

УДК 573.6:631.527.8:635.345

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В ПОМОЩЬ СЕЛЕКЦИИ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ФУЗАРИОЗНОМУ УВЯДАНИЮ

Радкевич Елена Викторовна, Аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, radkevich.elena.vi@gmail.com

Аннотация: В данной работе представлены результаты оценки эффективности опубликованных ДНК-маркеров локусов устойчивости к фузариозному увяданию и поиска новых ДНК-маркеров.

Ключевые слова: молекулярный маркер, устойчивость, восприимчивость, *B oleracea*, *F. oxysporum*.

Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans* - несовершенный гриб, который приводит к значительным потерям урожая и снижает качество продукции восприимчивых F₁-гибридов. Патоген может сохраняться в почве в течение нескольких лет и поражать растение во все фазы вегетации. Распространение фузариума происходит с помощью зараженных растительных остатков, поливной воды, а также сельскохозяйственной техники [1]. Литературных сведений о распространении возбудителя фузариозного увядания на территории России нет, однако на практике известно, что заболевание встречается на всех полях, где выращивают овощные и масличные капустные культуры. Селекция на устойчивость является единственным методом защиты растений от данного заболевания, так как против *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* нет эффективных агротехнических и химических методов защиты. Несмотря на то, что доноры устойчивости к фузариозному увяданию известны и на их

основе созданы устойчивые к патогену сорта и гибриды, актуальность отбора устойчивых генотипов на инфекционном фоне для создания новых устойчивых F₁-гибридов капусты сохраняется [1]. Повышение эффективности отбора устойчивых генотипов возможно за счет использования молекулярных маркеров, однако часто предлагаемые в открытой печати ДНК-маркеры неэффективны, поэтому необходимость разработки новых маркеров сохраняется.

Целью нашей работы является анализ ранее опубликованных маркеров локуса устойчивости к фузариозному увяданию капусты белокочанной, а также поиск и разработка новых молекулярных маркеров.

Оценку эффективности представленных в литературе маркеров проводили с использованием 5 устойчивых и 5 восприимчивых к фузариозному увяданию чистых линий капусты белокочанной (*B.oleracea*). Картирующую популяцию ВС 1 получали скрещиванием устойчивой Бю65-103 и восприимчивой Ак3-125 линий капусты белокочанной с последующей гибридизацией их гибридного потомства F₁ (Ак3-125 x Бю65-103) с восприимчивой линией Ак3-125. Оценку устойчивости/восприимчивости образцов капусты белокочанной к фузариозному увяданию проводили на искусственном инфекционном фоне. ДНК выделяли из молодых листьев СТАВ-методом [2]. Поиск RAPD-маркеров локуса устойчивости к фузариозному увяданию проводили методом массового сегрегационного анализа [3]. ДНК-полиморфизм между устойчивыми и восприимчивыми генотипами родительских линий и в расщепляющейся беккроссной популяции ВСi выявляли с использованием 148 RAPD-праймеров. Амплификацию ДНК-фрагментов проводили в 15 мкл реакционной смеси по следующей программе: начальная денатурация 92°C - 3 мин; далее 35 циклов - денатурация 92°C - 30 с, отжиг (температура для RAPD-праймеров составляла 38°C, для STS-праймеров - 55-60°C в соответствии с авторскими указаниями) - 30 с, синтез 72°C - 1,0 мин; завершающий синтез 72°C - 7 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете при окрашивании флуоресцентным красителем GelRed. Оценку силы сцепления маркера с локусом устойчивости проводили в популяции ВС! расчетом частоты рекомбинации как отношение числа рекомбинантного потомства к общему числу потомства умноженное на 100. Достоверность предполагаемого расщепления определяли с использованием критерия % .

Анализ ранее опубликованных маркеров устойчивости S46M48199 [4] и маркеров гена-кандидата *FOC1* устойчивости к фузариозному увяданию R7, R3, S3, A1, V17, S9, M10 на коллекции образцов капусты белокочанной показал, что они мономорфны (рис. 3), т.е. не выявляют различий между устойчивыми Ап1-1, За2-221, Ак 3-12122, Кау3-1252, Дт46а1фа и восприимчивыми Ли1-12, А611-1, И34МС, Нап2а, Амо1 -211 генотипами. В связи с этим, чтобы реализовать марке-опосредованный отбор капусты белокочанной на устойчивость к патогену, необходимо разработать новые

маркеры. Для поиска ДНК-маркера нами создана картирующая популяция BC1, представленная 93 сегрегирующими по устойчивости к фузариозному увяданию растениями, на основе гибридизации устойчивой Бюб5-103 и восприимчивой Ак3-125 инбредных линий капусты белокочанной. Проявление устойчивости их F1-гибридного потомства свидетельствовало о доминантном характере наследования устойчивости, а расщепление устойчивых и восприимчивых растений беккроссного потомства BC1 (Ак3-125×Бю1)×Ак3-125 1:1 ($\chi^2=1,47$; $P=0,23$) - о моногенном контроле устойчивости.

Методом массового сегрегационного анализа с использованием 282 декамерных RAPD-праймеров, ДНК родительских линий Бюб5-103, Ак3-125, их F1-гибридного потомства и смесей ДНК 10 устойчивых и 10 восприимчивых растений (BC) выявлено небольшое число - 7 полиморфных ДНК-фрагментов, потенциальных маркеров локуса устойчивости к фузариозному увяданию. Генотипированием 93 индивидуальных растений расщепляющейся популяции (BC) и статистическим анализом с использованием критерия χ было установлено, что расщепление маркеров 424, 362, 580, 439, 467, 469 соответствует моногенной модели наследования. Расщепление маркера 266 отклоняется от менделевского 1:1. Оценка силы сцепления (частоты рекомбинации) маркеров с локусом устойчивости обнаружила слабую связь маркеров 266 (42 сМ), 424 (43 сМ), 467 (45 сМ), 580 (47 сМ), 439 (47 сМ) и независимое наследование маркеров, 362 (57 сМ), 469 (59 сМ). (таблица)

Таблица

Наследование RAPD-маркеров в популяции BC, капусты белокочанной

днк-маркер	Сегрегация растений						Генетическое расстояние, сМ
	ДНК-маркеры	ДНК-маркеры и устойчивость к фузариозу					
		*2	R/+	R/-	S/+	S/-	
266	23:70	23,8	28	12	42	11	42
424	47:46	0,01	23	17	23	30	43
467	44:49	0,26	19	21	30	23	45
580	51:42	0,8	19	21	23	30	47
439	48:45	0,1	18	22	27	26	47
362	38:55	3,1	21	19	34	19	57
469	52:41	1,4	13	27	28	25	59

R - присутствует устойчивость к фузариозному увяданию; S - устойчивости к фузариозному увяданию нет; + — присутствует RAPD-маркер; - - RAPD-маркер отсутствует. Для вероятности ошибки $p < 0.05$ и df (степень свободы) = 1 критическое значение $\chi^2 = 3.84$.

Библиографический список

1. Монахос Г.Ф., Монахос С.Г., Костенко Г.А. Селекция капусты из устойчивость: состояние и перспективы // Картофель и овощи, №12, 2016. С. 31-35.
2. Murray M.G. and Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acid. Res. 1980. 8. P. 4321-4325.
3. Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. vol. 88. P. 9828-9832.
4. Jiang M., Zhao Y., Xie J. et al. Development of a SCAR marker for Fusarium Wilt Resistance in Cabbage //Sci Agric Sinica.2011. 44(14): 3053-3059.
5. Lv H., Fang Z., Yang L. et al. Mapping and analysis of a novel candidate Fusarium wilt resistance gene FOCI in Brassica oleracea // BMC Genomics. 2014. 15: 1094.