

УДК 635-2:632.9:575.113

СЕЛЕКЦИОННАЯ ЦЕННОСТЬ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ
К КИЛЕ ЛИНИЙ *BRASSICA RAPA* L. И ЭФФЕКТИВНОСТЬ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ КАРТИРОВАННЫХ ЛОКУСОВ

С.Г. МОНАХОС, М.Л. НГУЕН

(РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева)

На коллекции инбредных линий капусты пекинской (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) и линиях европейской кормовой репы (*B. rapa* ssp. *rapifera*) проведено детальное изучение наследования устойчивости к киле капустных. Проведена оценка эффективности известных молекулярных маркеров генов устойчивости к киле для практической селекции. Показано, что устойчивость к киле линий турнепса ЕСД04-05 и ЕСД04-10 с высокой вероятностью определяется тремя независимо наследуемыми дупликатными генами, два из которых доминантные и один с неполным доминированием. Проведена дифференциация линий капусты пекинской по эффективности генов устойчивости к киле, наследуемых по типу доминирования или неполного доминирования.

Ключевые слова: ген, кила, *P. brassicae* Йог., устойчивость, молекулярный маркер, капуста пекинская, турнепс, *B. rapa*.

Кила, вызываемая облигатным паразитом *Plasmodiophora brassicae* Wor., — вредоносное заболевание всех видов семейства Капустные, включая дикорастущие [1, 2]. В настоящее время существует ряд агротехнических приемов, позволяющих контролировать вредоносность и распространение возбудителя килы. Однако наиболее эффективным и экологически безопасным является селекция и возделывание устойчивых сортов и гибридов.

Капуста пекинская по природе является высоковосприимчивой к данному заболеванию, поэтому селекция устойчивых форм была и остается трудновыполнимой задачей. Несколько селекционных программ, реализованных в мире, в том числе и в России, позволили создать коммерческие устойчивые сорта и гибриды. Генетическим источником устойчивости к киле является европейская кормовая репа (*B. rapa* ssp. *rapifera*) [3, 10, 15, 26]. Ее гены являются наиболее эффективными и широко-используемыми в селекции на устойчивость различных капустных культур. Устойчивость к *P. brassicae* Wor. из турнепса передана в капусту пекинскую, рапс и *B. oleracea*.

Изучение генетики устойчивости европейских турнепсов к киле показало наличие не менее трех независимо наследуемых генов, определяющих устойчивость к различным патотипам *P. brassicae* [4, 7, 23, 25]. Большинство кормовых реп в своих генотипах несут более одного гена устойчивости, однако устойчивые сорта капусты пекинской, созданные с их использованием, содержат главным образом один ген, имеющий распецифическую реакцию.

Устойчивость, определяемая отдельными генами, при интродукции в капусту пекинскую теряет свою эффективность, частично или полностью преодолевается патогеном [13], и большинство выведенных сортов при неоднократном возделывании на одном участке со временем становятся восприимчивыми [10]. Предполагаемых причин утраты или снижения устойчивости растений несколько: высокая гетерогенность полевых популяций *P. brctssicte* и изменчивость их патогенности [11, 14], обуславливающих постепенное накопление вирулентных рас возбудителя при бесменном выращивании устойчивых сортов; снижение эффективности действия гена устойчивости в новом генетическом окружении; снижение дозы гена в гетерозиготе. К перечисленным причинам следует также добавить различную эффективность отдельных генов турнепса, передаваемых в капусту пекинскую.

Проблему снижения устойчивости и обеспечения надежной защиты растений предложено решать путем объединения нескольких генов в одном генотипе с использованием молекулярных маркеров [10, 13]. При этом целесообразно «пирамидировать» наиболее эффективные гены устойчивости.

Японскими и корейскими исследователями разработано около 30 различных RAPD-, RFLP-, SSR-, STS-маркеров на гены устойчивости *B. rapa* L. Характеристика молекулярных маркеров и локусов устойчивости представлена в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Молекулярные маркеры картированных локусов устойчивости к киле *B. rapa* L.

Таксономическая принадлежность*	Локус	Группа сцепления	Фланкирующие маркеры	Автор
<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	<i>Crr1</i>	A8	CRS 1 — CRS 2 (WE22B), CRS 3 — CRS 4 (WE49B)	Kikuchi et al., 1999; Kuginuki et al., 1997
	<i>Cra</i>	A3	HC352b-SCAR (F16-R13)	Hayashida et al., 2008
			E49 ₃₈₀	Matsumoto et al., 2005
	<i>CRb</i>	A3	TCR02, TCR05, TCR08, TCR09, TCR10	Piao et al., 2004
	<i>CRc</i>	A2	E14M3-02, E15M4-006	Sakamoto et al., 2008
			m6R	Sakamoto et al., 2008
<i>CRk</i>	A3	HC688, OPC11 2S	Sakamoto et al., 2008	
<i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	<i>Crr1</i>	A8	CRS 10 — CRS 11 (RA12 75)	Kikuchi et al., 1999; Kuginuki et al., 1997
			BRMS 088, BRMS 297	Suwabe et al., 2003, 2006
	<i>Crr2</i>	A1	BRMS 096, BRMS 100	Suwabe et al., 2003, 2006
	<i>Crr3</i>	A3	OPC11 1S, OPC11 2S; BrSTS 33, BrSTS 78, TCR05R	Hirai et al., 2004; Saito et al., 2006
	<i>Crr4</i>	A6	BN288D, WE24-1	Suwabe et al., 2003, 2006

* Таксономическая принадлежность донора гена устойчивости.

Авторы разработанных ДНК-маркеров отмечают возможность использования предлагаемых молекулярных маркеров в маркер опосредованном отборе при реализации селекционных программ, при этом так же отмечают, что данные маркеры могут быть мономорфными в конкретных селекционных популяциях [5, 9, 19]. Кроме того, оценка эффективности данных маркеров в практической селекции на устойчивость не проводилась [16].

В данной работе охарактеризовано проявление устойчивости в коллекции линий капусты пекинской, созданной с участием различных доноров устойчивости; показаны особенности наследования и проявления устойчивости к киле у донора устойчивости кормовой репы. Показана низкая эффективность четырнадцати опубликованных молекулярных маркеров картированных локусов устойчивости к киле на устойчивых и восприимчивых линиях капусты пекинской и турнепса и их расщепляющихся популяциях.

Материалы и методы

Генетический анализ устойчивости. В гибридологическом анализе использовали устойчивые к киле инбредные линии европейского турнепса (*B. z. rapa* ssp. *rapifera*) — ECD04-05, ECD04-10. Доноры устойчивости из европейской системы дифференциаторов рас килы скрещивали с восприимчивой к киле инбредной линией капусты пекинской (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) Кит1-3с15.

Линии капусты пекинской (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) 20-2сс1, ТПВ1-1(8)11, 20-3Се2 и Кн70 высокой степени инбридинга, несущие гены устойчивости к киле из европейских турнепсов, скрещивали с восприимчивыми к киле чистыми линиями капусты пекинской (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) ЕС-1 и Кит1-3с15.

В качестве контроля восприимчивости к киле использовали F1 гибриды капусты пекинской Старко и Мирако (Bejo Zaden), в качестве контроля устойчивости к киле — устойчивые к киле гибриды Ника F1 и Гидра F1 (ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»). Подготовку растений и скрещивание устойчивых и восприимчивых к киле генотипов капусты пекинской и турнепса для получения потомств F1, BC1 и F2 проводили в контролируемых условиях защищенного грунта.

Оценка устойчивости к киле на инфекционном фоне. Анализ устойчивости/восприимчивости растений проводили на искусственном инфекционном фоне с применением модифицированного пипеточного метода [3, 24]. Желваки нескольких сильно пораженных растений, хранившиеся в холодильной камере при температуре -18 °С, измельчали до гомогенного состояния и разводили в воде, полученную суспензию спор фильтровали через четырехслойную марлю; определяли концентрацию спор с использованием камеры Горяева и разведением чистой водой доводили до 10⁷ спор/мл. В ячейки кассет с 4-5-дневными сеянцами добавляли 5 мл рабочей суспензии инокулюма. Индекс расового состава использованной полевой популяции патогена в соответствии с реакцией европейских сортов-дифференциаторов — 16/11/31. Через 40 дней после заражения отмывали в воде корневую систему каждого растения и проводили оценку реакции устойчивости/восприимчивости по четырехбалльной шкале [6] (рис. 1).



Рис. 1. Шкала симптомов поражения килой: 0 баллов — нет поражения; 1 балл — некрупные опухоли на боковых корнях; 2 балла — сильное поражение боковых корней и слабое поражение главного корня; 3 балла — сильное поражение главного и боковых корней (по Buczacki et al., 1975) (фото С.Г Монахов)

Растения с 0-1 баллами принимали за устойчивые, растения с 2-3 баллами — за восприимчивые. Статистическую обработку данных генетического анализа проводили с использованием критерия χ^2 .

Молекулярный анализ. *Выделение ДНК* проводили из молодых тканей растений или проростков капусты пекинской согласно цетил-три-метил-аммоний-бромид (ЦТАБ) методике [17] с незначительными модификациями.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартному для SSR-, STS-маркеров протоколу, в 15 мкл реакционной смеси, включая 1 x буфер, 0,2 мМ смеси dNTP, 1,5 мкМ прямого и обратного праймера, 0,25 ед. Taq ДНК-полимеразы, 20 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация 92 °С 3 мин; далее 35 циклов — денатурация 92 °С 30 с, отжиг согласно условиям оригинальной публикации 40-66 °С (для RAPD маркеров 38 °С) 30-60 с, элонгация 72 °С 1,5 мин; завершающая элонгация 72 °С 7 мин; хранение 10 °С. При существенном различии рекомендуемых условий амплификации от стандартного протокола применяли авторские.

Продукты амплификации окрашивали флуоресцентным красителем, бромистым этидием, и разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле при напряженности 4 Вт/см.

Молекулярные маркеры. В молекулярном анализе использовали маркеры, сцепленные с шестью локусами *Crr1*, *Crr2*, *Cz23*, *CRa*, *CRb*, *CRc* устойчивости к киле. Краткая характеристика маркеров представлена в таблице 2.

Оценку эффективности молекулярных маркеров на селекционных популяциях проводили с использованием смесей ДНК 10 растений устойчивых 20-2cc1 и восприимчивых Кит1-3с15, ЕС-1 линий капусты пекинской и устойчивого турнепса ЕСД04-10, а также смесей ДНК растений F1 гибридных популяций Кит 1-3с 15 / ЕСД04-10 и ЕС-1х20-2cc1, устойчивых и восприимчивых растений беккроссных потомств от скрещивания с восприимчивым родителем ВС1S [(Кит1-3с15хЕСД04-10)1 х Кит1-3с15] и ВС1S [(ЕС-1х20-2cc1)1 х ЕС-1].

Таблица 2

Наименование, последовательности нуклеотидов
и характеристика использованных в анализе молекулярных маркеров
картированных локусов устойчивости к киле *B. gaza*

№	Локус	Наименование маркера	5'-3' последовательность	Размер, пн ³ / Т отж. ⁴ , °С	Автор
1	Crr1	CRS 10 - CRS 11 (RA12 75)	F ¹ GCTTGATCTGCTGCCATCGG	~620/64-66	Kikuchi et al., 1999
			R ² ATGCGGGCCAGCCAATTAGG		
2	Crr1	SCARp91F-SCARp636R	F GAGCTTGATCTGCTGCCATCGG	545/55	Монахов, Игнатов, 2007
			R ATGCGGGCCAGCCAATTAGGC		
3	CRb	TCR05	F AGAATCATGACCGGGGAAAT	279/62	Piao et al., 2004
			R GCAGCTAAGTCATCGACCAA		
4	CRb	TCR10	F AACTCTTGAAGAAAGCAAAGAAGC	170/58	Piao et al., 2004
			R GCAGGAATAAGAAGGAACACCA		
5	Crr1	BRMS 088	F TATCGGTTACTGATTCGCTCTTCAAC	263/233/60	Suwabe et al., 2003; Suwabe et al., 2006
			R ATCGGTTGTTATTTGAGAGCAGATT		
6	Crr1	BRMS 297	F AAACCTCAAAAACCTCCACTTTCTCG	-/-/55(60)	Suwabe et al., 2003; Suwabe et al., 2006
			R ATGTGGAGGTGGGACCCATTA		
7	Crr2	BRMS 100	F CTCTTGAGAATCAGAGAGAGATTAC	113/123/55(60)	Suwabe et al., 2006
			R GATCTTCATTATATTCATCTCTCTC		
8	Crr2	BRMS 096	F AGTCGAGATCTCGTTCGTGTCTCCC	220/189/60	Suwabe et al., 2006
			R TGAAGAAGGATTGAAGCTGTTGTTG		
9	Cra	HC352b SCAR (F16-R13)	F CTTTATAATGGCTACTATTTA	160/46	Hayashida et al., 2008
			R TGCTCATGAGTGTATAACTA		
10	Cra	E49 ₃₈₀	CACGTTATCGCA	380/40	Matsumoto et al., 2005
11	Рецес. CRc	m6R	F CCTCTTGAAAAACCCATGAA	760/-	Sakamoto et al., 2008
			R GCAATTATTGCCCTGTTCTGT		
12	Crr3	OPC11 1S	F TTACAGCTGGACCAAGAACATAG	1400/53	Hirai et al., 2004
			R ATCGATGTTTGTGAGTCTCTACT		
13	Crr3	OPC11 2S	F GTAACCTGGTACAGAACAGCATAG	1300/1000/53	Hirai et al., 2004
			R ACTTGTCTAATGAATGATGATGG		
14	Crr3	BrSTS 78	F CTCTCCTCTAACCTGTTCCAAGAA	200/55	Saito et al., 2006
			R GGTGTATCCACACACTCATCAAGT		

¹ F(forward) — прямой праймер; ² R (reverse) — обратный праймер; ³ пн — пар нуклеотидов;

⁴ Т отж. —температура отжига.

Результаты и обсуждение

Гибридологический анализ устойчивости к киле турнепса. Коммерческие F1 гибриды Старко и Мирако являются полностью восприимчивыми к расе с индексом 16/11/31, что послужило основанием для использования их в качестве контроля восприимчивости. При оценке на устойчивость они проявили 100% восприимчивость к *P. brassicae* Wog., что свидетельствует об эффективной инокуляции фитопатогеном и стабильности примененного метода инокуляции. F1 гибриды Ника и Гидра, выбранные в качестве контроля устойчивости, показали высокую устойчивость с баллом поражения 0, отдельные растения имели единичные мелкие желваки на боковых корнях (табл. 3).

Таблица 3

Реакция устойчивости/восприимчивости к киле растений капусты пекинской и турнепса *B. gara* на искусственном инфекционном фоне

№	Популяция	Всего растений	Распределение растений по баллу поражения, шт.				Факт. расщепление		Теор. расщепление		Значения	
			0	1	2	3	R	S	R	S	χ^2	P
1	Мирако F1 S контроль	9	0	0	0	9	0	9	0	1	—	—
	Старко F1 S контроль	7	0	0	0	7	0	7	0	1	—	—
	Гидра F1 R контроль	16	12	4	0	0	16	0	1	0	—	—
	Ника F1 R контроль	15	14	1	0	0	15	0	1	0	—	—
2	P1 Кит1-3с15 S	11	0	0	0	11	0	11	0	1	—	—
	P2 ECD04-05 R	16	16	0	0	0	16	0	1	0	—	—
	F1 (Кит1-3с15×ЕСД04-05)	14	14	0	0	0	14	0	1	0	—	—
	F2 (Кит1-3с15×ЕСД04-05)2	177	164	6	1	6	170	7	63	1	6,584	0,010
								61	3	0,213	0,644	
								15	1	1,591	0,207	
3	P1 Кит1-3с15 S	12	0	0	0	12	0	12	0	1	—	—
	P2 ECD04-05 R	10	10	0	0	0	10	0	1	0	—	—
	F1 (Кит1-3с15×ЕСД04-05)	16	16	0	0	0	16	0	1	0	—	—
	F2 (Кит1-3с15×ЕСД04-05)3	185	177	3	2	3	180	5	63	1	1,564	0,211
									61	3	1,629	0,202
15									1	3,973	0,046	
BC1 [(Кит1-3с15×ЕСД04-05)3 × Кит1-3с15]	157	104	13	14	26	117	40	3	1	0,019	0,890	

№	Популяция	Всего растений	Распределение растений по баллу поражения, шт.				Факт. расщепление		Теор. расщепление		Значения	
			0	1	2	3	R	S	R	S	χ^2	P
4	P1 Кит1-3с15 S	12	0	0	0	12	0	12	0	1	—	—
	P2 ECD04-10 R	10	10	0	0	0	10	0	1	0	—	—
	F1 (Кит1-3с15×ЕСД04-10)	14	14	0	0	0	14	0	1	0	—	—
	F2 (Кит1-3с15×ЕСД04-10)1	206	190	7	1	8	197	9	63	1	10,549	0,001
									61	3	0,047	0,828
15									1	1,244	0,265	
BC1 [(Кит1-3с15×ЕСД04-10)1 × Кит1-3с15]	117	80	6	5	26	86	31	3	1	0,140	0,708	

Примечание. R — устойчивость; S — восприимчивость; χ^2 — фактическое значение критерия Хи-квадрат; P — вероятность; 63:1 — расщепление в F2 при контроле тремя доминантными дупликатными генами; 61:3 — расщепление в F2 при контроле двумя доминантными дупликатными и одним с неполным доминированием; 15:1 — расщепление в F2 при контроле двумя доминантными дупликатными генами; 3:1 — расщепление в BC1S при контроле двумя доминантными дупликатными генами / при контроле двумя доминантными и одним с неполным доминированием дупликатными генами.

Наследование устойчивости к киле линий европейского турнепса ЕСД04-05 и ЕСД04-10 изучали на расщепляющихся популяциях F2 и BC1S трех растений F1: двух от (Кит1-3с15×ЕСД04-05) и одного от (Кит1-3с15×ЕСД04-10) (табл. 3). Гибридологический анализ с привлечением родственных линий ЕСД04-05 и ЕСД04-10 проводили для оценки их возможной генетической гетерогенности в отношении устойчивости к киле, так как они являются инбредными потомствами исходной линии ЕСД04 европейской системы дифференциаторов.

Анализ проявления устойчивости/восприимчивости к киле на инфекционном фоне обеих линий турнепса ЕСД04-05 и ЕСД04-10 показал полную устойчивость растений. Поражение всех растений восприимчивой линии капусты пекинской Кит1-3с15 оценили высшим баллом — 3. Растения F1 гибридных потомств Кит1-3с15×ЕСД04-05 и Кит1-3с15×ЕСД04-10 проявили высокую устойчивость, и не было обнаружено ни единого растения с баллом поражения выше 0.

Оценку распределения устойчивых и восприимчивых растений расщепляющихся популяций F2 и BC 1S проводили с предположением участия в контроле устойчивости независимо наследуемых генов: 1) трех доминантных дупликатных с теоретическим расщеплением в F2 — 63:1; 2) двух доминантных дупликатных и одного с неполным доминированием, теоретическое расщепление в F2 — 61:3 (при поражении гетерозигот по гену с неполным доминированием); 3) двух доминантных дупликатных с теоретическим расщеплением в F2 — 15:1. Теоретическое расщепление в беккроссе от скрещивания с восприимчивым родителем BC1S составляет 3:1, как в случае контроля устойчивости двумя доминантными дупликатными генами, так и в случае контроля двумя доминантными генами и одним с неполным домини-

рованием, при условии поражения растений (rlrlr2r2R3r3), гетерозиготных по гену с неполным доминированием.

Во всех тест-кроссах (№ 2, 3, 4) статистическая обработка расщепления популяций F2 допускает определение устойчивости к киле в линиях ЕСД04-05 и ЕСД04-10, по крайней мере двумя возможными комбинациями генного взаимодействия, попеременно исключая контроль устойчивости тремя и двумя дубликатными генами, но никогда не исключая действие двух доминантных дубликатных и одного с неполным доминированием, которому соответствует наибольшая вероятность — $P = 0,644$ для (Кит 1 -3с 15 хЕСД04-05)2 и $P = 0,828$ для (Кит1-3с15хЕСД04-10)1.

Расщепление по устойчивости/восприимчивости к киле в беккроссных потомствах ВС1S двух гибридов Кит 1 -3с 15 / ЕСД04-05 и Кит 1 -3с 15 / ЕСД04-10 с высокой вероятностью ($P = 0,89$ и $0,71$ соответственно) составило 3:1, что указывает на участие в контроле или двух доминантных, или двух доминантных и одного с неполным доминированием. При этом характер расщепления полностью исключает вероятность предположения об участии в контроле устойчивости трех доминантных дубликатных генов. Отклонение от распределения 7:1 столь очевидно, что не требует статистической обработки, подтверждающей его и не представленной в таблице 3.

Результаты анализа трех тест-кроссов указывают на участие в контроле устойчивости к киле обеих линий ЕСД04-05 и ЕСД04-10 трех независимо наследуемых дубликатно взаимодействующих генов. Однако гены внутри каждой линии различаются по своей эффективности, что не совпадает с данными ранее представленных работ [4, 23]. Выделяются два доминантных высокоэффективных и один с неполным доминированием, применение которого в селекционных программах по устойчивости представляется нецелесообразным. Допускаемой гетерогенности между линиями ЕСД04-05 и ЕСД04-10 по отношению к устойчивости к киле не выявлено.

Гибридологический анализ устойчивости к киле капусты пекинской. Гибридологический анализ устойчивости проведен на четырех линиях капусты пекинской, несущих разные по эффективности гены устойчивости к киле из турнепсов европейского происхождения и различающихся по устойчивости против возбудителя килы использованного расового состава 16/11/31.

Восприимчивые родительские линии Кит1-3с15 и ЕС-1 проявили полную восприимчивость растений с высшим баллом поражения 3. Родительские линии ТПВ1-1(8)1 и 20-2сс1 на инфекционном фоне проявили высокую устойчивость, и все растения имели балл поражения 0. Линии 20-3Се2 и Кн70 проявили устойчивость, однако неполную — около половины растений имели минимальный балл поражения 1 и единичные растения проявили восприимчивость с баллом поражения 2 (табл. 4).

Наличие генетических факторов устойчивости в таких линиях очевидно, но их невысокая эффективность и возможная полигенная природа, со свойственной высокой подверженностью влиянию внешних условий среды, а не только патогенности микроорганизма, влечет изменчивость проявления устойчивости от растения к растению и от испытания к испытанию.

«Разбавление дозы гена» в гетерозиготах F1 гибридных популяций линий ТПВ1-1(8)1, 20-3Се2 и Кн70 привело к проявлению восприимчивости части растений потомства, при этом отмечена четкая закономерность: чем ниже проявление устойчивости у родительской линии, тем больше восприимчивых растений в потомстве F1. Исключением стала линия 20-2сс1, в гетерозиготном F1 потомстве которой не было ни одного пораженного растения.

Гибридологический анализ устойчивости к миле инбредных линий капусты пекинской *B. vara*

№	Популяция	Всего растений	Распределение растений в соответствии с баллом поражения, шт.					Факт. расщепление		Теор. расщепление		Значения	
			0	1	2	3	R	S	R	S	χ^2	P	
1	P1 EC-1 S	21	0	0	0	21	0	21	0	1	-	-	
	P2 ТПВ1-1(8)11 R	24	24	0	0	0	24	0	1	0	-	-	
	F1 EC-1×ТПВ1-1(8)11	29	19	5	4	1	24	5	1	0	-	-	
	F2 (EC-1×ТПВ1-1(8)11)3	99	70	2	2	25	72	27	3	1	0,273	0,601	
2	BC1 (EC-1×ТПВ1-1(8)11)3 × EC-1	25	12	0	6	7	12	13	1	1	0,040	0,841	
	P1 EC-1 S	13	0	0	0	13	0	13	0	1	-	-	
	P2 20-2cc1 R	16	16	0	0	0	16	0	1	0	-	-	
	F1 EC-1×20-2cc1	11	11	0	0	0	11	0	1	0	-	-	
3	BC1 [(EC-1×20-2cc1)1 × EC-1]	126	65	2	4	55	67	59	1	1	0,508	0,476	
	P1 Кит1-3с15 S	11	0	0	0	11	0	11	0	1	-	-	
	P2 20-3Ce2 R	16	8	7	1	0	15	1	1	0	-	-	
	F1 Кит1-3с15×20-3Ce2	9	4	0	0	5	4	5	1	0	-	-	
4	F2 (Кит1-3с15×20-3Ce2)5	54	36	3	0	15	39	15	3	1	0,224	0,636	
	BC1S (Кит1-3с15×20-3Ce2)5 × Кит1-3с15	32	13	4	1	14	17	15	1	1	0,125	0,724	
	P1 Кит1-3с15 S	10	0	0	0	10	0	10	0	1	-	-	
	P2 Кн70 R	8	2	5	1	0	7	1	1	0	-	-	
4	F1 Кит1-3с15×Кн70	15	1	4	1	9	5	10	1	0	-	-	
	F2 (Кит1-3с15×Кн70)3	58	15	4	2	37	19	39	1	3	1,862	0,172	

Примечание. R — устойчивость; S — восприимчивость; χ^2 — фактическое значение критерия Хи-квадрат; P — вероятность; 3:1 — расщепление в F2 при контроле одним доминантным геном; 1:1 — расщепление в BC1S при контроле одним доминантным геном.

Тест-кросс трех устойчивых линий ТПВ1-1(8)1, 20-2cc1 и 20-3Ce2 показывает контроль устойчивости в каждой из них одним доминантным геном, при этом уровень проявления устойчивости у самих линий, F1 гибридных и расщепляющихся потомств демонстрирует различную эффективность генов устойчивости в их генотипах. Самым эффективным геном устойчивости к киле обладает линия 20-2cc 1. Распределение устойчивых и восприимчивых растений в F2 линии Кн70 может быть объяснено только действием одного гена с неполным доминированием, гетерозиготы которого при высокой инфекционной нагрузке не способны сдерживать фитопатогена и поражаются, приводя к расщеплению 3S: 1R и маскируясь под рецессивное наследование признака устойчивости.

Эффективность маркеров картированных локусов устойчивости к киле на селекционных популяциях. ГЦР-амплификацию молекулярных маркеров, представленных в таблице 2, проводили с использованием смесей ДНК устойчивых ЕСД04-10, 20-2cc1 и восприимчивых Кит1-3c15, ЕС-1 родительских линий, F1 гибридов Кит 1 -3с 15 / ЕСД04-10 и ЕС-1x20-2cc1, устойчивых и восприимчивых растений беккроссных потомств от скрещивания с восприимчивым родителем ВС1S [(Кит1-3c15xЕСД04-10)1 x Кит1-3c15] hBC1S [(ЕС-1x20-2cc1) 1 x ЕС-1], предварительно дифференцированных на инфекционном фоне. При анализе электрофореграмм принимали во внимание, что маркеры локусов *Crr1*, *Crr2* и *Cg23* разработаны на расщепляющихся популяциях от скрещивания турнепса (*B. rapa* ssp. *rapifera*) с капустой пекинской (*B. rapa* ssp. *pekinensis*), а маркеры локусов *Cga*, *CgB* и *Cgc* — на популяциях от скрещивания устойчивой и восприимчивой капусты пекинской (табл. 1).

Амплификация маркеров локуса *Crr1* с праймерами SCAR-p91f-SCARp636г и CRS10-CRS11 обнаружила ожидаемые фрагменты у устойчивых линий ЕСД04-10, 20-2cc1 и их отсутствие у восприимчивых Кит1-3c15, ЕС-1. Однако маркер не дифференцирует устойчивые и восприимчивые растения ВС1S потомств (рис. 2).

Анализ полиморфизма маркера CRS10-CRS11 на 50 индивидуальных растениях расщепляющейся популяции BC1 [(Кит1-3c15xЕСД04-10)1 x Кит1-3c15] показал случайное распределение амплифицируемых фрагментов как среди устойчивых так и восприимчивых растений, и отсутствие связи маркера с геном устойчивости линии турнепса ЕСД04-10.

Маркер локуса *Crr1* BRMS-088 оказался мономорфным для пары родительских линий ЕС-1 и 20-2cc1 и мономорфным на расщепляющемся потомстве ВС1S Кит1-3c15xЕСД04-10.

Маркер локуса *Cra* E49 мономорфен для пары родительских линий ЕСД04-10 и Кит1-3c15 и мономорфен на расщепляющемся потомстве ВС1S линий ЕС-1 и 20-2cc1 (рис. 3).

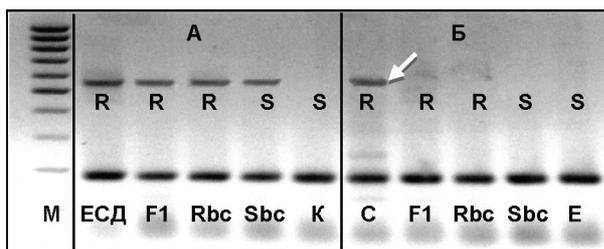


Рис. 2. Маркер локуса *Crr1* CRS10-CRS11 (RA1275): стрелкой обозначен целевой фрагмент 550 п.н., R — устойчивый, S — восприимчивый, M — маркер молекулярного размера 100 п.н.; А) ЕСД — ЕСД04-10, F1 — Кит1-3c15xЕСД04-10, Rbc — устойчивый ВС1S, Sbc — восприимчивый ВС1S, К — Кит1-3c15; Б) С — 20-2cc1, F1 — (ЕС-1 *20-2cc1), Rbc — устойчивый ВС1S, Sbc — восприимчивый ВС1S, E — ЕС-1

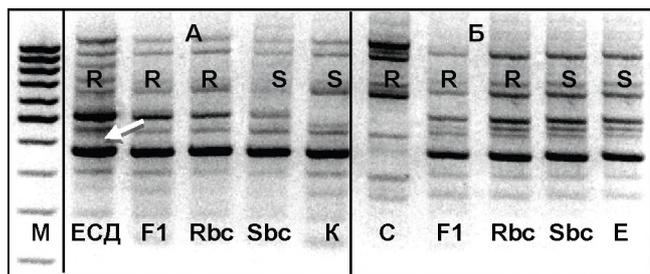


Рис. 3. Маркер локуса *CRa* E49: стрелкой обозначен целевой фрагмент 380 п.н., R — устойчивый, S — восприимчивый образец, M- маркер молекулярного размера 100 п.н.; А) ECD — ECD04-10, F1 — Кит1-3с15хECD04-10, Rbc — устойчивый BC1S, Sbc — восприимчивый BC1S, K — Кит1-3с15; Б) C — 20-2cc1, F1 — (EC-1 x20-2cc1), Rbc — устойчивый BC1S, Sbc — восприимчивый BC1S, E — EC-1

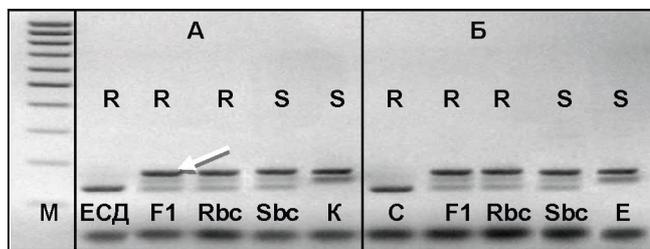


Рис. 4. Маркер локуса *Cg23* BrSTS78: стрелкой обозначен целевой фрагмент 200 п.н., R — устойчивый, S — восприимчивый образец, M- маркер молекулярного размера 100 п.н.; А) ECD — ECD04-10, F1 — Кит1-3с15хECD04-10, Rbc — устойчивый BC1S, Sbc — восприимчивый BC1S, K — Кит1-3с15; Б) C — 20-2cc1, F1 — (EC-1 x20-2cc1), Rbc — устойчивый BC1S, Sbc — восприимчивый BC1S, E — EC-1

популяции BC1 [(EC-1x20-2cc1)1 x EC-1] показал несцепленное с локусом устойчивости распределение амплифицируемых фрагментов, частота рекомбинации составила 50 сМ.

Полимеразная цепная реакция с праймерами маркеров OPS11-1S, OPS11-2S локуса *Cg23*, маркера локуса *CRc* т6R и маркера BRMS-100 на локус *Cg22* не дала ни ожидаемых фрагментов, ни других продуктов амплификации, кроме димеров праймеров.

По результатам анализа все маркеры можно разделить на три группы: 1) маркеры, дающие ожидаемые фрагменты и полиморфизм между родительскими линиями, но мономорфные при амплификации смесей ДНК устойчивых и восприимчивых растений расщепляющихся популяций BC1S; 2) маркеры мономорфные; 3) без амплификации.

Маркер локуса *CRb* TCR05 мономорфен на расщепляющемся потомстве BC1S обеих пар родительских линий, EC-1 и 20-2cc1 и ECD04-10 и Кит1-3с15.

Маркер локуса *CRb* TCR-10 мономорфен на расщепляющемся потомстве BC1S родительских линий ECD04-10 и Кит1-3с15 и не дает целевого фрагмента на комбинации линий EC-1 и 20-2cc1.

Маркеры локусов *Crr1* BRMS-297, *Crr1* BRMS-096 и *CRb* HC352 SCAR мономорфны на обеих парах родительских линий, EC-1 и 20-2cc1 и ECD04-10 и Кит1-3с15, и их расщепляющихся потомствах BC1S.

Амплификация маркера локуса *Cg23* BrSTS78 на родительских линиях EC-1 и 20-2cc1, ECD04-10 и Кит1-3с15 дает полиморфизм, обратный ожидаемому, — целевой фрагмент проявляется у восприимчивых линий, при этом мономорфен на расщепляющихся потомствах BC1S обеих комбинаций (рис. 4). Дополнительный анализ полиморфизма маркера BrSTS 7 8 на 103 индивидуальных растениях расщепляющейся попу-

Заключение

Таким образом, несмотря на происхождение маркеров, как в расщепляющихся популяциях *B. gapa* ssp. *rapifera*, так и *B. gapa* ssp. *pekinensis*, а также их силу сцепления от 0,35 до 10 сМ с локусами устойчивости, в данной работе четырнадцать молекулярных маркеров оказались неэффективными для дифференциации устойчивых и восприимчивых к киле растений расщепляющихся популяций двух доноров высокой устойчивости турнепса ЕСД04-10 и капусты пекинской 20-2сс1. Поэтому протестированные маркеры не могут быть применены в маркеропосредованном отборе с использованием этих генотипов.

Отмечаемая в работах многих исследователей генотип специфичность молекулярных маркеров генов устойчивости к киле высокогетерогенных культур *B. rapa*, капусты пекинской и турнепса [5, 9, 12, 19], ограничивает их использование в практической селекционной работе, независимо от силы сцепления с геном устойчивости. И соответственно в селекционных программах для каждого донора устойчивости, вероятно, потребуется поиск и разработка индивидуального маркера. При этом необходимо учитывать, что гены устойчивости к киле линий турнепса и капусты пекинской, унаследованные от европейских турнепсов, различаются по эффективности обеспечения защиты растений от фитопатогена *P. brassicae* Wor., проявляя доминантный характер наследования и неполное доминирование.

Библиографический список

1. Воронин М. *Plasmodiophora brassicae* — организм, причиняющий капустным растениям болезнь, известную под названием «кила» // Тр. С.-Петербургского общества естествоиспытателей, VIII. С.-Петербург, 1877. С. 169-201.
2. Кривченко В.И., Боос Г.В., Сурмава М.Е. Характеристика генофонда капусты по устойчивости к *Plasmodiophora brassicae* // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1982. Т. 72. Вып. 3. С. 113-120.
3. Монахос Г.Ф., Монахос С.Г. Капуста пекинская *Brassica gapa* L. Em. Metzg. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt. Биологические особенности, генетика, селекция и семеноводство. М.: Изд-во РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева, 2009. 182 с.
4. Монахос Г. Ф., Теренина Н. С. Генетические источники устойчивости к киле крестоцветных (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) при селекции пекинской капусты // Известия ТСХА. 1998. С. 87-93.
5. Монахос С.Г., Игнатов А.Н. Создание молекулярного маркера гена устойчивости к киле (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) для селекции родительских линий капусты пекинской (*Brassica gapa* L.) // Изв. ТСХА. 2007. С. 26-30.
6. Buczacki S., Toxopeus H., Mattusch P. et al. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalization through an international approach // Trans. Br. mycol. Soc. 1975. P. 295-303.
7. Crute I.R., GravA.R., Crisp P., Buczacki S.T. Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in Brassicas and allied crops — a critical review. Plant Breed. Abstr. 50. 1980. P. 91-104.
8. Havashida N., Takabatake Y., Nakazawa N. Construction of a Practical SCAR Marker Linked to Clubroot Resistance in Chinese Cabbage, with Intensive Analysis of HC352b Genes // J. Japan. Soc. Hort. Sci. 2008. №77. P. 150-154.
9. Hirai M. Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica crops. Breeding science, 56. 2006. P. 223-229.

10. Hirai M., Harada T., Kubo N., Tsukada M., Suwabe K., Matsumoto S. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers // Theor. Appl. Genet., 108. 2004. P. 639-643.
11. Jones D.R., Ingram D.S., Dixon G.R. Characterization of isolates derived from single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and studies of their interaction. Plant Pathology, 31. 1982. P. 239-246.
12. Kikuchi M., Ajisaka H., Kuginuki Y., Hirai M. Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of *Brassica rapa* into sequence — tagged sites (STSs) // Breeding Sci. 1999. № 49. P. 83-88.
13. Kuginuki Y, Ajisaka H., Yui M., Yoshikawa H., Hida K. & Hirai M. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. // Euphytica. 1997. P. 149-154.
14. Kuginuki Yoshikawa H., Hirai M. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) // European Journal of Plant Pathology 105. 1999. P. 327-332.
15. Matsumoto E., Yasui C., Ohi M., Tsukada M. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Euphytica 12. 1998. Vol. 104. Is. 2. P. 79-86.
16. Matsumoto E., Havashida N., Ohi M. Behavior of DNA Markers linked to Clubroot Resistance Gene in Segregating Population of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) // J. Japan. Soc. Hort. Sci. 2005. №74. P. 367-373.
17. Murray MG. and Thompson WE Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid. Res. 8. 1980. P. 4321-4325.
18. Piao Z., Deng Y, Choi S., Park Y, Lint Y. SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) // Theor. Appl. Genet. 2004. № 108. P. 1458-1465.
19. Sailo M, Kubo N., Matsumoto S., Suwabe K. Fine mapping of the clubroot resistance gene, Crr3, in *Brassica rapa* // Theor. Appl. Genet. 2006. № 114. P. 81-91.
20. Sakamoto K, Saito A., Taguchi G., Havashida N., Matsumoto E. Mapping of Isolate-Specific QTLs for Clubroot Resistance in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) // Theor. Appl. Genet. 2008. № 117. P. 759-767.
21. Suwabe K, Tsukazaki H., Iketani H., Hatakevama K, Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. // Theoretical Application Genetic. 2003. № 107. P. 997-1002.
22. Suwabe K, Tsukazaki H., Iketani H., Hatakevama K, Kondo M., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., Matsumoto S. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance // Genetics. 2006. № 173. P. 309-319.
23. Toxopeus H., Janssen A. Clubroot resistance in turnip, II. The “slurry” screening method and clubroot races in the Netherlands / Euphytica, 24. 1975. P. 751-755.
24. Voorrips R.E., Visser D.L. Examination of resistance to clubroot in accessions of *Brassica oleracea* using a glasshouse seeding test. Neth. J. Pl. Pathol. 99. 1993. P. 269-276.
25. WitF Inheritance of reaction to clubroot in turnips. Hort. Res 5. 1964. P. 47-49.
26. Yoshikawa H. Breeding for clubroot resistance in Chinese cabbage. In: N.S. Talekar, T.D. Griggs (Eds.), Chinese Cabbage, Proceedings of the 1st International Symposium, Tsukuba, Japan. 1981. P. 405-413.

BREEDING VALUE OF *BRASSICA RAPA* L. CLUBROOT RESISTANCE
GENES AND MOLECULAR MARKERS OF MAPPED CR LOCI

S.G. MONAKHOS, M.L. NGUEN

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

Inheritance of clubroot resistance (CR) was studied on collection of Chinese cabbage (Brassica rapa ssp. pekinensis) and European fodder turnip (B. rapa ssp. rapifera) inbred lines. Different levels of CR were identified in Chinese cabbage with monogenic resistance. Clubroot resistances expressed in European turnip inbred lines ECD04-05 and ECD04-10 were governed by three duplicate genes, two out of its have a complete dominant inheritance and another one incomplete dominance. Evaluation of mapped CR loci DNA markers for practical marker assisted selection has been carried out using two segregated populations from Chinese cabbage x Chinese cabbage and Chinese cabbage x turnip crosses.

Keywords: gene, clubroot, P. brassicae Wor, resistance, molecular marker, Chinese cabbage, European turnip, B. rapa.

Монахос Сократ Григорьевич — к. с.-х. н., доц., зав. лабораторией генетики, селекции и биотехнологии овощных культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: cokrat(@,hotbox.ru).

Нгуен Минь Ли — аспирант кафедры селекции и семеноводства садовых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: minlilyvn24(@gmail. com).