

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА ГЕНА
УСТОЙЧИВОСТИ К КИЛЕ (*PLASMODIOPHORA BRASSICAE* WORJ)
В СЕЛЕКЦИИ КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ (*BRASSICA RAPA* L.)

С.Г. МОНАХОС, А.Н. ИГНАТОВ *

(Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева)

На основе RAPD маркера одного из генов устойчивости к киле (RA12-75A) у *Brassica rapa* L. разработан ко-доминантный маркер SCARp91F-SCARp636R, пригодный для дифференциации устойчивых и восприимчивых генотипов в популяциях, полученных от скрещивания линий европейской репы и капусты пекинской. Вместе с тем выявлена неэффективность как RAPD маркера RA12-75A, так и созданного на его основе ко-доминантного маркера SCARp91F-SCARp636R при идентификации устойчивых растений в популяциях, полученных от скрещивания устойчивой и восприимчивой к киле репы.

Кила крестоцветных (возбудитель — *Plasmodiophora brassicae* Wor.) — одно из наиболее вредоносных заболеваний всех видов семейства Капустные, включая *Brassica rapa* L. [3]. Патоген поражает корневую систему растений, вызывая разрастание паренхимной ткани корней и образование «желваков» [9]. Пораженные корни не справляются с поглощением воды и питательных веществ из почвы, что приводит к увяданию, задержке роста и в конечном итоге к гибели растения [1].

Агротехнические приемы: внесение в почву кальция, бора и известкование, способствующие увеличению pH, снижают заболеваемость, но их все равно недостаточно для получения полноценного урожая [14]. Борьба с килой с помощью многопольных севооборотов неэффективна из-за длительного сохранения в почве спор, а также увеличения их числа вследствие размножения на крестоцветных сорняках. Применение пестицидов ограничено из-за отсутствия экономически доступного и экологически безвредного фунгицида для внесения в почву [7]. Наиболее

целесообразным способом борьбы с килой крестоцветных является выведение и возделывание устойчивых сортов и гибридов.

В селекции капусты пекинской на устойчивость к киле крестоцветных, как правило, используют европейские кормовые репы (European fodder turnips) [5, 15, 10], устойчивость которых контролируется 3 доминантными независимо наследуемыми генами [12, 4].

По сведениям японских исследователей, устойчивость, определяемая отдельными генами, при интродукции в капусту пекинскую частично или полностью преодолевается патогеном [10], и большинство выведенных сортов при неоднократном возделывании на одном участке со временем становятся восприимчивыми. Для решения этой проблемы и обеспечения надежной защиты растений необходимо объединение всех 3 генов в одном генотипе, что реально выполнимо только при использовании молекулярных маркеров [11, 8].

Первые результаты по маркированию представлены в [11]. В дигиплоид-

* Центр «Биоинженерия» РАН.

ных популяциях, полученных из F_1 потомства от скрещивания устойчивой линии кормовой репы и восприимчивой капусты пекинской, были найдены 3 RAPD маркера, связанные с генами устойчивости к киле. В Центре «Биоинженерия» РАН на популяциях BC₁ и F_2 от скрещивания устойчивой репы и восприимчивой капусты пекинской была подтверждена эффективность и соответственно пригодность для селекции одного из предложенных маркеров (RA12-75A₆₅₀). Однако некоторые недостатки RAPD технологии, такие как низкие стабильность и воспроизводимость результатов, а также типично доминантная природа маркера, не позволяющая выявлять гетерозиготы, ограничивают ее эффективность при использовании в селекции. Для решения этой проблемы на основе RAPD маркеров разрабатывают лишённые этих недостатков SCAR (sequence characterized amplified region) маркеры.

Цель работы — изучить возможность конвертирования RAPD маркера RA12-75₆₅₀ доминантного гена устойчивости к киле в соответствующий доминантный / ко-доминантный SCAR маркер и оценить его эффективность на различных популяциях пекинской капусты и репы.

Материалы и методы

Растительный материал. Размножение растений и оценка устойчивости к киле крестоцветных были проведены на Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева МСХА в зимней остекленной теплице; молекулярный анализ — в Центре «Биоинженерия» РАН в лаборатории «Генома растений» в 2002-2004 гг.

В качестве донора генов устойчивости к киле использовали растения линии ECD04-1, полученной в результате 2 циклов самоопыления европейской линии-дифференциатора ECD04; в качестве донора аллелей восприимчивости — растения линии JRT1-1, отобранной из потомства 2-го инбредного поколения азиатской репы Just Right

Turnip, и растения инбредной линии капусты пекинской Се-3, полученной из сорта зарубежной селекции «Sensor».

Оценка устойчивости / восприимчивости к киле. Оценку устойчивости к киле проводили на искусственном инфекционном фоне. Индекс расового состава использованной полевой популяции патогена определяли в соответствии с реакцией европейских сортов-дифференциаторов (ЕСД) [6] — 16/11/31. Для заражения использовали суспензию спор с концентрацией 10^7 спор/мл.

Посев проводили в кассеты, на глубину 0,5 см с немедленным внесением суспензии спор килы, используя модификацию пипеточного метода [13]. Учет устойчивости растений проводили через 6 недель. За устойчивое принимали растение без малейших признаков поражения килей.

Молекулярный анализ. Выделение геномной ДНК проводили из молодых тканей по методике [2]. Амплификацию геномной ДНК проводили на амплификаторе ABS-2000 (Applied Biosystems) в 15 мкл реакционной смеси, содержащей буфер (67 мМ трис-HCl pH-8,8; 166 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,5 мМ MgCl₂; 0,01% Твин-20), по 0,2 мМ каждого dNTP, 5-15 пМ соответствующего праймера(ов), 20 нг геномной ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы; праймер RA12-75 — 5' -CATGATGCGGGC-3'. RAPD амплификацию проводили по следующей программе: 3 мин при 94°C; 35 циклов: 94°C — 30 с, 36°C — 30 с, 72°C — 1 мин; 72°C — 10 мин. SCAR амплификацию — 3 мин при 94°C; 35 циклов: 94°C — 15 с, 64°C — 15 с, 72°C — 1 мин; 72°C — 5 мин.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, и трис-ацетат-ЭДТА электрофорезном буфере (RAPD при напряженности 4 Вт/см в течение 120 мин; SCAR при напряженности 6 Вт/см в течение 30 мин). Целевой фрагмент RAPD маркера ре-амплифицировали и

элюировали из геля легкоплавкой агарозы. Клонирование RAPD фрагмента проводили с помощью набора pGEM_T Vector System 1 («Promega», USA) согласно инструкции фирмы производителя. Полученными препаратами плазмидной ДНК проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli*. Рекомбинантные клоны отбирали методом «белоголубой» селекции. Отобранные клоны размножали с последующим выделением плазмидной ДНК.

После проведения ПЦР (амплификация ДНК-клонов с праймером RA12-75) и рестрикционного (разрезание плазмид по сайтам рестрикции, фланкирующим вставку с 2 концов) анализа плазмид на наличие вставки целевого фрагмента его секвенировали с помощью автоматического секвенатора 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Co., USA). Полученную последовательность фрагмента ДНК проверили на сходство с известными последовательностями в базе данных Генбанка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Подбор специфичных праймеров проводили с использованием программы OLIGO 6.1 (Molecular Biology Insights, Cascade, USA).

Результаты

В результате проведенной RAPD амплификации с использованием праймера RA12-75 выявлено отсутствие полиморфизма по целевому фрагменту массой 650 п.н. между устойчивой европейской (ECD04-1) и восприимчивой азиатской (JRT1-1) репами, в то же время проявляется четкий полиморфизм по маркерному локусу между линиями устойчивой репы ECD04-1 и восприимчивой капусты пекинской Се-3 (рис. 1).

RAPD маркер RA12-7 5₆₅₀, сцепленный с признаком устойчивости к киле, был амплифицирован, разделен от других амплифицированных фрагментов в агарозном геле и выделен для клонирования.

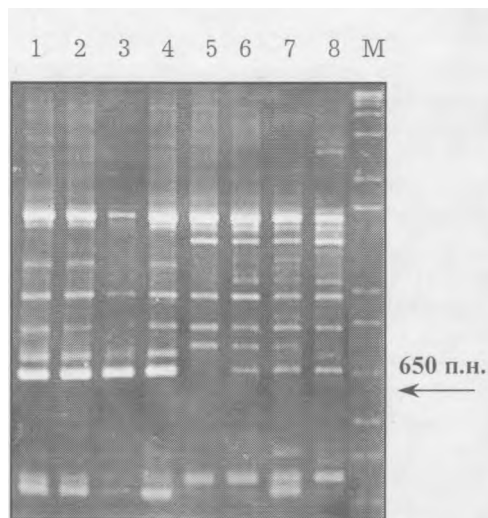


Рис. 1. RAPD фрагмент (650 п.н.), амплифицированный с праймером RA12-75 (5'-CATTATGCGGGC-3'), сцепленный с геном устойчивости к киле. 1-4 — устойчивые образцы репы ECD04-1, 5-8 — восприимчивые образцы пекинской капусты Се-3, М — маркер молекулярной массы

Данный фрагмент был клонирован и секвенирован. Сравнение секвенированной последовательности локуса RA12 - 7 5₆₅₀ с базой данных Генбанка показало, что данная последовательность с 5'-конца представлена фрагментом, гомологичным участку клона T24I21 хромосомы 2 *Arabidopsis thaliana*.

В то же время 3'-конец локуса RA12 - 7 5₆₅₀ состоял из 2 вырожденных повторов, сходных с фрагментом клона AJ_245480 *B.napus*, кодирующим S-аденозил метионин салициловой кислоты карбоксил метионил трансферазу и ген гликопротеина S-локуса, фланкированными с 3'-конца участком LTR ретротранспозона.

На основе известной последовательности RAPD-локуса RA12 - 7 5₆₅₀ были разработаны 6 специфичных праймеров: 3 прямых — SCARp1F, SCARp50F, SCARp91F и 3 обратных — SCARp406R, SCARp463R, SCARp636R (таблица).

Возможные комбинации синтезированных SCAR праймеров показали раз-

**Специфичные к RAPD-локусу RA12-75₆₅₀ праймеры,
использованные в данном исследовании**

Праймер	5'-3' последовательность
>SCARp1F	GGA TCC ATT ATG CGG GCA GTT AG
>SCARp50F	CTA GTT AAA TGG CTC TGC GGT TG
>SCARp91F	GAG CTT GAT CTG CTG CCA TCG G
>SCARp406R	CAC GCG ATG AAT ATG ATC CTT AG
>SCARp463R	GGA TTG GGA GGT ATG TGG TAG AG
>SCARp636R	ATG CGG GCC AGC CAA TTA GGC

личную эффективность при идентификации восприимчивых (Се-3) и устойчивых (ECD04-1) генотипов (рис. 2).

Две пары специфичных праймеров SCARp91F — SCARp636R и SCARp50F —

SCARp636R при оптимизированных условиях ПЦП дали ко-доминантные фрагменты, выявляющие как восприимчивый, так и устойчивый генотипы (рис. 2).

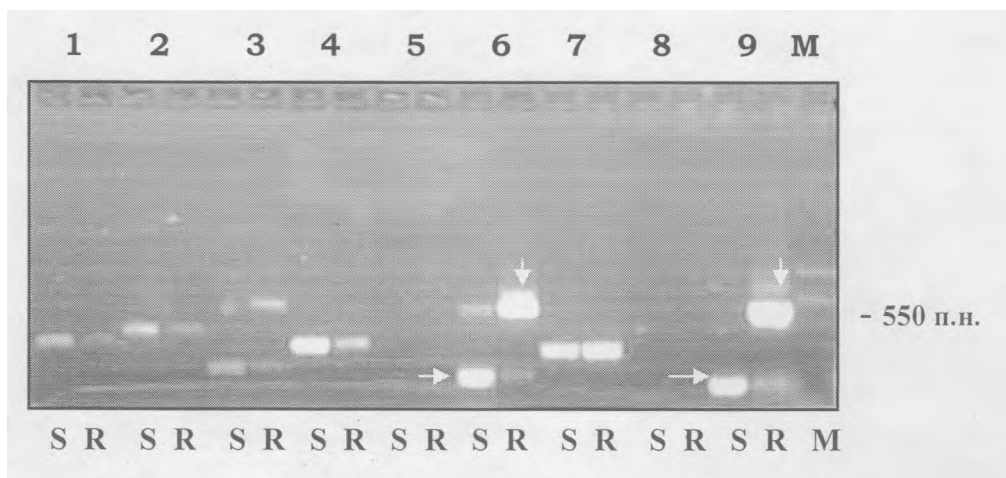


Рис. 2. SCAR фрагменты, полученные в результате амплификации S-восприимчивых (Се-3) и R-устойчивых (ECD04-1) образцов с различными комбинациями праймеров: 1 — SCARp1f-SCARp406r; 2 — SCARp1f-SCARp463r; 3 — SCARp1f-SCARp636r; 4 — SCARp50f-SCARp406r; 5 — SCARp50f-SCARp463r; —SCARp50f - SCARp636r; 7—SCARp91 f-SCARp406r; 8 — SCARp91f-SCARp463r, 9 — SCARp91f-SCARp636r; 6 и 9 — комбинации, давшие ко-доминантные фрагменты, выявляющие устойчивые (вертикальные стрелки) и восприимчивые (горизонтальные стрелки) генотипы; M — маркер молекулярной массы

Ко-доминантная природа полученных маркеров, необычная для SCAR, была обусловлена наличием 2 вырожженных повторов на 3'-конце целевого фрагмента у устойчивого генотипа (репы) и 1 — у восприимчивого генотипа (пекинской капусты).

Испытание синтезированных специфичных праймеров показало, что один

из маркеров (комбинация SCARp91F-SCARp636R) позволяет четко различать генотипы устойчивых образцов европейской репы ECD04-1 от генотипов восприимчивых образцов капусты пекинской Се-3, но является неэффективным при анализе устойчивости в популяциях азиатской репы JRT1-1 (рис. 3).

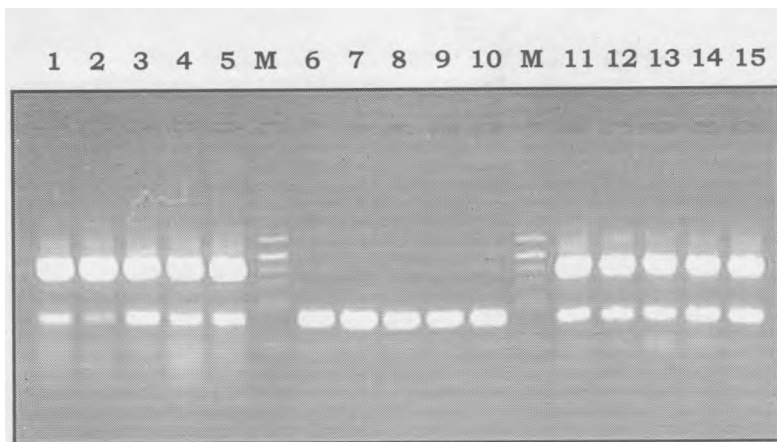


Рис. 3. Эффективность комбинации SCARp91F — SCARp636R при различении устойчивых и восприимчивых генотипов: 1-5 — образцы устойчивой линии ECD04-1; 6-10 — образцы восприимчивой линии Се-3; 11-15 — образцы восприимчивой линии JRT1-1; М — маркер молекулярной массы

Выводы

1. Разработанный ко-доминантный SCAR маркер одного из генов устойчивости к киле эффективен при идентификации устойчивого и восприимчивого генотипов в популяциях от скрещивания восприимчивой капусты пекинской с устойчивой репой, однако непригоден для анализа потомств от скрещивания европейской (ECD04-1) и азиатской (JRT1-1) реп.

2. Данный маркер может быть использован при поиске маркеров к двум другим генам устойчивости к киле у *Brassica rapa* L.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов Ю.П. Сократить потери от килы // Защита растений, 1984. № 9. — 2. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Молекулярная генетика, 1997. Т. 33. №4. С. 443-450. — 3. Кравченко В.И., Боос Г.В., Сурмава М.Е. Характеристика генофонда капусты по устойчивости к *Plasmiodiophora brassicae* // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1982. Т. 72. Вып. 3. С. 113-120. — 4. Монахос Г.Ф., Теренина Н.С. Генетические источники устой-

чивости к киле крестоцветных (*Plasmiodiophora brassicae* Wor.) при селекции пекинской капусты / Изв. ТСХА, 1998. Вып. 3. С. 87-93. — 5. Ashikawa M., Yoshikawa H., Hida K. // Bull. of the Veg. and Orn. Crop Res. St. 1980. P. 35-73. — 6. Buczacki S., Toxopeus H., Mattusch P. et al. // Trans. Br. mycol. Soc., 1975. P. 295-303. — 7. Crisp P., Crute I.R., Sutherland R.A., et al. // Euphytica, 1989. 42. P. 215-226. — 8. Hirai M., Harada T., Kubo N. et al. // Theor. Appl. Genet., 108, 2004. P. 639-643. — 9. Ikegami H., Ito T., Imuro Y. et al. / N.S. Talekar, T.D. Griggs (Eds), Chinese cabbage. Asian Vegetable Research and Development Center, Tainan, 1981. P. 81-90. — 10. Kuginuki Y., Yoshikawa H., Hida K. // ISHS Symposium on Brassicas, Abstracts of 9 th Crucifers genetics workshop. Lisbon, 1994. — 11. Kuginuki Y., Ajisaka H., Yui M. et al. // Euphytica. 1997. P. 149-154. — 12. Toxopeus H., Janssen A. // Euphytica, 24. 1975. P. 751-755. — 13. Voorrips R.E., Visser D.L. // Neth. J. Pl. Pathol. 99, 1993. P. 269-276. — 14. Voorrips R.E. // Euphytica, 1995. V. 83. P. 139-146. — 15. Yoshikawa H. / N.S. Talekar, T.D. Griggs (Eds.), Chinese Cabbage. Proceedings of the 1st International Symposium, Tsukuba, Japan. 1981. P. 405-413.

SUMMARY

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker RA12-75A linked to a clubroot-resistance locus of *Brassica rapa* L. was converted into co-dominant marker SCARp91F-SCARp636R useful for differentiation of susceptible and resistant genotypes in populations from cross of lines of European turnip (ECD04-1 — donor of resistance genes) and Chinese cabbage. But ineffectiveness both RAPD locus RA12-75A and the developed SCARp91F-SCARp636R marker, was shown for hybrid population obtained from resistant and susceptible plants of turnip.