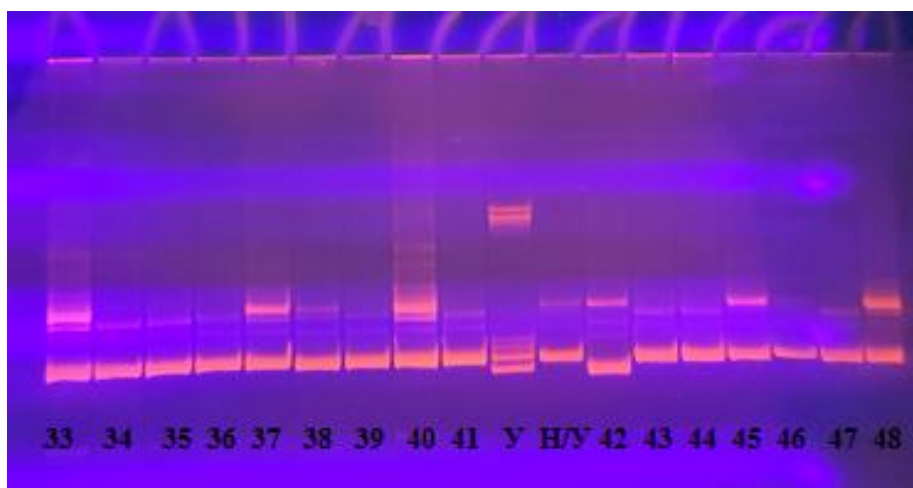


Рисунок 44 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – 33-48 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На рисунке 44 можно увидеть, что только растение №42 имеет аллель устойчивости в генотипе, все остальные растения имеют ДНК-профиль, идентичный неустойчивому контролю.

Таким образом, по результатам ДНК-анализа 62 растений поколения F₂ установлено, 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.

На следующем этапе молекулярно-генетических исследований растения сегрегирующей популяции были проанализированы с помощью маркера M10. Аллельное разнообразие растений F₂ по локусу M10 представлено на рисунках 45-48.

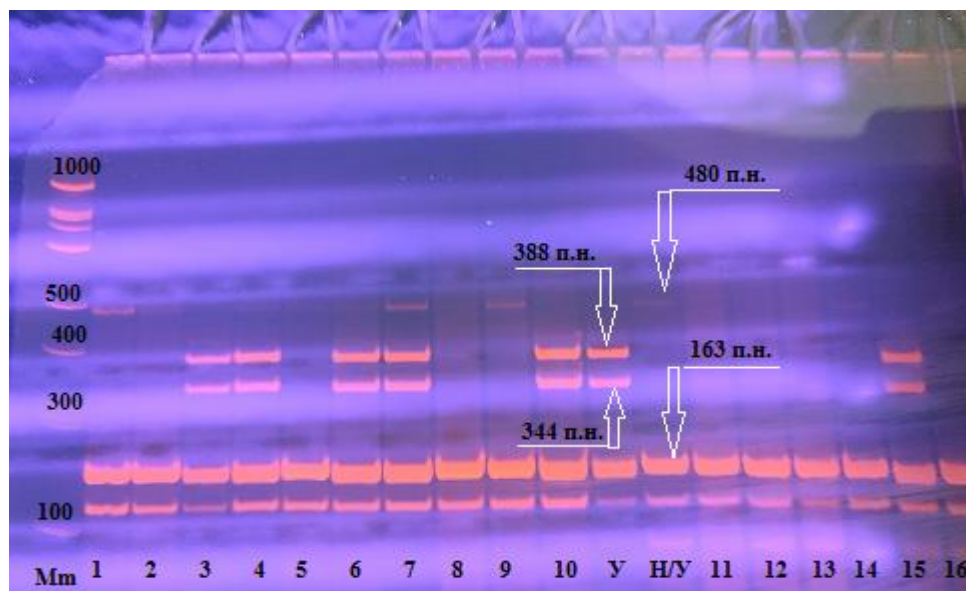


Рисунок 45 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу M10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – Мм- маркер молекулярной массы; 1-16 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

При анализе электрофореграммы рисунка 45 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. (гомозиготны по рецессивной аллели), растения №№3, 15 имеют в генотипе аллели устойчивости размером 344 и 388 п.н. (является гомозиготным по доминантной аллели), а растения №№4, 6, 7, 10 гетерозиготны (имеют в ДНК-профиле и аллели устойчивости, и аллели восприимчивости).

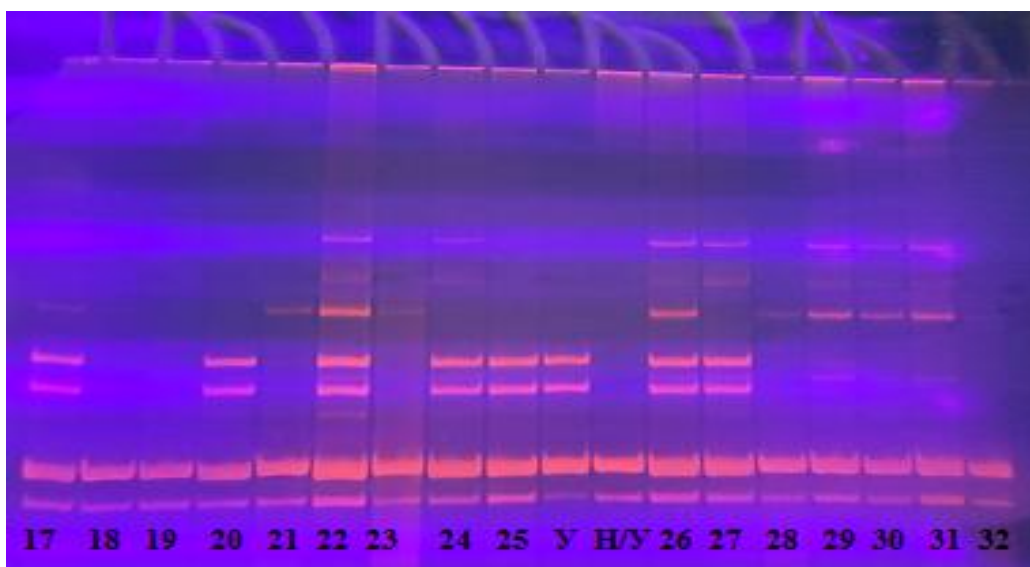


Рисунок 46 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу М10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – 17-32 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из электрофореграммы рисунка 46 видно, что растения №№18, 19, 21, 23, 28, 29, 30, 31, 32 являются гомозиготами по рецессивной аллели

восприимчивости, растение №20 является гомозиготой по доминантной аллели устойчивости, растения №№17, 22, 24, 25, 26, 27 гетерозиготны.

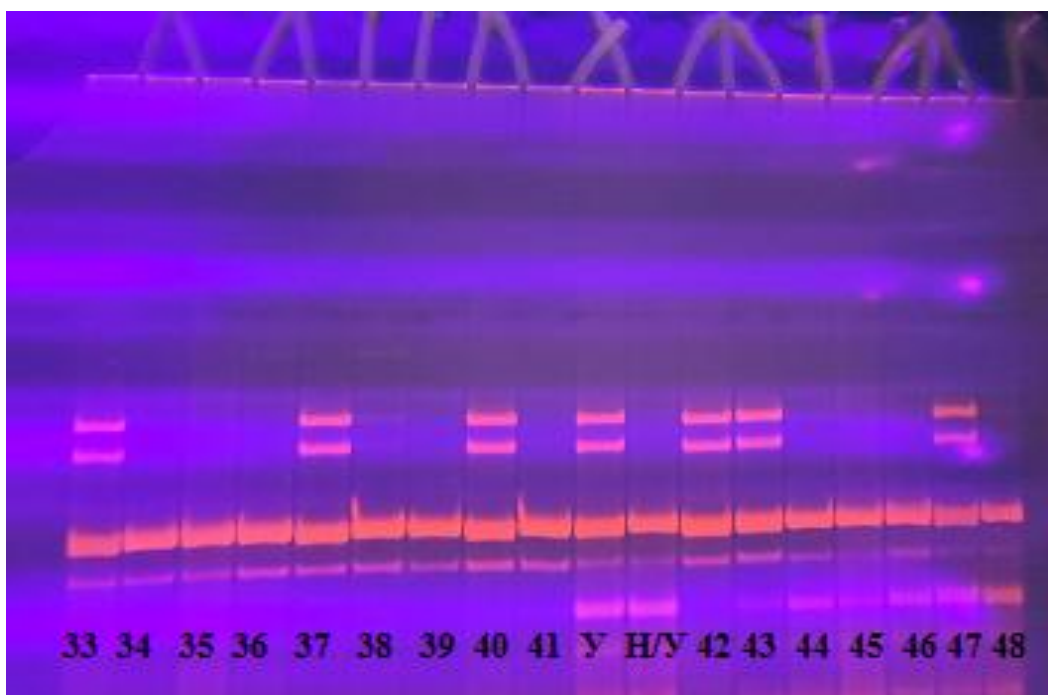


Рисунок 47 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу M10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – 33-48 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; Y – изогенная устойчивая линия ДТ-46; H/Y- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На рисунке 47 так же представлено аллельное разнообразие по локусу M10. Растения №№34, 35, 36, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 48 несут только аллели восприимчивости, растения №№33, 37, 47 несут только аллели устойчивости, а растения №№40, 42, 43 гетерозиготны.

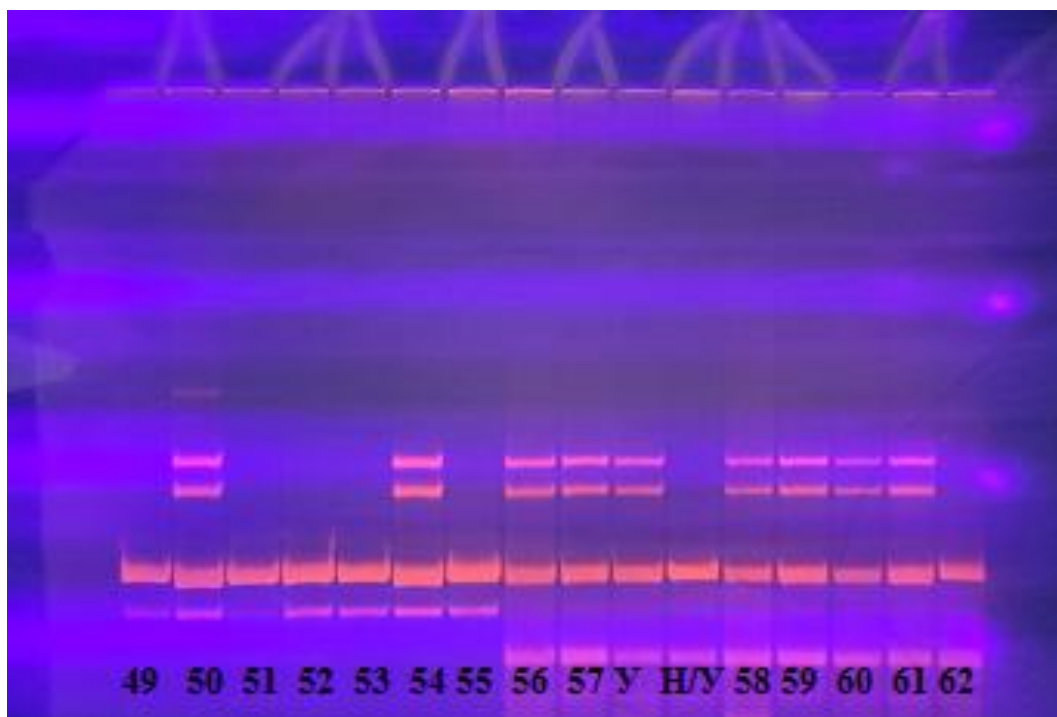


Рисунок 48 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу M10 в 8%-ном полиакриламидном геле

Примечание – 49-62 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; Y – изогенная устойчивая линия ДТ-46; H/Y- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из электрофореграммы рисунка 48 видно, что растения №№49, 51, 52, 53, 55, 62 являются гомозиготами по рецессивной аллели восприимчивости, растения №№56, 57, 58, 60 являются гомозиготами по доминантной аллели устойчивости, а растения №№50, 54, 59, 61 гетерозиготны по изучаемому локусу.

Далее все 62 растения сегрегирующей популяции F_2 были проанализированы с помощью микросателлитного маркера Ol10-D01, который выявил высокий полиморфизм у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной на первом этапе молекулярно-генетических исследований по данному признаку. Результаты апробации данного маркера на растениях F_2 представлены на рисунках 49-52.

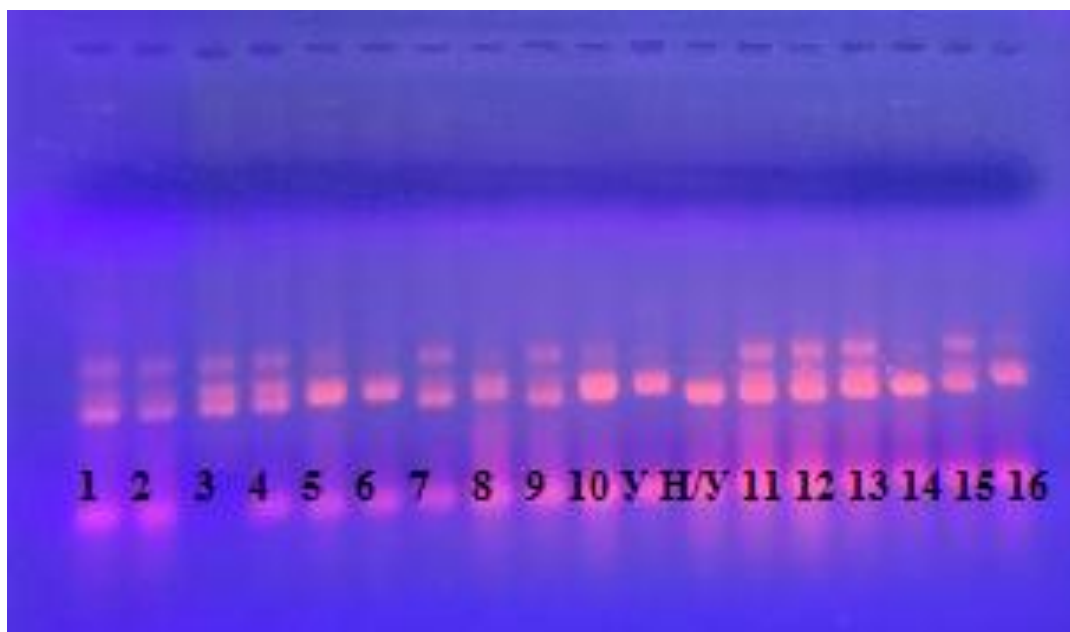


Рисунок 49 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-D01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание – 1-16 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На электрофореграмме рисунка 49 представлено аллельное разнообразие по локусу Ol10-D01 уже среди первых проанализированных растений сегрегирующей популяции. Можно увидеть, что растения №№1, 2, 7, 9 14, 15 являются гомозиготами по рецессивной аллели (несут аллель восприимчивости в генотипе), растения №№5, 6, 16 являются гомозиготами по доминантной аллели (несут аллель устойчивости в генотипе), а растения №№3, 4, 11, 12, 13 гетерозиготны.

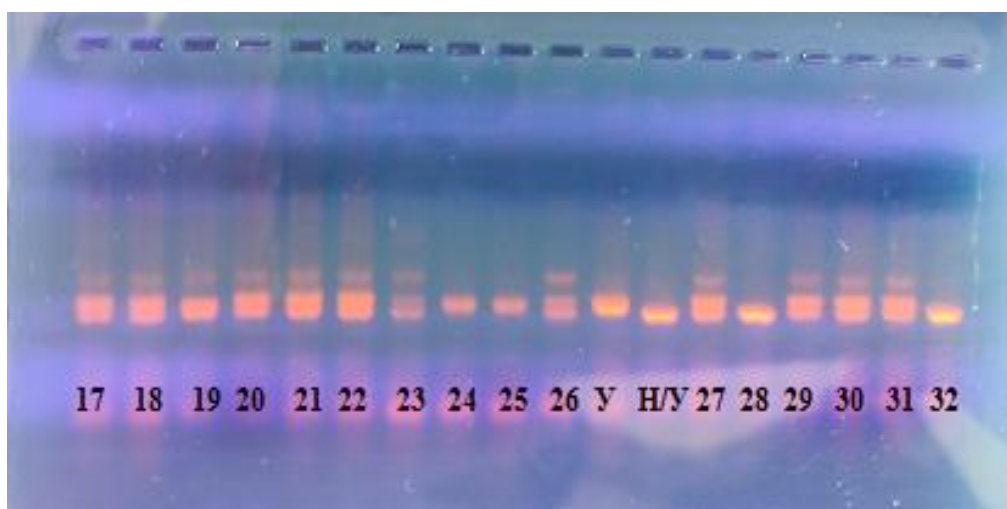


Рисунок 50 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-D01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание – 17-32 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; Y – изогенная устойчивая линия ДТ-46; H/Y- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из электрофореграммы рисунка 50 следует, что растения №№28, 32 имеют в генотипе только аллель восприимчивости, растения №№24, 25 имеют только аллель устойчивости, а растения №№17-23, 26, 27, 29-31 гетерозиготны.

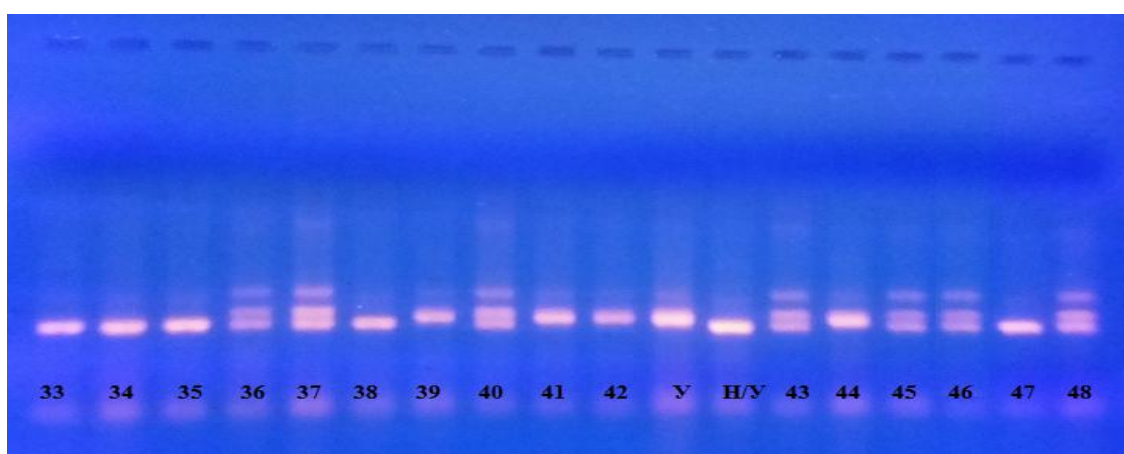


Рисунок 51 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-D01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание – 33-48 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На рисунке 51 видно, что по изучаемому локусу растения №№33-35, 38, 47 несут в генотипе только аллель восприимчивости, растения №№39, 41, 42, 44 несут только донорную аллель устойчивости, а растения №№36, 37, 40, 43, 45, 46, 48 являются гетерозиготами.

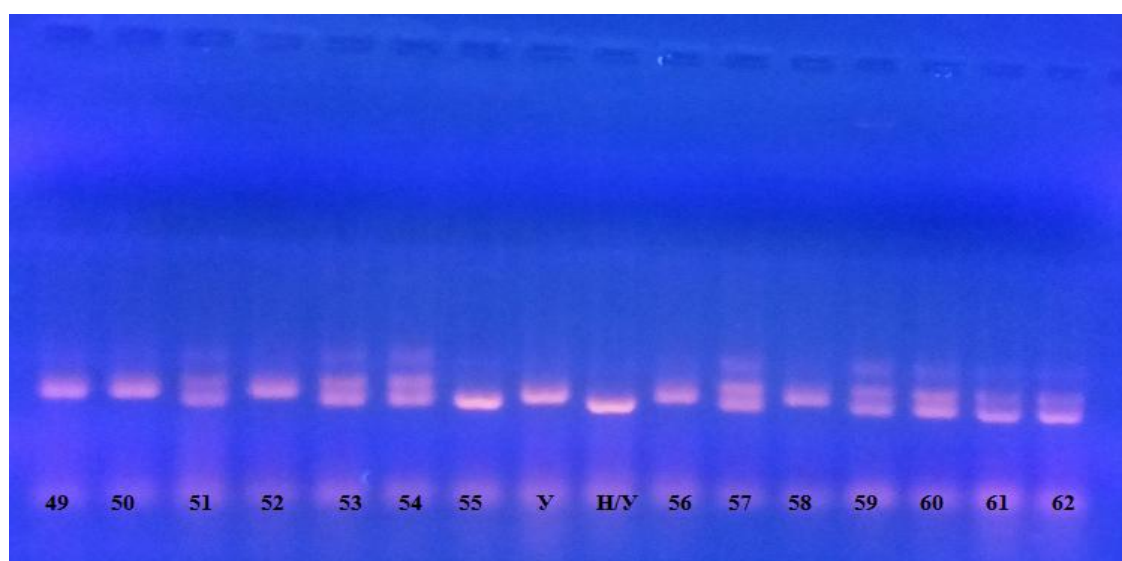


Рисунок 52 - Визуализация продуктов ПЦР по локусу Ol10-D01 в 2%-ном агарозном геле

Примечание – 48-62 – растения поколения F_2 гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На рисунке 52 так же представлено аллельное разнообразие растений сегрегирующей популяции. Видно, что растение №55 является гомозиготой по рецессивной аллели, растения №№49, 50, 52, 56, 58 являются гомозиготами по доминантной аллели, а растения №№51, 53, 54, 57, 59, 60-62 гетерозиготны по локусу Ol10-D01.

Также одновременно с ДНК-анализом проводилось фитопатологическое тестирование растений F₂ на устойчивость к фузариозу и сравнительный анализ полученных результатов для проверки сонаследования информативных маркеров M10 и Ol10-D01 с признаком устойчивости к фузариозу и установления окончательных соотношений по генотипу и фенотипу (раздел 3.5).

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

В апреле 2022 года для проверки информативности отобранных в молекулярно-генетических исследованиях маркеров проводилось фитопатологическое тестирование растений F₂ гибридной комбинации ДТ-46 х Кб1П, полученных в результате принудительного самоопыления растений F₁. Искусственный инфекционный фон создавался путем опрыскивания стерильной почвы водной суспензией гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* местной популяции патогена, относящиеся к самой распространенной в Краснодарском крае расе 1, с последующей ее инкубацией в термостате и высадкой семян в зараженную почву. Оценку поражаемости образцов проводили в динамике роста и развития растений по шкале, разработанной «ВНИИ риса» (Королева и др., 2012). Оценку проявления болезни проводили через 21 день после инокуляции. 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 сеянцев, что отражено на рисунках 53, 54.



Рисунок 53 – Симптомы поражения фузариозом, соответствующие 1 баллу поражения

На рисунке 53 видны пожелтение, увядание и усыхание семядольных листьев, что соответствует 1 баллу поражаемости.



Рисунок 54 – Симптомы поражения фузариозом, соответствующие 2 баллам поражения

На рисунке 54 видно, что у растений сегрегирующей популяции F_2 капусты белокочанной, помимо усыхания и увядания семядольных листьев, наблюдается пожелтение настоящих листьев, что указывает на 2 балла поражения фузариозом.

При подсчете результатов фитопатологического тестирования растения, имеющие степень поражения 2-3 балла, считались неустойчивыми по фенотипу, а растения со степенью поражения 0-1 балл – как устойчивые.

На завершающем этапе исследования проводился сравнительный анализ результатов ДНК-анализа с использованием молекулярных маркеров (M10 и Ol10-C01), выявивших все типы аллельного состояния гена устойчивости к фузариозу у растений F_2 , что отражено в таблице 7.

Таблица 7 – Сравнительный анализ результатов ДНК-анализа растений F₂ по локусам M10 и Ol10-D01 и фитопатологического тестирования

Номер образца	Результаты		
	ДНК-анализ по локусу Ol10-D01	ДНК-анализ по локусу M10	Фитопатологический тест
1	–	–	–
2	–	–	–
3	±	+	+
4	–	±	–
5	+	–	+
6	+	±	+
7	–	±	+
8	+	–	+
9	–	–	–
10	+	±	+
11	±	–	+
12	±	–	+
13	±	–	+
14	–	–	–
15	–	–	–
16	+	–	+
17	±	±	+
18	±	–	+
19	±	–	+
20	±	+	+
21	±	–	+
22	±	±	+
23	±	–	+

Продолжение таблицы 7

Номер образца	Результаты		
	ДНК-анализ по локусу Ol10-D01	ДНК-анализ по локусу M10	Фитопатологический тест
24	+	±	+
25	+	±	+
26	±	±	+
27	±	±	+
28	—	—	—
29	±	—	+
30	±	—	+
31	±	—	+
32	—	—	—
33	—	+	—
34	—	—	—
35	—	—	—
36	±	—	+
37	±	+	+
38	—	—	—
39	+	—	+
40	±	±	+
41	+	—	+
42	+	±	+
43	±	±	+
44	+	—	+
45	±	—	+
46	±	—	+

Продолжение таблицы 7

Номер образца	Результаты		
	ДНК-анализ по локусу Ol10-D01	ДНК-анализ по локусу M10	Фитопатологический тест
47	—	+	—
48	±	—	+
49	+	—	+
50	+	±	+
51	±	—	+
52	+	—	+
53	±	—	+
54	±	±	+
55	—	—	—
56	+	+	+
57	±	+	+
58	+	+	+
59	±	±	+
60	±	+	+
61	±	±	+
62	±	—	+

Примечание – по фитопатологическому тесту: «+» - устойчивый образец, «—» - неустойчивый образец; по результатам ДНК-анализа: «+» - наличие в генотипе донорного аллеля устойчивости (гомозигота по доминантному аллелю), «—» - отсутствие в генотипе донорного аллеля устойчивости (гомозигота по рецессивному аллелю) , «±» - гетерозиготный образец.

Из таблицы 7 видно, что растения F_2 по локусу Ol10-D01 имеют следующее соотношение по генотипу: 16:31:15, т.е. 16 растений являются гомозиготами по доминантной аллели устойчивости, 31 растение гетерозиготно, а 15 растений являются гомозиготами по рецессивной аллели, что соответствует менделевскому закону расщепления 1:2:1 и подтверждается статистически (раздел 3.7), а по локусу M10 – 9:17:36, где 9 растений являются гомозиготами по доминантной аллели устойчивости, 17 растений гетерозиготно, а 36 растений являются гомозиготами по рецессивной аллели, что не удовлетворяет закону Менделя.

По результатам фитопатологического тестирования 22 растения оказались без признаков поражения фузариозом (устойчивые), у 26 растений были поражены только семядольные листья (1 балл поражаемости), и они были оценены так же как устойчивые, у 14 растений кроме семядольных были поражены и настоящие листья (2 балла поражаемости), и их оценили как неустойчивые. Таким образом, 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 (χ^2) (раздел 3.7). Также из таблицы следует, что все образцы, которые по локусам Ol10-D01 и M10 являются гетерозиготами, либо гомозиготами по доминантной аллели устойчивости, оказались устойчивыми. Растения, которые являются гомозиготами по рецессивной аллели восприимчивости по обоим изучаемым локусам, по фенотипу оказались неустойчивыми. Образцы, которые являются гомозиготами по рецессивной аллели восприимчивости по локусу Ol10-D01 оказались неустойчивыми, а по локусу M10 - доминантными гомозиготами, оказались устойчивыми, т.е. у них наблюдалось только увядание семядольных листьев без поражения остальных частей растения и нарушения его роста и дальнейшего развития.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что по результатам сравнительного анализа растений капусты белокочанной по

генотипу и фенотипу только маркер Ol10-D01 является информативным кодоминантным маркером, сонаследуемым с признаком устойчивости к фузариозу и может использоваться в молекулярно-генетических исследованиях с фенотипической оценкой для определения степени устойчивости растений капусты белокочанной к фузариозу.

3.6 Апробация информативного SSR-маркера Ol10-D01 на BC₁F₁-популяции

При проведении молекулярно-генетических исследований по идентификации донорных аллелей устойчивости к фузариозу в селекционном материале капусты белокочанной был выявлен информативный SSR-маркер Ol10-D01, сонаследуемый с признаком устойчивости к фузариозу. Впоследствии с его помощью были проанализированы растения BC₁F₁-популяции, полученные в результате скрещивания F₁-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 анализа растений BC₁F₁ представлены на рисунках 55-58.

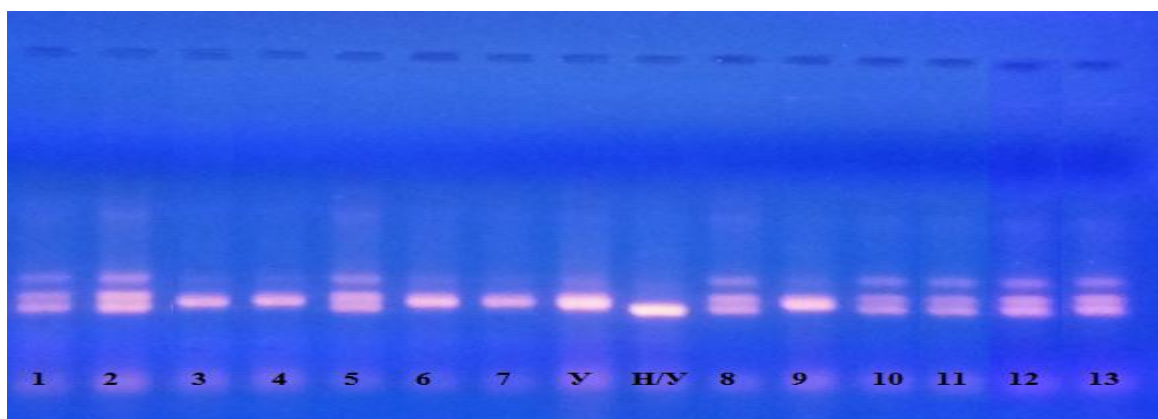


Рисунок 55 – Результаты ДНК-анализа растений BC₁F₁ по локусу Ol10-D01

Примечание – 1-13 – растения поколения BC_1F_1 гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х ДТ-46; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из электрофореграммы рисунка 55 видно, что растения №№ 1, 2, 5, 8, 10-13 являются гетерозиготами, растения №№ 3, 4, 6, 7, 9 – гомозиготы по донорному аллелю устойчивости.

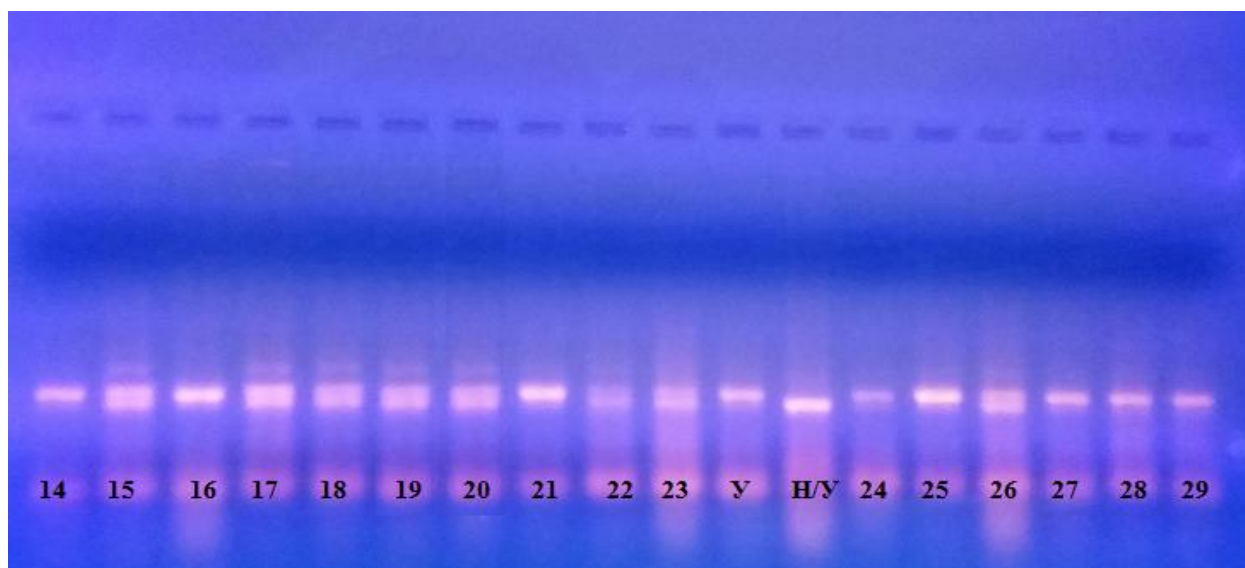


Рисунок 56 – Результаты ДНК-анализа растений BC_1F_1 по локусу Ol10-D01

Примечание – 14-29 – растения поколения BC_1F_1 гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х ДТ-46; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

На рисунке 56 видно, что растения №№ 14, 16, 21, 24, 25, 27-29 несут в генотипе только аллель устойчивости, а растения №№ 15, 17-20, 22, 23, 26 являются гетерозиготами по данному локусу.

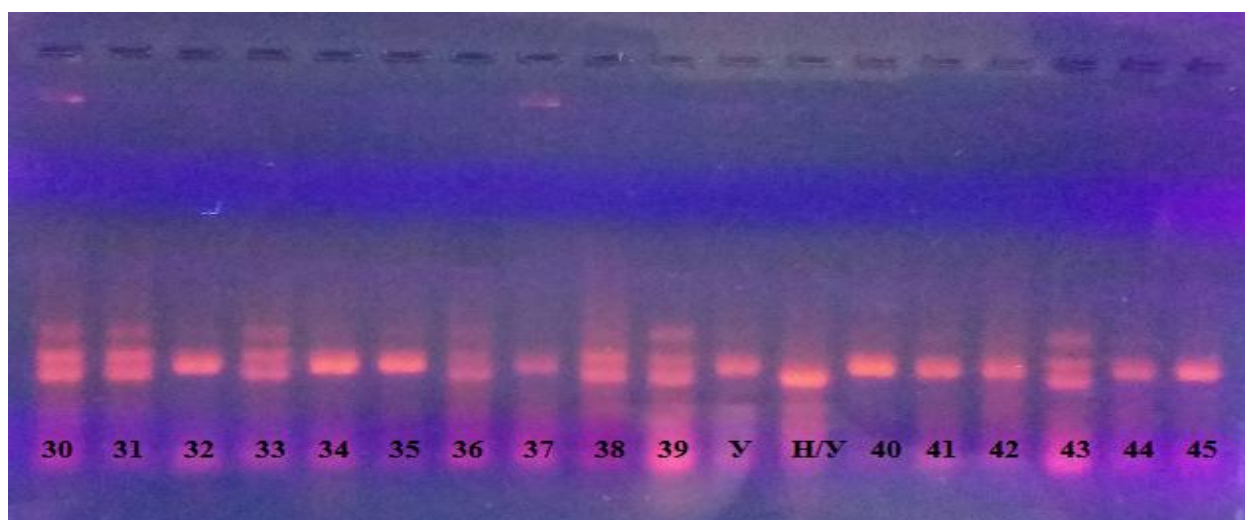


Рисунок 57 – Результаты ДНК-анализа растений BC_1F_1 по локусу Ol10-D01

Примечание – 30-45 – растения поколения BC_1F_1 гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х ДТ-46; Y – изогенная устойчивая линия ДТ-46; H/Y- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из электрофореграммы рисунка 57 следует, что растения №№ 32, 34, 35, 37, 40-42, 44, 45 являются гомозиготами по доминантной аллели устойчивости, растения №№ 30, 31, 33, 36, 38, 39, 43 – гетерозиготы по изучаемому локусу.

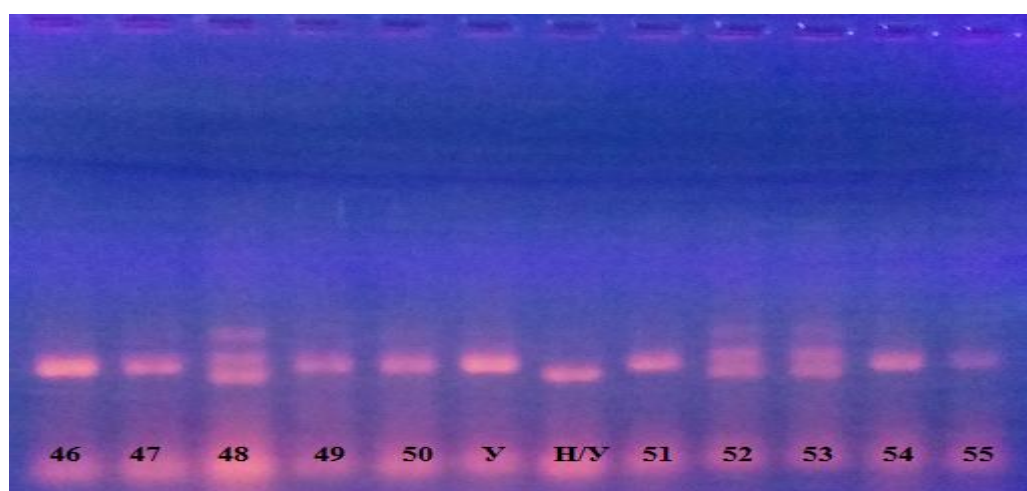


Рисунок 58 – Результаты ДНК-анализа растений BC_1F_1 по локусу Ol10-D01

Примечание – 46-55 – растения поколения BC_1F_1 гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х ДТ-46; У – изогенная устойчивая линия ДТ-46; Н/У- изогенная неустойчивая линия Кб1П.

Из рисунка 58 видно, что BC_1F_1 -растения №№ 48, 52, 53 гетерозиготны по локусу Ol10-D01, а растения №№ 46, 47, 49, 50, 51, 54, 55 имеют в генотипе только донорный аллель устойчивости.

Таким образом, в результате проведения молекулярно-генетических исследований всех 55 растений BC_1F_1 -популяции по локусу Ol10-D01 установлено, что 29 растений имеют в генотипе только донорный аллель устойчивости, т.е. гомозиготны по доминантной аллели, 26 растений имеют и аллель устойчивости, и аллель восприимчивости, т.е. гетерозиготны по изучаемому локусу, что удовлетворяет теоретически ожидаемому расщеплению по генотипу в беккроссной популяции 1:1 и подтверждается статистической проверкой методом хи-квадрата (χ^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 (χ^2)

Для проведения статистического анализа расщепления полученных растений капусты белокочанной в сегрегирующих популяциях F_2 и BC_1F_1 по генотипу и фенотипу и определения его соответствия менделевскому закону расщепления использовали метод хи-квадрата (χ^2) (Лобашев, 1969). Результаты данного анализа представлены в таблицах 8, 9.

Таблица 8 – Статистический анализ расщепления в сегрегирующих популяциях F₂ и BC₁F₁ капусты белокочанной по генотипу

Показатели	Расщепление в F ₂ -популяции гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по локусу Ol10-C01			Расщепление в F ₂ -популяции гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) по локусу Ol10-D01			Расщепление в BC ₁ F ₁ -популяции гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х ДТ-46 по локусу Ol10-D01	
	+	±	–	+	±	–	+	±
Φ	24	52	26	16	31	15	29	26
T	26	50	26	16	30	16	28	28
(Φ-T) ²	4	4	0	0	1	1	1	4
χ ²	0,15	0,08	0	0	0,03	0,06	0,04	0,14
χ ² (сум.)	0,23			0,09			0,18	

Примечание – «+» - наличие в генотипе донорного аллеля устойчивости (гомозигота по доминантному аллелю), «–» - отсутствие в генотипе донорного аллеля устойчивости (гомозигота по рецессивному аллелю), «±» - гетерозиготный образец; Φ – фактическое число растений, T – теоретическое число растений, (Φ-T)² – квадрат отклонения фактического числа растений от теоретически ожидаемого, χ² – отношение квадрата отклонения к теоретически ожидаемому числу растений (хи-квадрат), χ² (сум.) – суммарный показатель хи-квадрата для данной популяции.

После расчета показателя хи-квадрат проводилось сравнение полученных значений χ² (сум.) с критическим значением χ²(крит.) из таблицы Фишера (Лобашев, 1969). Учитывали, что уровень значимости в данном исследовании составляет 0,5. Для расщепления в F₂-популяции по локусу Ol10-C01 χ²(крит.) с учетом числа степеней свободы, равного 2, составляет 1,39. Получается, что для данного расщепления χ²(сум.) < χ²(крит.), следовательно, отклонение между фактическим расщеплением и теоретическим несущественно и носит случайный характер, т.е. оно

соответствует менделевскому 1:2:1. Для расщепления в F₂-популяции по локусу Ol10-D01 χ^2 (крит.) так же составляет 1,39, и χ^2 (сум.) < χ^2 (крит.), поэтому оно так же удовлетворяет менделевскому закону 1:2:1. Для расщепления в BC₁F₁-популяции по локусу Ol10-D01 χ^2 (крит.) с учетом числа степеней свободы, равного 1, χ^2 (крит.) составляет 0,46, следовательно, и в данном расщеплении χ^2 (сум.) < χ^2 (крит.), и оно удовлетворяет расщеплению в беккроссной популяции 1:1.

Таблица 9 – Статистический анализ расщепления в сегрегирующих популяциях F₂ капусты белокочанной по фенотипу

Показатели	Расщепление в F ₂ -популяции гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714		Расщепление в F ₂ -популяции гибридной комбинации (ДТ-46 х К61П)	
	+	–	+	–
Ф	38	64	48	14
Т	26	76	46	16
(Ф-Т) ²	144	144	4	4
χ^2	5,54	1,89	0,09	0,25
χ^2 (сум.)	7,43		0,34	

Примечание – «+» - устойчивый образец, «–» - неустойчивый образец, Ф – фактическое число растений, Т – теоретическое число растений, (Ф-Т)² – квадрат отклонения фактического числа растений от теоретически ожидаемого, χ^2 – отношение квадрата отклонения к теоретически ожидаемому числу растений (хи-квадрат), χ^2 (сум.) – суммарный показатель хи-квадрата для данной популяции.

Оценка расщепления в исследованных популяциях по фенотипу проводилась с учетом уровня значимости 0,5 и степени свободы, равной 1. При данных параметрах χ^2 (крит.) по таблице Фишера составляет 0,46.

Получается, что для расщепления в F_2 -популяции гибридной комбинации 269-Яс12п-2 х Пи714 по признаку устойчивости к сосудистому бактериозу $\chi^2(\text{сум.}) > \chi^2(\text{крит.})$, т.е. 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 х Кб1П по признаку устойчивости к фузариозу $\chi^2(\text{сум.}) < \chi^2(\text{крит.})$, 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 Ol10-C01, Ol11-H06 и BoESSR726 выявляют полиморфизм между контрастными по устойчивости к сосудистому бактериозу образцами капусты белокочанной, а InDel маркер M10 и SSR-маркеры Frg13 и Ol10-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 х Пи714 с помощью SSR-маркеров Ol10-C01, Ol11-H06 и BoESSR726, фитопатологическое тестирование полученных растений F_2 и сравнение его результатов с результатами ПЦР-анализа. Установлено, что SSR-маркер Ol10-C01 является сонаследуемым с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу. Выделены 15 растений F_2 гибридной комбинации 269-Яс-12п х 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 х Кб1П с помощью InDel-маркера M10 и SSR-маркеров Frg13 и Ol10-D01, фитопатологическое тестирование полученных растений F_2 и сравнение его результатов с результатами ПЦР-анализа. Установлено, что SSR-маркер Ol10-D01 является сонаследуемым с признаком устойчивости к фузариозу.

4. Определены информативные кандидатные ДНК-маркерные системы:
Ol10-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и Ol10-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 Ol10-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и Ol10-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_2 гибридной комбинации 269-Яс-12п х Пи714 с генами устойчивости к сосудистому бактериозу и растения BC_1F_1 гибридной комбинации (ДТ-46 х Кб1П) х 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асякин Б.П. Защита белокочанной капусты от бактериозов / Б.П. Асякин, А.М. Лазарев // Информационный листок. СПб, 2002. 2 с.
2. Ахатов А.К. Защита овощных культур и картофеля от болезней / А.К. Ахатов, Ф.С. Джалилов, О.О. Белошапкина, Ю.М. Стройков, В.Н. Чижов, А.В. Трусевич. – М., 2006. – 352 с.
3. Балашов Н.Н. Овощеводство: учебник / Н.Н. Балашов, Г.О. Земан — 4-е изд., перераб. и доп. — Ташкент: Укитувчи, 1981. — 368 с.
4. Белик В.Ф. Методика опытного дела в овощеводстве и бахчеводстве / В.Ф. Белик. - М.: Агропромиздат, 1992. – 319 с.
5. Беренсен Ф.А. Современные разработки молекулярных маркеров устойчивости к патогенам рода капуста (*Brassica* L.) / Ф.А. Беренсен, О. Ю. Антонова, А. М. Артемьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. - №23 (6). – С. 656-666.
6. Во Тхи Нгок Ха. Биологические свойства возбудителя сосудистого бактериоза капусты и меры защиты: дис.... канд. биол. наук. – 2015. – 152 с.
7. Гаркуша С.В. Вредители и болезни овоще-бахчевых культур и картофеля в Краснодарском крае / С.В. Гаркуша, Н.П. Иващенко, О.Н. Палкина, Э.А. Пикушова, В.С. Горьковенко, Е.Ю. Веретельник, И.В. Бедловская, О.Е. Липовцева.- Краснодар, 2009. – 167 с.
8. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. - М., 2002. - 589 с.
9. Говоров Д.Н. Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в Российской Федерации в 2017 году и Прогноз развития вредных объектов в 2018 году / Д.Н. Говоров, А.В. Живых, Е.С. Новоселов, А.А. Шабельникова, П.Б. Щетинин, А.Н. Никулин, В.И. Умников, И.Ю. Луговой, А.И. Долгов. – Москва, 2018. - 978 с.

10. Гостимский С.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, Ф.А. Коновалов // Генетика. - 2005. - № 4 (41). - С. 89-101.
11. Гостимский С.А. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. - 1999. - № 11 (35). - С. 37-45.
12. Грушецкая З.Е. Картирование локуса Cf-6 устойчивости к кладоспориозу томата с помощью SSR-маркеров / З. Е. Грушецкая, В. А. Лемеш, В. Д. Поликсенова, Л.В. Хотылева // Генетика. - 2007. - № 43. - С. 36 - 54.
13. Джалилов Ф.С. Бактериальные болезни капусты (диагностика, патогенез, иммунитет, защитные мероприятия): автореф. дис. ... док. биол. наук. – М., 1996. – 32 с.
14. Джалилов Ф.С. Сосудистый бактериоз капусты / Ф.С. Джалилов // Защита и карантин растений. – 1999. - №4. – С. 43-44.
15. Дубина Е.В. ДНК-технологии (молекулярное маркирование) в селекции риса и семеноводстве овощных культур: дис. ... д-ра биол. наук. – 2019. – 275 с.
16. Дубина Е.В. Использование SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян сладкого перца / Е.В. Дубина, С.В. Королёва, С.В., Гаркуша // Достижения науки и техники АПК. – 2016 в. - Т. 30. - № 8. - С. 42-44
17. Дубина Е.В. Создание устойчивой к пирикулярриозу генплазмы риса с использованием технологий ДНК-маркирования / Е.В. Дубина, Ж.М. Мухина, Е.М. Харитонов, В.Н. Шиловский, Е.С. Харченко, Л.В. Есаулова, Н.Н. Коркина, Е.П. Максименко, И.Б. Никитина // Генетика. – 2015 а. – № 8 (51). – С. 881-886.
18. Зеленский Г.Л. Рис: биологические основы селекции и агротехники / Г.Л. Зеленский. – Краснодар: КубГАУ, 2016. – 238 с.

19. Игнатов А.Н. Изучение индуцированной и генетической устойчивости к сосудистому бактериозу у белокочанной капусты: автореф. ... канд. с-х. наук. - М.: – 1992. – 25 с.
20. Игнатов А.Н. Распространение возбудителей опасных бактериозов растений в Российской Федерации: реальность опережает прогноз / А.Н. Игнатов, А.М. Лазарев // В сб.: Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем. Материалы III Всероссийского съезда по защите растений 16–20 декабря 2013 г., Т.1. С.-Пб, - 2013. - С. 240–242.
21. Карлов Г.И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. - М., 2010. - 49 с.
22. Королева С.В. Иммунологическая оценка селекционного материала при создании гибридов F1 белокочанной капусты с групповой устойчивостью к фузариозу и сосудистому бактериозу (методические рекомендации) / С.В. Королева, С.А. Дякунчак, С.В. Ситников. – М., 2012. – 16 с.
23. Лазарев А.М. Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты / А.М. Лазарев, Е.Н. Мыслик, А.Н. Игнатов // Вестник защиты растений. - 2017. - № 1(91). - С. 52–55.
24. Лизгунова, Т.В. Капуста / Т.В. Лизгунова // Культурная флора СССР Т. 11. – Л.: Колос. – 1984. – 328 с.
25. Литвинов С.С. Овощеводство России и его научное обеспечение, состояние, приоритеты, перспективы / С.С. Литвинов. – М., 2003. –35 с.
26. Лобашев М.Е. Генетика. – Ленинград: издательство ленинградского университета, 1969. – 752 с.
27. Матвеева Т.В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз и др. // Экологическая генетика. - 2011. - Т. 9. - №1. - С. 32-43.

28. Монахос Г.Ф. Капуста пекинская. Биологические особенности, генетика, селекция и семеноводство. – М., 2009. – С. 98.
29. Монахос Г.Ф. Проявление симптомов сосудистого бактериоза у капустных растений с различными генами устойчивости в зависимости от концентрации инокулюма *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / Г.Ф. Монахос, Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1. - С. 26-34.
30. Монахос С.Г. Устойчивость капусты к сосудистому бактериозу // С.Г. Монахос, Н.В. Елышко // Картофель и овощи. – 2015. - №9. – С. 38-39.
31. Орынбаев А.Т. Усовершенствование приемов защиты капусты от сосудистого бактериоза: дис. ... канд. биол. наук. – 2019. – 150 с.
32. Поморцев А.А. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений / А.А. Поморцев, А.М. Кудрявцев, В.В. Упелниек, В.Г. Конарев В.Г. – 2004. – Электронный ресурс: <http://docs.cntd.ru/document/1200113117>.
33. Прохоров, И.А. Селекция и семеноводство овощных культур / И.А. Прохоров, А.В. Крючков, В.А. Комиссаров. – М.: Колос, 1997. – 480 с. 59
34. Путырский, И.Н. Капуста / И.Н. Путырский. – Ростов-на-Дону.: Феникс, 2004. – 96 с.
35. Рогачев Ю.Б. Оценка белокочанной капусты на комплексную устойчивость к киле и бактериозам: автореф. ... канд. с/х наук. - М.: ТСХА. – 1991. - 25 с.
36. Самохвалов А.Н. Методические рекомендации по ускоренной оценке и отбору исходного селекционного материала капусты на групповую устойчивость к киле и бактериозам / А.Н. Самохвалов, Ю.Б. Рогачев, А.Н. Игнатов. – М., 1995. – С.57.
37. Ситников С.В. Селекция гибридов F1 среднеспелой белокочанной капусты на устойчивость к *Xanthomonas campestris* pv.

campestris / С.В. Ситников, С.А. Дякунчак // Проблемы научного обеспечения овощеводства юга России. – 2009. – С. 160-164.

38. Смарагдов М. Г. Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции // Генетика. - 2009. - № 6 (45). - С. 1-4.

39. Студенцов О.В. Устойчивость коллекционных сортов капусты к сосудистому бактериозу в предгорной зоне Северного Кавказа / О.В. Студенцов, Н.Н. Петровская // Бюлл. ВНИИ растениеводства. – 1981. - № 11. – С. 45-48.

40. Супрун И.И. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях рис: дис....канд. биол. наук. – 2005. – 112 с.

41. Сухорукова Н.С. Методика оценки и селекционного отбора белокочанной капусты на устойчивость к сосудистому бактериозу / Автореф. дисс...канд. с.-х. наук. – М., 1987. – 16 с.

42. Фесенко И.А. Создание ДНК-маркера устойчивости томата к фузариозному увяданию / И.А. Фесенко, М.Ю. Куклев, Г.И. Карлов // Известия ТСХА. – № 1. – 2007. – С. 66-72.

43. Чесноков Ю.В. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса / Ю.В. Чесноков., В.М. Косолапов - М., 2016. -172 с.

44. Afrin K. S. Screening of Cabbage (*Brassica oleracea* L.) Germplasm for Resistance to Black Rot / K. S. Afrin, A. Rahim, Jong-In Park, S. Natarajan, M. H. Rubel, Hoy-Taek Kim, I. Nou // Plant breeding and biotechnology. – 2018. – 6 (1). – P. 30-43.

45. Alvarez A.M. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers / A.M. Alvarez, A.A. Benedict, C.Y. Mizumoto, J.E. Hunter, D.W. Gabriel // Phytopathology. – 1994. - Vol.84 (12). – P.1449-57.

46. Anderson E.M. Fusarium resistance in Wisconsin Hollander cabbage / E.M. Anderson // J. Agric. Res. – 1933. - № 47. – P. 639–661.

47. Arden S. Fusarium yellows of cabbage and related crops. Vegetable Crops. – 1979. - 730 p.
48. Armstrong G.M. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases / G.M. Armstrong, J.K. Armstrong. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA. – 1981. – P. 391–399.
49. Ashkenazi V. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses / V. Ashkenazi, E. Chani, U. Lavi, D. Levy, J. Hillel, R.E. Veileux // Genome. - 2001. - №44 (1). - P. 50-62.
50. Bazzi C. Seed-transmission of phytopathogenic bacteria / C. Bazzi // Petria. - 1991. - V. 1 (Suppl.1). - P. 19-30.
51. Berrocal-Lobo M. Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum* / M. Berrocal-Lobo, A. Molina // Trends Plant Sci. – 2007. - №13. – P. 145–150.
52. Blank L.M. Fusarium resistance in Wisconsin all seasons cabbage / L.M. Blank // J. Agric. Res. – 1937. - №55. – P. 407–510.
53. Booth C. The genus *Fusarium* / C. Booth CABI Publishing, UK. – 1971. – 237 P.
54. Bosland P.W. Sources of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, race 2 / P.W. Bosland, P.H. Williams // Hort. Science. -1987. - №22 (4). – P. 669–670.
55. Bosland P.W. Influence of soil temperature on the expression of yellows and wilt of crucifers by *Fusarium oxysporum* / P.W. Bosland, P.H. Williams, R.H. Morrison // Plant Dis. – 1988.- №72. – P.777–780.
56. Bosland P.W. Influence of soil temperature on the expression of yellows and wilt of crucifers by *Fusarium oxysporum* // P.W. Bosland, P.H. Williams, R.H. Morrison // Plant Dis. – 1988. - №72. - P.777–780.
57. Bradbury J.F. Guide to plant pathogenic bacteria / J.F. Bradbury. - Wallingford, UK. -C. CAB International, 1986. – 332 p.

58. Büscher N. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10 mer primers E. Zyprian, R. Blaich // *Vitis*. - 1993. - V. 32 - P. 37-71.
59. Butler J.M. Short Tandem Repeat DNA / NIST Standard Reference Database SRD 130 / J.M. Butler, D.J. Reeder // National Institute of Standards and Technology (NIST). – 2010. - P. 87-101.
60. Collard B.C.Y. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts / Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. // *Euphytica*. – 2005. - №142. – P. 169–196.
61. Cruz J. Assessment of Diversity *Xanthomonas campestris* Pathovars Affecting Cruciferous Plants in Portugal and Disclosure of two novel Xcc races. / J. Cruz, R. Tenreiro, L. Cruz // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 99. - № 2. - P. 403-414.
62. Dieffenbach C.W. General Concepts for PCR Primer Design / C.W. Dieffenbach, T.M. Lowe, G.S. Deksler // *Nucleic Acids Res.*- 1995. - V. 18.- P. 999-1005.
63. Dixon G.R. Vegetable brassicas and related crucifers. CABI Publishing, Wallingford. – 2007. – 327 p.
64. Dzhililov F.S. Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot / F.S. Djalilov, R.D. Tiwari // *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. -1995. - V. 29. - P. 383-386.
65. Fargier E. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. / E. Fargier, C. Manceau // *Plant Pathology*. – 2007. – Vol. 56. P. 805–818.
66. Farnham M.W., (2001) Characterization of fusarium yellows resistance in collard / Farnham M.W., A.P. Keinath, J.P. Smith // *Plant Dis.* - № 85. – P. 890–894.

67. Franken A. Application of polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds using immunofluorescence microscopy / A. Franken // Netherlands Journal of Plant Pathology. – 1992. – V. 98. – P. 95-106.
68. Garcia-Ochoa F. Xanthan gum: Production, recovery, and properties / F. Garcia-Ochoa, V.E. Santos, J.A. Casas, E. Gomez // Biotechnology Advances. – 2000. – V. 18. – P. 549–579.
69. Geiser D.M. A DNA sequence database for identifying *Fusarium* // Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi. Springer Netherlands. - 2004. - P. 473-479.
70. Goto M. Fundamentals of bacterial plant pathology / M. Goto // San Diego, USA. Academic Press Inc. - 1992.
71. Ignatov A. Variation of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Japan / A. Ignatov, Y. Kuginuki, I. Kobayashi, H. Masuda, K. Yamada, K. Hida // J. J. Hort. Society. - 1997. – B.4 (Suppl.1). - C. 67-68.
72. Jensen B.D. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. / B.D. Jensen, J.G. Vicente, H.K. Manandhar, S.J. Roberts // Plant Disease. – 2010. – Vol. 94. - №3. - P. 298–305.
73. Kamoun S. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: Role of the *hrpX* locus / S. Kamoun, H.V. Kamdar, E. Tola, C.I. Kado, // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1992. - Vol. 5. - P. 22–33.
74. Keinath A.P. Reactions of 26 cultivars of Brassica oleracea to yellows in naturally infested soil / Keinath A.P., Farnham M.W., Smith P. // Biol. Cult. Tests. – 1998. – №13. –155 p.
75. Kifuji Y. QTL analysis of black rot resistance in cabbage using newly developed EST-SNP markers / Y. Kifuji, H. Hanzawa, Y. Terasawa, T. Nishio // Euphytica. – 2013. – V. 190. P. 289-295.

76. Liu X. Rapid Introgression of the Fusarium Wilt Resistance Gene into an Elite Cabbage Line through the Combined Application of a Microspore Culture, Genome Background Analysis, and Disease Resistance-Specific Marker Assisted Foreground Selection / Xing Liu, F. Han, Congcong Kong, Z. Fang, Limei Yang, Yang-yong Zhang, M. Zhuang, Yumei Liu, Zhansheng Li, H. Lv // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – 11 p.

77. Lv H. Development of InDel markers linked to Fusarium wilt resistance in cabbage / H. Lv, Li-mei Yang, Jun-gen Kang, QingBiao Wang, Xiaowu Wang, Z. Fang, Yumei Liu, M. Zhuang, Yang-yong Zhang, Yan Lin, Yu-Hong Yang, B. Xie, B. Liu, Ji-sheng Liu // *Molecular Breeding*. – 2013. – V. 32. – P. 961–967.

78. Lv H. Mapping and analysis of a novel candidate Fusarium wilt resistance gene FOC1 in Brassica oleracea / H. Lv, Z. Fang, L. Yang, Y. Zhang, Q. Wang, Y. Liu // *BMC Genomics*. – 2014a. – №15 (1094). – 10 p.

79. Lv H. Research on screening of resistant resources to Fusarium wilt and inheritance of the resistant gene in cabbage / Lv H., Fang Z., Yang L., Xie B., Liu Y., Zhuang M., Zhang Y., Yang Y. // *Acta Horticult. Sinica*. - 2011. -№ 38(5). – P. 875–885.

80. 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.

81. 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.

82. Matsumoto T.T. Crucifers. Seed field phytosanitary certification training aid and plant pathological study notes for significant seed-borne diseases / T.T. Matsumoto // State of California, Department of Food and Agriculture. Division of Plant Industry Exclusion and Detection. CRR-C-1-2. - 1975.

83. Morrison R.H. First report of race 2 of cabbage yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in Texas / R.H. Morrison, A. Mengistu, P.H. Williams // *Plant Dis.* – 1994. - №78 (6). – 614 p.
84. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // *Nucleic Acids Research.* – 1980. – V. 10. – P. 4321-4325.
85. Pu Z. Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene in *Brassica oleracea* / Z. Pu, M. Shimizu, Yanju Zhang, T. Nagaoka, Takeshi Hayashi, H. Hori, S. Matsumoto, R. Fujimoto, K. Okazaki // *Molecular breeding.* – 2012. №30. – P. 809-818.
86. Ramirez-Villupadua J. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage with type A resistance / J. Ramirez-Villupadua, R.M. Endo, P. Bosland, P.H. Williams // *Plant Dis.* – 1985. -№69. – P. 612-613.
87. Saddler, G.S. Order III: Xanthomonadales ord. nov. / G.S. Saddler, J.F. Bradbury. - *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.* Springer, Boston, MA, 2005. – P. 63-122.
88. Schaad N.W. Black rot of crucifers in Thailand / N.W. Schaad, N. Thaveechai // *Plant Disease* -1983. - Vol. 67(11). - P.1231-1234.
89. Schaad N.W. Cruciferous weeds sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers / N.W. Schaad, J.C. Kianese // *Phytopathology.* - 1981. - Vol. 71. - № 11. - P. 1215-1220.
90. Schaad N.W. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil / N.W. Schaad, W.C. White // *Phytopathology.* - 1974. - V. 64. - №12. - P.1518-1520.
91. Snyder W.C. The species concept in *Fusarium* / W.C. Snyder, H.N. Hansen // *Am. J. Bot.* – 1940. - №27. P. 64–67.
92. Strandberg J. Spatial distribution of cabbage black rot and the estimation of diseased plant populations / J. Strandberg // *Phytopathology.* – 1973. - V. 63. - № 8. - P.998-1003.

93. Tatjana P. Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* strains isolated from cabbage, kale and broccoli / P. Tatjana, J. Dragana, S. Mira P. Milovanovic, N. Dolovac, D. Postic, S. Stankovic // Arch. Biol. Sci., Belgrade. – 2013. – V. 65. - № 2. – P. 585-593.
94. Taylor J.D. Sources and Origin of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica Genomes / J.D. Taylor, J. Conway, S.J. Roberts, D. Astley, J.G. Vicente // Phytopathology – 2002. - Vol. 92. - P.105–111.
95. Tonu N.N. Comparison of Positions of QTLs Conferring Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica oleracea. / N.N. Tonu, M.A. Doullah, M. Shimizu, M.M. Karim, T. Kawanabe, R. Fujimoto // Am. J. of Plant Sci - 2013. - № 4. P. 11-20.
96. Tsygankova S.V. Genetic intraspecies relationships in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers / S.V. Tsygankova, A.N. Ignatov, E.S. Boulygina, B.B. Kuznetsov, E.V. Korotkov // European J. Plant Pathol. - 2004. - Vol.110. - P. 845-853.
97. Vali U. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations / U. Vali, M. Brandstrom, M. Johansson, H. Ellegren // BMC Genetic. – 2008. - №9. - 8 p.
98. Vicente J.G. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops / J.G. Vicente, E.B. Holub // Molecular Plant Pathology. – 2013. - № 1 (14). - P. 2-18.
99. Walker J.C. Cauliflower, cabbage, and others. In: Stefferud A (ed) Plant diseases. US Dept Agric, Washington, DC. – 1953. – P. 425–430.
100. Walker J.C. Development of three mid-season varieties of cabbage resistant to yellows (*Fusarium conglutinans* Woll.) / J.C. Walker, J. Jr. Monteith, F.L.Wellman // J. Agric. Res. – 1927. - № 35. – P. 785–810.

101. Walker J.C. Effect of environmental factors upon the resistance of cabbage to yellows. / Walker J.C., Smith R. // J. Agric. Res. – 1930. - № 41. – P.1–15.
102. Walker J.C. Fusarium resistant Danish Ballhead cabbage / J.C. Walker, L.M. Blank // J. Agric. Res. -1934. - №49. P. 983–989.
103. Walker J.C. Inheritance of fusarium resistance in cabbage /J.C. Walker // J. Agric. Res. -1930. - №40. P. 721–745.
104. Walker J.C. Plant nutrition in relation to disease development. I. Cabbage yellows / J.C. Walker, W.J. Hooker // Am. J. Bot. - № 32. – 1945. – P. 314–320.
105. Williams P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers / Plant disease. –1980. – №64 (8). – P. 736-742.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

УТВЕРЖДАЮ:

И.о. директора ФГБНУ «ФНЦ риса»,

И.А. Корр. РАН, д.с.-х.н., профессор



С.В. Гаркуша

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждаю, что в 2021 году в отдел овощекartoфелеводства передано 15 образцов F₂ капусты белокочанной с генами устойчивости к сосудистому бактериозу, полученные в рамках аспирантской программы «Молекулярное маркирование в селекции *Brassica oleracea* L. на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу».

Зав. отделом овощекartoфелеводства
ФГБНУ «ФНЦ риса», канд. с.-х. наук

С.В. Королева