



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –  
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА  
(ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

Факультет садоводства и ландшафтной архитектуры  
Кафедра ботаники, селекции и семеноводства садовых растений

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**  
(бакалаврская работа)

«Молекулярно-генетическое изучение устойчивости к киле линии капусты  
белокочанной (*B. oleracea* L.)»

**по направлению 35.03.05 «Садоводство»**

Зав. выпускающей кафедрой \_\_\_\_\_ Е.Г. Самощенко  
ФИО  
(подпись, дата)

«Допустить к защите»  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Руководитель \_\_\_\_\_ С.Г. Монахос  
(подпись, дата)

Бакалавр \_\_\_\_\_ А.И. Комаревцева  
(подпись, дата)

Рецензент \_\_\_\_\_ А.В. Константинович  
(подпись, дата)

Нормоконтроль \_\_\_\_\_ М.Б. Панова  
(подпись, дата)

Москва, 2020



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
 РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –  
 МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА  
 (ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

Факультет Садоводства и ландшафтной архитектуры  
 Кафедра ботаники, селекции и семеноводства садовых растений

Утверждаю: \_\_\_\_\_  
 Зав. выпускающей кафедрой Е.Г. Самощенко  
 «20» мая 2019 г.

### ЗАДАНИЕ

#### НА ВЫПУСКНУЮ КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ (ВКР)

**Бакалавр** Комаревцева Анна Игоревна

**Тема ВКР** (утверждена приказом по университету от «24» декабря 2019 г. № СК-С-1371) «Молекулярно-генетическое изучение устойчивости к киле линии капусты белокочанной (*B. oleracea* L.)»

**Срок сдачи ВКР** «08» июня 2020 г.

Исходные данные к работе: расщепляющаяся популяция Текила×(Зенон×Агр); линии F2 Report-3 (бут.), Дт 46ф1131 (бут.). Также использовались килоустойчивые образцы капусты белокочанной (*B. oleracea*), редьки (*R. sativus*) и ВС-потомств от межвидовой гибридизации (*B. oleracea* × *R. sativus*) из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева».

Перечень подлежащих разработке в работе вопросов:

1. Провести молекулярное генотипирование коллекции образцов с использованием известных ДНК маркеров генов устойчивости к киле B0902F/R, Tau\_cBrCR404, Y13 и O20,GC3060F/R, а также с наборами праймеров Indel, SSR и RAPD.
2. Оценить эффективность выявленных молекулярных маркеров при различении устойчивых генотипов представленной коллекции линий.
3. Провести анализ выявленного полиморфизма и установить связь полиморфных локусов с наследованием аллелей устойчивости и/или восприимчивости.

Перечень дополнительного материала:

Дата выдачи задания

«20» мая 2019 г.

Руководитель (подпись, ФИО)

Монахос С.Г. \_\_\_\_\_

Задание принял к исполнению (подпись студента)

«20» мая 2019 г.

## **Аннотация**

Выпускная квалифицированная работа посвящена поиску и разработке молекулярных маркеров генов устойчивости к киле для капусты белокочанной (*B. oleracea* L.). Актуальность данной темы объясняется тем, что кила наносит во всем мире огромный ущерб сельскохозяйственным культурам, а в частности – капусте белокочанной. При этом надежный и эффективный метод защиты от килы основан на создании новых сортов и гибридов, объединяющих в одном генотипе несколько эффективных доминантных генов устойчивости, которые мы сможем идентифицировать с помощью молекулярных маркеров.

Целью работы является молекулярно-генетическая оценка расщепляющейся популяций и килоустойчивых линий капусты белокочанной, редьки и их межвидовых гибридов по генам устойчивости к киле.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие задачи:

1. Выделение ДНК образцов капусты белокочанной, редьки и ВС-потомства;
2. Проведение молекулярное генотипирование коллекции образцов с использованием известных ДНК маркеров генов устойчивости к киле B0902F/R, Таu\_cBrCR404, Y13 и O20, GC3060F/R, а также с наборами праймеров Indel, SSR и RAPD;
3. Оценка эффективности молекулярных маркеров при различении устойчивых к киле линий/образцов;
4. Анализ выявленного полиморфизма и установление связи полиморфных локусов с наследованием аллелей устойчивости и/или восприимчивости;
5. Дифференциация образцов по генам устойчивости к киле (CRa, CRb и CRA05).

Работа изложена на 60 страницах, иллюстрирована 13 таблицами и 18 рисунками. Библиографический список включает 37 источников, в том числе 12 на иностранном языке.

## **Перечень сокращений и условных обозначений**

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕДС – европейская система дифференциаторов

AFLP – амплификация полиморфных по длине фрагментов ДНК

IRAP – полиморфизм терминальных участков ретротранспозонов)

ISSR – область генома между двумя соседними, противоположно ориентированными микросателлитами

RAPD – полиморфизм длин анонимных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами случайных декануклеотидов (амплифицируемые ДНК-фрагменты)

RFLP – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

SCAR – характерная последовательность амплифицируемого участка

SNP – полиморфизм единичного нуклеотида

SSAP – специфичный для последовательности амплификационный полиморфизм;

SSR – последовательность микросателлитных локусов (танделы повторов простых последовательностей)

STS – размеченный участок последовательности (мономорфные ДНК-маркеры)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

MAS – marker-assisted selection

BSA – массовый сегрегационный анализ

п.н. – пара нуклеотидов

°С – градусы Цельсия

см – сантиметр

м – метр

г – грамм

мг – миллиграмм

мл – миллилитр

мкл – микролитр

сМ – сантиморганиды

## Оглавление

<b>Аннотация</b> .....	3
<b>Перечень сокращений и условных обозначений</b> .....	4
<b>Введение</b> .....	7
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	8
1.1 Капуста белокочанная ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.) .....	8
1.1.1 Происхождение, распространение и систематика.....	8
1.1.2 Народно-хозяйственное и пищевое значение капусты белокочанной.....	9
1.1.3 Биологическая характеристика культуры. Требовательность к внешним условиям среды .....	10
1.2. Кила капустных культур (возбудитель - <i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor.)....	12
1.2.1 Вредоносность и распространение килы.....	12
1.2.2 Симптомы болезни .....	13
1.2.3 Систематика и биологическая характеристика <i>P.brassicae</i> .....	14
1.2.4 Взаимодействие растение-патоген, расовая дифференциация <i>P.brassicae</i> Wor.....	16
1.3 Генетика и селекция на устойчивость к киле <i>B.oleracea</i> .....	18
1.4 Маркер-опосредованный отбор в селекции на устойчивость к киле капустных культур .....	19
1.4.1 Молекулярные маркеры .....	19
1.4.2 Методы селекции, основанные на использовании ДНК-маркеров .....	22
<b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....	24
2.1 Растительный материал .....	24
2.2 Выделение ДНК из растительной ткани.....	24
2.3 Амплифицирование геномной ДНК с праймерами.....	28
2.3.1 Амплификации с RAPD – праймерами.....	28
2.3.2 Проведение амплификаций с праймерами Tau_cBR404 (BrCr026F; BrCr492R), B0902F(R) и GC3060F(R). .....	29
2.4 Гель-электрофорез .....	30
2.5 Посев и выращивание растений .....	32
2.6 Оценка устойчивости к киле на инфекционном фоне .....	32
2.7 Учёт устойчивости/восприимчивости растений.....	33
2.8 Оценка силы сцепления маркер/признак.....	34
<b>Глава 3. Результаты и обсуждение</b> .....	35
3.1 Результаты по маркеру GC3060 на ген CRa.....	35
3.2 Результаты по кандидатам .....	39
3.3 Результаты анализа наличия/отсутствия полиморфизма.....	49

3.4 Молекулярно-генетическая оценка килоустойчивых линий капусты белокочанной, редьки и их межвидовых гибридов по генам устойчивости к киле .....	51
3.4 Результаты исследования по генам устойчивости к киле.....	53
3.5 Гибридизация – создание картирующей популяции для поиска молекулярного маркера и локализации гена устойчивости к киле .....	53
<b>Глава 4. Охрана труда .....</b>	<b>54</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>56</b>
<b>Библиографический список.....</b>	<b>57</b>

## **Введение**

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L.) является одной из самых значимых культур в жизни человека. Её популярность объясняется целым комплексом биологических и хозяйственно полезных свойств. Посевные площади капусты всех видов в России в 2018 году, по данным Росстата, в промышленном секторе овощеводства (сельхозорганизации и крестьянско-фермерские хозяйства, без учета хозяйств населения) составили 27,0 тысяч гектар.

Одно из основных направлений в современной селекции капусты белокочанной это устойчивость к возбудителям таких болезней как кила, сосудистый бактериоз, фузариозное увядание и повреждение вредными веществами. В настоящее время селекция белокочанной капусты в основном сосредоточена на создании F1 гибридов, которые отличаются от сортов высокой продуктивностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов.

В условиях постоянно меняющейся конъюнктуры рынка, селекция должна оперативно реагировать на его запросы, оставаться конкурентоспособной. В настоящее время в нашей стране интенсивно происходит сортосмена, поэтому необходимы методы ускорения селекционного процесса капусты, использование в работе достижений научно-технического прогресса, широкого применения инструментальных и прецизионных методов, позволяющих максимально эффективно использовать потенциал отечественного и зарубежного генофонда (Бондарева, 2009).

Биотехнологические методы очень широко используют для ускорения селекции растений. Поэтому применение ДНК маркеров с помощью маркер-опосредованного отбора поможет увеличить точность и эффективность селекции и приведет к ускорению создания новых сортов.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)

#### 1.1.1 Происхождение, распространение и систематика

##### Систематика:

**Домен:** *Eukaryota* (Эукариоты);

**Царство:** *Plantae* (Растения);

**Отдел:** *Angiosperms* (Цветковые растения, или Покрытосеменные);

**Класс:** *Magnoliopsida* (МагнолиоПСиды, двудольные);

**Порядок:** *Brassicales* (Капустоцветные);

**Семейство:** *Brassicaceae* (Крестоцветные);

**Род:** *Brassica* (Капуста);

**Вид:** *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (Капуста огородная, или белокочанная).

Памятники древности свидетельствуют о том, что капустные растения человек стал употреблять в пищу очень давно. Семена данной культуры были найдены 5 — 3 тысячелетия до н. э. при раскопках свайных построек нового каменного и бронзового веков.

Считается, что капуста эволюционировала из дикой формы, родом из Европы, растущей вдоль северного побережья Море, Ла-Манш и северного Средиземноморья. Феофраст описал капусту в 350 году до нашей эры, а греки выращивали её еще в 600 году до н. э., и верили, что капуста является даром богов (Savita, 2012).

Следует подчеркнуть, что листовые формы капусты белокочанной, обладающие гладкими и кучерявыми листьями, стали выращивать в Древней Испании. А кочанные формы капусты впервые выращивали древние земледельцы Пиренейского и Апеннинского полуостровов. В пользу этого предположения ученых говорит тот факт, что именно здесь до сих пор встречаются в культуре примитивные (первоначальные) формы этого ботанического вида.

На протяжении тысячелетий из дикорастущей капусты человеку удалось получить большое разнообразие видов.



Позже культура двигалась в Римскую империю, Греческую Республику и Египет. Дальше свое «путешествие» продолжила по Южному Кавказу и Балканским странам.

В настоящее время капусту культивируют в Европе, Северной Америке, Юго-Восточной Азии. В мире под этой культурой занято более 30 млн. га, а основными производителями являются: Китай (около 35 млн. т), Индия (более 6 млн. т), Россия (более 4 млн. т) и другие.

С помощью селекции было создано огромное количество сортов, отличающихся не только высокими хозяйственными качествами, но и устойчивостью к заболеваниям. На 2019 год в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации внесено 363 сортов и 75 F1 гибридов капусты белокочанной. Это сорта селекции ВНИИССОК, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, ФГБНУ ВНИИО.

### **1.1.2 Народно-хозяйственное и пищевое значение капусты белокочанной**

Белокочанную капусту выращивают повсеместно – от южных до северных границ России. При этом в северной и средней частях Нечерноземной зоны она занимает до 50 % площади всех овощных культур и до 98 % всей площади под капустными культурами (Тараканов,2003). Такое широкое распространение обуславливается рядом ее ценных хозяйственных особенностей: высокой урожайностью, хорошей транспортабельностью, способностью длительно сохраняться в свежем виде. Наличие же скороспелых, а также позднеспелых и лежких сортов позволяет иметь свежую капусту на протяжении большей части года. Кроме того, ее перерабатывают: заквашивают или сушат.

Содержание сухих веществ в кочанах капусты составляет в среднем 8,5%, при этом большая часть из них - углеводы, азотистые вещества и минеральные соли.

Углеводы представлены преимущественно сахарами. Общее количество сахара в белокочанной капусте в среднем составляет 4,2 % (от сырого веса).

Азотистых веществ в капусте больше, чем у брюквы, репы, моркови, свеклы. Большая часть (75 – 87 %) из них легко усваивается организмом человека, а некоторая – содержит незаменимые аминокислоты.

В капусте имеются минеральные вещества (в среднем 0,64 %), содержащие калий, кальций, фосфор, серу и другие (Китаева, 1988).

Кочаны, употребляемые в пищу, в обилии содержат витамины С, Р, К (до 4 мг%), В1-тиамин (0,22 мг %), В2-рибофлавин (0,04 – 0,6 мг %), В3-пантотеновая кислота (до 2,7 мг %), В6 (0,1 – 0,14 мг %), В9, D, E, Р (до 300 мг %), РР (0,34 – 2,7 мг %), каротин (до 2 мг %), фолиевая кислота, биотин, тиамин, филлохинон, пиродоксин, инозит, витамин U, ферменты, фитонциды. В свежих листьях капусты найдены тиогликозиды: гликобрассицин и неогликобрассицин, содержащие серу, а также соли фосфора и серы. Все эти вещества и витамины полезны и необходимы для организма человека (Алексашин, 1982).

В листьях ранних сортов аскорбиновой кислоты содержится 20 мг %, в то время как в позднеспелых – 70 мг %. Капуста обладает способностью длительно её сохранять (в течение 7 – 8 месяцев). Аскорбиновая кислота (витамин С) содержится в капусте в химически-связанной форме (аскорбигене). Аскорбиген – наиболее устойчивая форма витамина С, причем в капусте его в этом виде содержится в 50 раз больше, чем, например, в картофеле.

Данная культура находит также применение и в животноводстве. Листья белокочанной капусты скармливают домашним животным и птицам (в свежем и силосованном виде).

### **1.1.3 Биологическая характеристика культуры. Требовательность к внешним условиям среды**

Белокочанная капуста – 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) цветоносные побеги (стебли), на которых в дальнейшем формируются стручки с семенами (Прохоров и др., 1997; Путырский, 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), длинночерешковым (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 ее поверхность листа – плоская, вогнутая и выпуклая. Поверхность ткани листьев – гладкая и морщинистая (морщинистость мелкая, средняя и крупная). Окраска листьев варьируется от светло- и серо-зеленой до темно-зеленой 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 рН 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. Кила капустных культур (возбудитель - *Plasmodiophora brassicae* Wor.)**

### **1.2.1 Вредоносность и распространение килы**

Впервые килу в 1878 году изучил русский ботаник, альголог (специалист по лечению болевых синдромов) и миколог, академик Санкт-Петербургской Академии наук Михаил Степанович Воронин (1838 – 1903 гг.). Ему удалось раскрыть причину заболевания, описать цикл развития этого паразита и предложить меры борьбы с ним, указав на его способность заражать другие растения из семейства крестоцветных, среди которых немало культурных и дикорастущих растений.

Возбудитель килы относится к облигатным паразитам и распространен практически везде, где возделывается капуста. Ежегодно потери от килы в отдельных зонах достигают 50 – 75 % от планируемого урожая.

В России *P. brassicae* распространена от Архангельской области до Закавказья, она охватывает Нечерноземный округ, Центрально-черноземный округ и Дальний Восток, включая Сахалин и Якутию.

В Северо-западных районах России ежегодно поражается до 50 – 75 % от общего количества выращенных растений, а урожай при этом снижается на 10 – 60 % (Монахос Г.Ф., Джалилов Ф.С., Монахос С.Г., 2009).

### 1.2.2 Симптомы болезни

Патоген поражает корневую систему растений капусты, вызывая разрастание паренхимной ткани корней и образование желваков. В результате нарушается поступление воды и питательных веществ из почвы, растения сильно угнетены, урожайность резко снижается. При заражении растений килой на ранних стадиях в редких случаях образуется кочан.

Источником инфицирования капусты килой является зараженная почва, в которой покоящиеся споры возбудителя обладают высокой устойчивостью и могут сохраняться от 5 до 15 лет, что осложняет меры борьбы. Отсюда следует, что заболевание распространяется с зараженной рассадой капусты, орудиями обработки почвы, поливными и паводковыми водами, растительными остатками (Герасимов, Осницкая, 1961).

Оптимальной температурой, как известно, для заражения растений капусты килой считается 22 – 24 °С, влажность почвы около 75 %. И при таких благоприятных условиях болезнь может проявляться на растениях через 10 – 12 суток после всходов, но чаще симптомы обнаруживаются через 30 – 40 суток после инфицирования (Маслова, 2016).

Наиболее целесообразным методом борьбы с *P. brassicae* является возделывание устойчивых сортов и гибридов капустных культур (Монахос Г.Ф., Джалилов Ф.С., Монахос С.Г., 2009). Селекция на устойчивость к киле ведется давно у всех капустных культур, в результате чего было создано много килоустойчивых сортов и гибридов, однако, на сегодняшний день не выведено абсолютно устойчивого сорта или F1 гибрида (Нгуен, 2015).

### 1.2.3 Систематика и биологическая характеристика *P.brassicae*

Возбудитель болезни относят к царству *Protozoa* (Простейшие) по следующей классификации (Encyclopedia of life, 2013):

**Царство:** *Protozoa* (Простейшие);

**Отдел:** *Plasmodiophoromycota* (Плазмодиофоромикота);

**Класс:** *Plasmodiophoromycetes* (Плазмодиофоромицеты);

**Порядок:** *Plasmodiophorales* (Плазмодиофоровые);

**Семейство:** *Plasmodiophoraceae* (Плазмодиофоровые);

**Род:** *Plasmodiophora* (Плазмодиофора);

**Вид:** *Plasmodiophora brassicae* Wor..

Вегетативное тело патогена представляет собой многоядерный протопласт, не способный к самостоятельному движению и находящийся внутри клетки растения – хозяина.

Специальные спороношения не образуются. Споры, образующиеся внутри клеток хозяина и имеющие хитиновую клеточную оболочку, представляют собой зимующую стадию. Ряд биохимических процессов, например, синтез триптофана, идет с участием ферментных систем как у хитридиомикотовых и сумчатых грибов. Кристы митохондрий трубчатые, но без базальной перетяжки и гомологичны пластинчатым кристам настоящих грибов. Жгутиковый аппарат подвижных стадий состоит из двух неравных гладких жгутиков. При наступлении благоприятных условий споры прорастают двужгутиковыми зооспорами. Жгутики изоморфные.

У патогена различают две фазы жизненного цикла: первая проходит в корневых волосках пораженного растения, а вторая – в коре корня и в стеле гипокотыля (Ingram, Tommerup, 1972).

Первичная стадия жизненного цикла протекает в почве и корневом волоске. Покоящиеся гаплоидные споры, находящиеся в почве, прорастают первичными зооспорами, имеющими два гладких жгутика разной длины на апикальном конце.

Покоящиеся споры – это очень устойчивая структура. Её клеточная стенка (включая мембрану) состоит примерно из 25 % хитина, 2,5 % других углеводов,

34 % белка и 18 % липидов. Прорастание покоящихся спор приводит к освобождению зооспоры. Частота прорастания увеличивается по мере созревания спор и усиливается повышением влажности и температуры, снижается щелочным рН и изменяется с некоторыми неорганическими ионами в почве (Macfarlane, 1970; Takahashi, 1994a). В отличие от толстостенных покоящихся спор, зооспоры чувствительны к различным видам воздействия окружающей среды. Считается, что зооспоры, не имеющие доступа к растению-хозяину, выживают лишь в течение короткого периода времени (Hanna Friberg, 2005).

Вторичная стадия протекает в почве и клетках коры корня. Зооспоры, функционирующие как гаметы, попарно сливаются (плазмोगамия), образуется двуядерная клетка, которая способна заражать корни растения.

В клетках коры корня ядра митотически делятся. Сначала развивается двуядерный вторичный плазмодий, а затем мощный вторичный многоядерный плазмодий. Пораженные корни утолщаются.

На поздних стадиях развития болезни ядра плазмодия попарно сливаются (кариогамия), далее следует редукционное деление, и плазмодий распадается на массу гаплоидных мелких круглых спор (мейоспоры).

При сгнивании корней споры возбудителя попадают в почву. Их распространению в почве способствуют животные (дождевые черви, насекомые), токи воды (дождь, полив), деятельность человека, например перенос земли со спорами на орудиях обработки почвы.

В почве споры могут годами сохраняться, не теряя способности к прорастанию. Однако споры будут прорасти при благоприятных условиях и стимулирующем действии корневых выделений растений-хозяев (Переведенцева, 2009).

Продолжительность сохранения жизнеспособности и патогенности покоящихся спор *P.brassicae* в почве составляет, по крайней мере, 15 – 17 лет, а период естественного снижения инфекционной нагрузки почвы – 3,6 года (Wallenhammar, 1996).

### 1.2.4 Взаимодействие растение-патоген, расовая дифференциация *P.brassicae* Wor.

Возбудитель *Plasmodiophora brassicae* имеет несколько рас, каждая из которых поражает определённые виды и сорта семейства Крестоцветные. Для удобной классификации рас патогена разработано несколько систем дифференциации: разработанная Вильямсом (Williams P.H., 1966) и Европейская система дифференциаторов рас килы (Buczacki S.T. et al., 1975). Сначала использовалась первая из двух систем дифференциации (Таблица 1.1).

**Таблица 1.1 - Реакция растения-хозяина на заражение различными расами *Plasmodiophora brassicae* (P.H. Williams, 1966)**

Дифференциатор	Раса															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Капуста</b>																
Jersey Queen	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Badger Shipper	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<b>Брюква</b>																
Laurentian	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Wilhelmsburger	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+

Примечание: (+) – устойчивая реакция хозяина, (-) – восприимчивая реакция хозяина.

Но позже широкое распространение получила единая европейская система дифференциаторов (ЕДС), используемая учёными и по сей день. Она была разработана S. Buczacki в 1975 году (Buczacki S. et al., 1975) (Таблица 1.2). В состав европейской системы входят 15 генотипов, относящихся к трем видам рода *Brassica*: *B. campestris*, *B. napus* и *B. oleracea*.

Предложенная система идентификации активно используется в практической работе, так как позволяет определить наличие генов вирулентности как у отдельного изолята, так и у всей популяции. Дифференциаторы 01 – 04 – линии турнепса, устойчивость которых контролируется тремя независимыми доминантными генами. Дифференциатор 05 – сорт пекинской капусты «Granaat» восприимчивый ко всем расам возбудителя, служит контролем восприимчивости (Buczacki et al., 1975).



Растения-дифференциаторы 06 - 09 представлены сортами и линиями рапса «Nevin», «Commercial Giant», «Clubroot Resistant» и отбором из сорта «Commercial Giant». Растение-хозяин 10 – сорт брюквы «Wilhelmsburger», у которого устойчивость к киле, контролируется двумя независимыми доминантными генами. Генотипы 11 – 15 принадлежат виду *B.oleracea* и представлены сортами «Badger Shipper», «Jersei Queen», «Bindsachsener», «Septa» белокочанной капусты и «Verheul» листовой. Анализ результатов более 200 тестов подтверждает расоспецифичную реакцию растений-дифференциаторов *B.rapa* и *B.napus*, при этом устойчивость растений *B.oleracea* является недифференцирующей (Crute et al., 1983). Номенклатура идентифицированных рас осуществляется с помощью ЕСД-кода, получаемого при сложении цифровых значений пораженных генотипов в каждой хромосомной группе (Buczacki et al., 1975).

Номенклатура идентифицированных рас представляет собой ЕСД-код, полученный в результате сложения цифровых значений пораженных генотипов в каждой хромосомной группе.

Процесс идентификации рас килы занимает продолжительное время - от 4 до 6 недель. Кроме того, он достаточно трудоемок, требует значительной площади открытого или защищенного грунта для испытания большого количества образцов.

Недостаток данного метода еще состоит в том, что результаты оценки могут отличаться в зависимости от действия факторов окружающей среды, экологических зон. Причиной этого явления является высокая гетерогенность и постоянная изменчивость популяции патогена (Монахос Г.Ф., Джалилов Ф.С., Монахос С.Г., 2009).

**Таблица 1.2 - Европейская система дифференциации возбудителя килы  
(Buczacki S. et al., 1975)**

№	Сорт – дифференциатор	Двоичный индекс образца	Десятичный индекс образца
<b>20 - хромосомная группа</b>			
01	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия aaBBCC	2 <sup>0</sup>	1
02	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия AAввСС	2 <sup>1</sup>	2

Продолжение таблицы 1.2

03	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия AABVcc	2 <sup>2</sup>	4
04	<i>B. rapa</i> L. var. <i>rapa</i> (L.), линия AABVCC	2 <sup>3</sup>	8
05	<i>B. pekinensis</i> (Lour.) Rupr. cv. Granaat	2 <sup>4</sup>	16
<b>38 – хромосомная группа</b>			
06	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, Nevin DC 101	2 <sup>0</sup>	1
07	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, Commercial giant DC 119	2 <sup>1</sup>	2
08	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, Commercial giant DC 128	2 <sup>2</sup>	4
09	<i>B. napus</i> L. ssp. <i>oleifera</i> (Metzg.) Sinsk, New Zealand Clubroot Resistant DC 129	2 <sup>3</sup>	8
10	<i>B. napus</i> L. var. <i>napobrassica</i> (L.) Rchb. Wilhelmsburger DC 130	2 <sup>4</sup>	16
<b>18 – хромосомная группа</b>			
11	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Badger Shipper	2 <sup>0</sup>	1
12	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Bindsachsener	2 <sup>1</sup>	2
13	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Jersey Queen	2 <sup>2</sup>	4
14	<i>B. oleracea</i> convar. <i>Capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC cv. Septa	2 <sup>3</sup>	8
15	<i>B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> (DC.) Alef. var. <i>viridis</i> Thell. cv. Verheul	2 <sup>4</sup>	16

### 1.3 Генетика и селекция на устойчивость к киле *B.oleracea*

На сегодняшний день проведено множество работ по поиску источников устойчивости среди представителей вида *B.oleracea* и изучения ее генетики (Crute et al., 1980). Устойчивость у вида наследуется полигенно и рецессивно. Также она проявляется независимо от рас (Buczacki et al., 1983) и не действует против высоких концентраций инокулюма патогена. Было установлено, что устойчивость *B.oleracea* определяется шестью рецессивными генами. Недавние исследования выявили 8 генов CR, расположенных на 6 различных хромосомах у *B. rapa*. Выделяют следующие гены: *CRa* (на хромосоме A03), *CRb* (A03), *Crr3* (A03), *Crr1* (A08), *Crr2* (A01), *CRc* (A02), *CRk* (A03), *Crr4* (A06), *CrrA5* (A05).

Компания Syngenta Seeds B.V. после проделанной 18-летней работы выпустила на рынок в 2005 году несколько килоустойчивых F1-гибридов

*B.oleracea*, таких как «Clapton», «Clarify» (цветная капуста), «Kilaton», «Tekila» (капуста белокочанная) и другие. Испытания в Индии, в Австралии и в некоторых регионах Европы показали, что ген устойчивости у F1-гибридов, идентифицируемый двумя RAPD-маркерами (праймеры O20 и Y13), высокоэффективен так же, как и у *B.rapa*. Но при этом было показано, что устойчивость созданных F1-гибридов капусты и даже самого донора устойчивости - капусты пекинской F1 «Parkin» в некоторых районах Германии, Польши и Франции преодолевается отдельными очагами инфекций, с поражением растений от средней до высокой степени. Исследованием на искусственном инфекционном фоне с полевыми изолятами (ООО «Селекционной станции имени Н.Н.Тимофеева») килоустойчивых гибридов «Килатон», «Текила» и др. была показана относительно высокая устойчивость этих растений в первый год с поражением отдельных растений, и полная восприимчивость 100 % при третьем цикле выращивания этих гибридов на том же субстрате (Нгуен, 2015).

#### **1.4 Маркер-опосредованный отбор в селекции на устойчивость к киле капустных культур**

##### **1.4.1 Молекулярные маркеры**

Прогресс в современной генетике зависит от развития и использования молекулярно-генетических подходов, в основе которых лежит анализ полиморфизма ДНК, выявляемый с помощью различных типов молекулярных маркеров. Молекулярные маркеры используются в настоящее время для генотипирования при оценке генетического родства/разнообразия между индивидами, сортами; для создания генетических карт, картирования генов; в селекционном процессе; в популяционной генетике; сравнительной генетике и геномике; филогенетических исследованиях; биотехнологии. Использование молекулярных маркеров позволяет значительно ускорять процесс селекции (Омашева, Аубакирова, 2013).

Молекулярные маркеры (синонимы ДНК-маркеров) - это генетические маркеры, которые анализируются на уровне ДНК. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали белковые

маркеры, а еще раньше - классические генетические маркеры. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры подразделяются на три группы в соответствии с основным методом анализа: маркеры исследуются с использованием блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов (Хлёткина, 2011).

### Молекулярные маркеры, основанные на ПЦР

В 1983 году Кэрри Б. Мюллисом была открыта полимеразная цепная реакция (ПЦР), за что автор был удостоен Нобелевской премии. Метод полимеразной цепной реакции предполагает использование специфических праймеров и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК. В 1985 году фирмой Cetus был впервые осуществлен ПЦР, а последующее использование термостабильной ДНК-полимеразы в ПЦР существенно расширило возможности ее применения.

К маркерам полимеразной цепной реакции относятся: STS, SSR, RAPD, SCAR, ISSR, AFLP, SSAP, IRAP, REMAP, RBIP, IPBS.

Ниже приведены наиболее часто используемые типы молекулярных маркеров.

**RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA, произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК) – один из методов анализа ДНК. Широко используется для определения генетического полиморфизма по всему геному в растениях. Маркеры обычно наследуются доминантно. Основными преимуществами метода является простота и скорость. Также он не требует знания последовательности ДНК и большого количества матрицы, недорог и может быть автоматизирован. Но существует проблема – чувствительность к изменениям условий реакции (буфер, полимеразы и концентрация компонентов реакции) и даже характеристик амплификатора. RAPD-метод можно использовать для поиска молекулярных маркеров, сцепленных с селективно важным геном, для изучения генетического разнообразия на различных культурах.

**ISSR** (Inter Simple Sequence Repeats, анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между простыми повторяющимися последовательностями – микросателлитами). Методика включает амплификацию сегментов ДНК между

двумя идентичными областями повторения микросателлитов, ориентированными в противоположном направлении, с использованием праймеров, сконструированных из областей ядра микросателлита. В этом методе используются микросателлитные праймеры, обычно длиной 16 – 25 п.н., из 2-нуклеотидных, 3-нуклеотидных, 4-нуклеотидных или 5-нуклеотидных повторов для целого множества геномных локусов. Праймеры могут быть либо незапущенными, либо более обычно закрепленными на 3' или 5' конце с 1 – 4 вырожденными основаниями, вытянутыми во фланкирующие последовательности. Праймеры ISSR вызывают полиморфизм всякий раз, когда один геном пропускает повторение этой последовательности или имеет делецию, вставку или транслокацию, которая изменяет расстояние между повторами. Праймеры, расположенные на 3'-конце, дают более четкую структуру полос по сравнению с теми, которые закреплены на 5'-конце. Маркеры ISSR имеют много преимуществ перед другими системами маркеров.

Технология ISSR проста, быстра и менее затратна, чем методика RAPD. Выявляемый полиморфизм с помощью ISSR, как правило, выше и более четко воспроизводим, чем с помощью RAPD. Разработка маркеров ISSR не требует предварительного изучения генома, подлежащего анализу; следовательно, это может использоваться универсально для анализа генома растения (Kunjurpillai, 2005).

**Микросателлиты (SSR, Simple Sequence Repeats, тандемы повторов простых последовательностей)** – участки ДНК, состоящие из тандемов повторяющихся единиц: моно-, ди-, три-, тетра- или пента-нуклеотидов. Микросателлиты присутствуют как в некодирующих, так и в кодирующих областях генома, а также в хлоропластном и митохондриальном геномах. Естественными причинами разнообразия в количестве повторов единиц микросателлитов в геноме является «проскальзывание» (slip page) полимеразы в ходе репликации ДНК, и/или несоответствующий кроссинговер, несовпадение/восстановление повреждений двойной нити, а также перемещения ретротранспозонов. Эти вариации приводят к полиморфизму подлине

фрагментов, выявляемых при электрофорезе. Этот тип генетических маркеров приобрел последнее десятилетие большую значимость благодаря комплексу свойств: гипервариабельность, мультиаллельная природа, кодоминантное наследование, высокая воспроизводимость, относительное обилие, экстенсивное распределение по геному, высокая пропускная способность, податливость автоматизации процесса. Это одна из наиболее информативных ДНК-систем молекулярного маркирования (М.Е. Омашева, К.П. Аубакирова, 2013).

#### **1.4.2 Методы селекции, основанные на использовании ДНК-маркеров**

Маркер-опосредованный отбор предполагает использование ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевым геном, вместо или вместе с фенотипическим анализом. Отбор нужного аллеля целевого гена осуществляется на основе тесно сцепленного с ним аллеля соседнего маркерного локуса. Большая точность отбора достигается при использовании пары маркеров, расположенных вблизи гена по разные стороны от него (т. е. маркеров, фланкирующих целевой ген). Если ген отсеквенирован и выявлены различия нуклеотидной последовательности разных аллелей данного гена, то можно разработать так называемый «внутригенный маркер». Использование такого маркера позволит отбирать нужные генотипы с наиболее высокой точностью. При отсутствии внутригенного или тесно сцепленного с геном ДНК-маркера можно использовать более отдаленные маркеры, однако в таких случаях целесообразно сочетать маркер-опосредованный отбор с последующим фенотипированием.

Метод маркер-опосредованного отбора хорошо зарекомендовал себя при беккроссной и линейной селекции, а также при создании пирамид генов.

Беккроссная селекция используется для передачи (интрогрессии) благоприятных признаков от донорского растения в элитный генотип (рекуррентный родитель). При повторных скрещиваниях происходит беккроссирование с рекуррентным родителем, пока большинство генов, происходящих от донора, не будут удалены. Однако донорные сегменты, прикрепленные к целевому аллелю, могут оставаться относительно большими даже после многих поколений беккросса. Маркеры могут использоваться для

управления целевым геном (выбор на переднем плане), для ускорения реконструкции рекуррентного родительского генотипа (выбор фона) или для выбора потомства обратного скрещивания с целевым геном и событиями рекомбинации между локусом-мишенью и связанные фланкирующие маркеры (рекомбинантный отбор). В традиционном скрещивании восстановление рекуррентного родительского генотипа требует более шести поколений, в то время как при маркер-опосредованном беккроссировании это может быть уменьшено только до трех поколений.

Используя MAS, несколько генов могут быть объединены в один генотип. Пирамидирование также возможно посредством обычной селекции, но обычно нелегко идентифицировать растения, содержащие более одного гена, и фенотипическое тестирование отдельных растений на все признаки может быть трудоемким и иногда очень трудным. Наиболее частая стратегия пирамидирования – объединение нескольких генов устойчивости. Различные гены устойчивости могут быть объединены для развития широкого спектра и длительной устойчивости, например, к болезням и насекомым. Для того чтобы выявить гены болезни пирамиды или устойчивости к вредителям, которые имеют сходные фенотипические эффекты и для которых часто не подходят подходящие расы, MAS может быть даже единственным практическим методом, особенно когда один ген маскирует присутствие других генов. При применении таких стратегий в практической селекции необходимо учитывать тот факт, что пирамиду необходимо повторять после каждого скрещивания (Melese, 2018).

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Растительный материал

Предварительное изучение для поиска молекулярного маркера мы проводили на расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр), предоставленная ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева».

Также молекулярное генотипирование проводили с использованием килоустойчивых образцов капусты белокочанной (*B.oleracea*), редьки (*R.sativus*) и ВС-потомств от межвидовой гибридизации (*B.oleracea* × *R.sativus*) из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева»:

- Килоустойчивые образцы капусты белокочанной (*B.oleracea*) – Килатон (коммерческий F1-гибрид), Гэс 15-5 (инбредная линия), Килатон×(Зенон×Агр) (линия), Текила×(Зенон×Агр) (линия);

- Восприимчивая к киле инбредная линия капусты белокочанной (*B.oleracea*) – Дт 46;

- Килоустойчивая инбредная линия редьки (*R.sativus*) – Да8-3 321;

- Растения ВС-потомства от межвидовой гибридизации (*B.oleracea* × *R.sativus*) - BBR, BBR1, BBR2, BBR3, BBR4, BBR5, BBR6, BBR7, BBR8, BBR9. Образцы BBR представляет собой ВС-потомство от межвидовой гибридизации F1 Килатон (*Brassica oleracea*) и инбредной линии Да8-3 321 (*Raphanus sativus*) с последующим беккроссированием капустой белокочанной. BBR 6, 7, 8, 9 имеют  $2n=18$  хромосом и фенотип капусты белокочанной, образцы BBR 1, 2, 3, 4, 5 - число хромосом  $2n>18$  и фенотип межвидового гибрида.

Дальнейшая работа проводилась с такими линиями капусты белокочанной как F2 Report-3 (бут.); Дт 46ф1131 (бут.).

### 2.2 Выделение ДНК из растительной ткани

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей – первичный этап в исследовании живого организма на молекулярном уровне. Для этого использовали свежую растительную ткань листьев. Выделение ДНК осуществляли СТАВ – методом, который позволяет получать препараты растительной ДНК с чистотой, достаточной для ПЦР, рестрикционного и



гибризационного анализа. СТАВ хорошо растворяет мембраны клеток. В основе метода лежит лизис клеток буфером на основе СТАВ (ЦТАБ – цетил-триметил-аммоний-бромид), депротинизация хлороформом и осаждение ДНК изопропанолом. Работу по маркированию проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), электрофореза.

Основные реактивы, которые были использованы:

- Одномолярный Трис pH = 7,5. Для его получения растворяли 121,1 г Трис в 800 мл воды. Доводили pH до необходимого значения добавлением концентрированной HCl и доводили объем до 1 л.
- 0,5 М ЭДТА pH = 8,0. К 186,1 г ЭДТА добавляли 800 мл воды. Доводили pH до 7,5 NaOH.
- 5 М NaCl. 29,25 г NaCl растворяли в 80 мл воды и доводили объем до 100 мл.
- 10 % SDS. 10 г SDS растворяли в 90 мл воды. Для ускорения растворения, нагревали раствор до 60 °С. Доводили pH до 7,2 добавлением нескольких капель концентрированной HCl и доводили до 100 мл.
- Экстракционный буфер (Extraction buffer) (на 100 мл): 20 мл 1 М Трис-HCl (pH-7,5), 5 мл 5 М NaCl, 5 мл 0,5 М ЭДТА, 5 мл 10 % SDS. Доводили водой объем раствора до 100 мл.
- Nucleic lysis buffer (100 мл): 20 мл 1 М Трис-HCl (pH = 7,5), 10 мл 0,5 М ЭДТА, 40 мл 5М NaCl, 2 г СТАВ. Доводили объем дистиллированной водой до 100 мл.

Порядок выделения ДНК

### 1. Приготовление буферной смеси.

Стаканчик ополаскивали дистиллированной водой. Далее, используя большие носики на 1мл, соединяли компоненты в емкость, согласно следующей таблице 2.1, и перемешивали.

**Таблица 2.1 - Буферный раствор для 1 и 12 образцов**

	1×	12×
<b>Ex. Buffer</b>	1,25 мл	5 мл
<b>Nuclei Buffer</b>	1,25 мл	5 мл

Sarkosyl 5%	0,5 мл	2 мл
-------------	--------	------

Четвертый компонент взвешивали на гладкой бумаге (при работе с весами закрывали дверцу после каждого действия). Включали весы, обнуляя значение, опускали бумагу и насыпали вещество. На 12 образцов необходимо:  $m$  (масса) ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )=0,02 грамм. Бумагу снимали с весов,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ссыпали в раствор. Выключали весы.

**2. Подготовка образцов (образцы должны быть подписаны).**

Ставили в подставку эппендорфы с небольшими кусочками образцов. В каждую пробирку добавляли по 200 мкл смеси (буферного раствора). Использовали носики на 200 мкл.

Кусочки образцов растирали пестиками до однородной массы (гомогенизированной). Перед растиранием нового образца пестик ополаскивали в дистиллированной воде, а затем просушивали фильтровальной бумагой. Подготавливали стаканчик.

**3. Устанавливали пробирки в подставку и добавляли в каждую ещё по 300 мкл буферного раствора (всего в каждой пробирке 500 мкл).**

Помещали пробирки в термостат (65 °С). Термостат нагревался за 2 - 3 минуты, когда температура достигала 65 °С, засекали 60 минут, в течение которых образцы прогревались. Каждые 15 минут пробирки аккуратно встряхивали.

Использовали прибор с наименованием термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит».

**4. Через час пробирки вынимались из термостата. В каждую пробирку добавлялось по 500 мкл хлороформа – делали это под вытяжкой. Переворачивали встряхиванием пробирки.**

**5. После добавления хлороформа, устанавливали пробирки в центрифугу на 10 мин при 13400 об/с.**

После установки готовили новые пробирки по числу образцов и подписывали их аналогично.

Осторожно доставали пробирки из центрифуги, и под вытяжкой при помощи пипетки с максимальным значением 1000 мкл, отбирали верхнюю прозрачную фракцию в объёме 400-500 мкл.

Между образцами меняли носик, в нескольких повторностях одного образца – носик промывали дистиллированной водой. Надосадочная жидкость (вытяжная фракция) сливалась в новые (подписанные) пробирки. Оставшиеся фракции выбрасывали.

**6.** В новые пробирки под вытяжкой добавляли по 300 мкл охлаждённого изопропанола, перемешивали и оставляли на 10 минут отстояться с закрытыми крышками. Затем снова ставили на центрифугу на 10 минут при 13400 об/с.

Осторожно доставали пробирки из центрифуги. На дне образовывалась маленькая частица с ДНК.

**7.** Промывание. Верхняя фракция (жидкость) сливалась в стаканчик. В пробирки добавлялось по 500 мкл 80 % спирта. Затем они устанавливались в центрифугу на 5 минут при 13400 об/с.

По окончании времени доставали пробирки, и спирт осторожно сливали. Затем снова заливали по 500 мкл спирта в каждую пробирку, и ставили в центрифугу ещё на 5 минут.

**8.** После также сливали спирт и с открытыми крышками ставили пробирки в сушку (на 10 минут, при температуре 45 °С) в концентратор Eppendorf Concentrator plus.

**9.** Через 15 минут доставали пробирки с ДНК и в каждую добавляли по 200 мкл дистиллированной воды.

**10.** Пробирки ставили в холодильник с низкой положительной температурой, на 1-2 дня, а затем в морозилку.

Проводили измерение концентрации ДНК в образцах с использованием NanoPhotometer™ P 330 (Implen GmbH Schatzbogen 52 D-81829 München) согласно инструкции производителя.

## 2.3 Амплифицирование геномной ДНК с праймерами

### 2.3.1 Амплификации с RAPD – праймерами

Реактивы для проведения амплификации хранились в морозильнике при температуре минус 20 °С. Смешивание реактивов проводилось на льду.

1. На каждый образец ДНК брали по пробирке, и еще одну в качестве контроля. Во все пробирки добавляли по 1,5 мкл ДНК, а в отдельную пробирку – 1,5 мкл дистиллированной воды. Все пробирки подписывали.

2. Реагенты для смеси (кроме образцов ДНК) размешивали на Microspin Fv-2400, а после осаждали на центрифуге.

3. Готовили реакционную смесь (master mix) согласно таблице 2.2.

**Таблица 2.2 - Реактивы для проведения реакции амплификации**

Очередность	Смесь	Количество образцов, шт/ мкл	
		1	6
1	Вода	15,2	91,2
2	Super taq 10x буфер	3	18
3	dNTP's	2,4	14,4
4	MgCl <sub>2</sub>	1,2	7,2
5	Праймер	4	24
6	Полимераза	0,1	0,6
<b>Итого:</b>		<b>25,9</b>	<b>155,4</b>

Примечание: полимеразы добавляется в последнюю очередь, достается из морозильника непосредственно перед применением, а после - сразу же убирается, так как теряет ферментативную активность).

4. Смесь вносили в пробирки с образцами ДНК и в пробирку контроль.

5. Затем центрифугировали пробирки в течение нескольких секунд в настольной центрифуге Microspin Fv – 2400 и переносили в амплификатор Bio-Rad T100 (BIO-RAD), Терцик.

6. После этого устанавливали пробирки в амплификатор Bio-Rad T100 и запускали необходимую программу амплификации ДНК.

1) 94 °С – 3,0 мин

2) 94 °С – 1 минута

3) 38 °С – 1 минута

4) 72 °С – 1,30 минуты

5) [2-4] x 35

6) 72 °C – 5 минут

7) 10 °C – ∞

### 2.3.2 Проведение амплификаций с праймерами Tau\_cBRCR404 (BrCr026F; BrCr492R), B0902F(R) и GC3060F(R).

Работу проводили на льду.

На каждый образец ДНК брали по пробирке, и ещё одну пробирку в качестве контроля заполняли дистиллированной водой. Все пробирки подписывали. В каждую пробирку добавляли по 1 мкл ДНК, в пробирку – контроль добавляли, соответственно, 1 мкл воды.

Перед приготовлением смеси все реагенты (кроме образцов ДНК, они размешивались осторожно, вручную, щелчком по пробирке) были размешаны на Microspin Fv – 2400, после перемешивания реактивы осаждались на центрифуге. При осаждении все пробирки в центрифуге должны быть уравновешены.

Mastermix (реакционная смесь). Готовилась в 1 эппендорфе не более чем на 14 образцов согласно таблице 2.3.

**Таблица 2.3 - Реактивы для проведения реакции амплификации**

Очередность	Смесь	Количество образцов, шт	
		1	6
1	Вода	6,8	40,8
2	Super taq 10x буфер	1	6
3	dNTP`s	0,4	2,4
4	Праймер F	0,4	2,4
5	Праймер R	0,4	2,4
6	Полимераза	0,05	0,3
<b>Итого:</b>		<b>9,05</b>	<b>54,3</b>

Перед добавлением смеси к пробиркам с ДНК, её перемешивали на Microspin Fv – 2400, после перемешивания осаждали на центрифуге.

Пробирки устанавливались в амплификатор Bio-Rad T100. Программа:

1) 94 °C – 3,0 минуты

2) 94 °C – 1 минута

3) 58 °C – 1 минута

4) 72 °C – 1 минуты

5) [2-4] x 35

6) 72 °C – 5 минут

7) 10 °C – ∞

Доставали пробирки из амплификатора, убрали в холодильник (по завершении программы). Программу останавливали, амплификатор выключали.

## 2.4 Гель-электрофорез

Электрофорез представляет собой метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

Сущность метода заключается в том, что молекулы ДНК, заряженные отрицательно, под действием силы электрического поля движутся от отрицательного электрода – катода (минус) к положительному электроду – аноду (плюс). Агарозный гель, являясь вязкой средой препятствует продвижению макромолекул – образцов ДНК, в связи с этим, короткие фрагменты ДНК движутся к аноду быстрее, чем длинные. Отношение величины заряда нуклеиновых кислот, мало зависящей от рН окружающей среды, к их массе практически одинаково, поэтому метод электрофореза в агарозном геле позволяет определять только размеры различных фрагментов ДНК.

1. Для проведения электрофореза приготавливали 0,5X TBE буфер (Трис-боратный буфер), который необходим для агарозного геля и заполнения электрофорезной камеры.

Для приготовления 1000 мл 5X TBE буфера использовали 53 г триса, 27,5 г борной кислоты и 20 мл 0.5 М EDTA (рН = 8.0), которые растворяли в дистиллированной воде. Доводили рН до 8,0 с помощью раствора NaOH. 0,5X TBE буфер готовили из 5X TBE буфера, а именно 100 мл 5xTBE+900 мл дистиллированной воды.

2. Для приготовления геля брали 1 г агарозы и добавляли 100 мл 0,5X TBE буфер (Трис-боратный буфер). Колбу закрывали фольгой.

3. Колбу с раствором ставили в микроволновую печь на 1-2 минуты, до полного растворения агарозы (прозрачный раствор).

4. После расплавления агарозы охлаждали под вытяжкой приблизительно до 50 – 60 °С, помешивая для предотвращения образования комков.

5. При помощи регулировочных винтов устанавливали камеру горизонтально. Фиксировали одну или несколько гребёнок в соответствующих пазах по бокам камеры.

6. Затем заливали раствор в плашку с гребёнкой. При этом необходимо избегать образования пузырьков. Толщина геля должна составлять 0,5 – 0,7 см.

7. Оставляли гель для застывания при комнатной температуре на 20 – 30 минут.

8. Для подготовки электрофорезной камеры ее предварительно заполняли буфером TBE 0,5X. Из геля осторожно доставали гребенку и переносили его в камеру для электрофореза. Гель должен быть закрыт буфером на 1-2 мм.

9. К амплифицированному материалу (ДНК) вносили загружающий буфер с красителем и дистиллированную воду. 3 мкл – загружающий буфер, 4 мкл – раствор с ДНК, 2 мкл – дистиллированная вода.

10. Готовили в отдельной пробирке маркер молекулярной массы (5 мкл) и загружающий буфер (1 мкл), затем вносили его в крайнюю лунку.

11. Реакционную смесь с буфером вносили в лунки геля по 6 мкл.

12. Электрофорез проводили при 120В до тех пор, пока краситель не пройдет 5 – 6 см от края геля на 40 – 60 минут.

13. Визуализацию продуктов амплификации проводили под УФ-излучением после окрашивания красителем Gel Red. После выключения электрофорезной камеры, гель осторожно доставали и переносили на УФ-транслюминатор. В ультрафиолетовом свете окрашенные фрагменты амплифицированной ДНК флюоресцировали. Работали с опущенным защитным экраном и в защитных очках. Результат наблюдали в виде бэндов.

Для визуализации результатов амплификации были использованы: камера для электрофореза SE-2 (ООО «Компания Хеликон») и источник питания «Эльф-8» (ООО «ДНК-Технология»).

## **2.5 Посев и выращивание растений**

Для посева использовались кассеты 8×8. Ячейки кассеты наполняли верховым торфом, увлажняли. Посев проводили в лунки глубиной 0,5 см. Далее полив был по мере необходимости.

Использованные образцы: F2 Report-3 (бут.) – 3 кассеты (192 семени); Дт 46ф1131 (бут.) – 1/2 кассеты (32 семени).

## **2.6 Оценка устойчивости к киле на инфекционном фоне**

Анализ устойчивости/восприимчивости растений проводили на искусственном инфекционном фоне. Для инокуляции использовали суспензию спор с концентрацией  $3 \times 10^6$  спор/мл.

Посев проводили с немедленным внесением суспензии спор килы, используя модификацию пипеточного метода. Для приготовления суспензии спор использовались свежие желваки сильно пораженного растения.

Инокуляцию растений проводили в фазе семядольных листьев при температуре 20 – 22 °С и влажности до 90 % добавлением в ячейки кассет 2 мл суспензии инокулюма.

Получение суспензии спор для инокуляции: 5 г свежих желваков измельчали на тёрке. Полученную гомогенную массу разводили в чистой воде, интенсивно размешивали и настаивали несколько минут. Полученный инокулюм фильтровали через четырёхслойную марлю. Далее определяли концентрацию спор в суспензии с использованием камеры Горяева, и разведением чистой водой доводят до необходимой концентрации.

Для заражения используем свежеприготовленную суспензию спор патогена. В ячейки кассет добавляли по 2 мл рабочей суспензии инокулюма.

Установлено, что оптимальная влажность почвы (субстрата) для развития возбудителя составляет 70 – 90 % от полной полевой влагоёмкости. При



уменьшении влажности почвы до 45 % заражение растений сильно снижается, а при 30 % прекращается. С другой стороны, повышение влажности почвы до 98 – 100 % также препятствует нормальному развитию гриба. Оптимальная температура воздуха составляет 20 – 25 °С, максимальная – 35 °С.

## 2.7 Учёт устойчивости/восприимчивости растений

Учёт устойчивости/восприимчивости растений проводили глазомерно. Через 40 – 45 дней после инокуляции растения извлекали из субстрата, корни отмывали. Оценку проводили по четырех-балльной шкале: 0 – 3 балла (Buczacki et al., 1975).

Шкала симптомов поражения килой:

- 0 баллов – нет поражения,
- 1 балл – мелкие желваки на боковых корнях,
- 2 балла – сильное поражение боковых корней и слабое главного корня;
- 3 балла – сильное поражение главного и боковых корней.

Распространённость болезни (частота встречаемости) – это количество больных растений выраженное в процентах. Вычисляют эту величину по формуле:

$$P = \frac{n}{N} \times 100 \%, \quad (2.1)$$

где P – распространённость болезни,  
n – количество больных растений в пробах,  
N – общее число растений в пробах.

Развитие (индекс) болезни рассчитывают по формуле:

$$R = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} \times 100 \%, \quad (2.2)$$

где R – развитие болезни,  
 $\sum(a \times b)$  – сумма произведений числа растений на соответствующий им балл поражения,  
N – общее количество учтённых растений,  
K – высший балл шкалы учёта.

## 2.8 Оценка силы сцепления маркер/признак

$$\chi^2 = \sum \frac{(P_{\phi} - P_{\tau})^2}{P_{\tau}}, \quad (2.3)$$

где  $\chi^2$  – критерий согласия Пирсона,

$P_{\phi}$  – фактическая частота растений,

$P_{\tau}$  – теоретическая частота растений.

Частота рекомбинации:

$$rf = \frac{(K_p + K_{\phi})}{\text{Общ.ч.раст.}} \times 100 \%, \quad (2.4),$$

где  $rf$  – частота рекомбинации,

$K_p$  – реальное значение заражённых значений,

$K_{\phi}$  – фактическое значение заражённых растений,

Общ. ч. раст. – общее число растений.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Результаты по маркеру GC3060 на ген CRa

Предварительно было подготовлено 2 BULKа:

1BULK – по 10 мкл всех восприимчивых образцов (S) Текила×(Зенон×Агр)

2BULK – по 10 мкл всех устойчивых образцов (R) Текила×(Зенон×Агр)

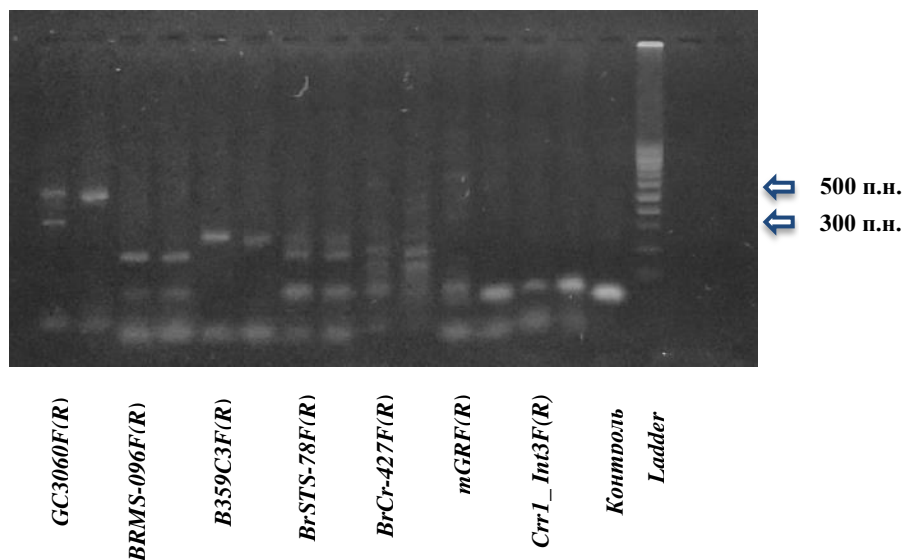


Рисунок 1 – Сегрегационный анализ полиморфных SSR маркеров: Ladder – маркер молекулярного веса 300 п.н. маркера GC3060

Анализ позволил нам выделить маркер GC3060, у которого наблюдался полиморфизм. В связи с этим дальнейшее изучение осуществлялось с данным маркером на всей расщепляющейся популяции.

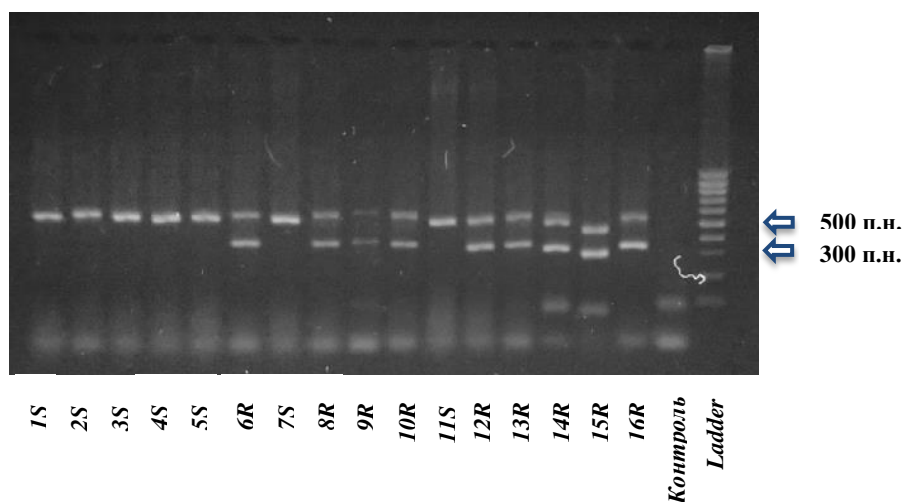


Рисунок 2 – Анализ потенциального SSR маркера GC3060 на 16 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

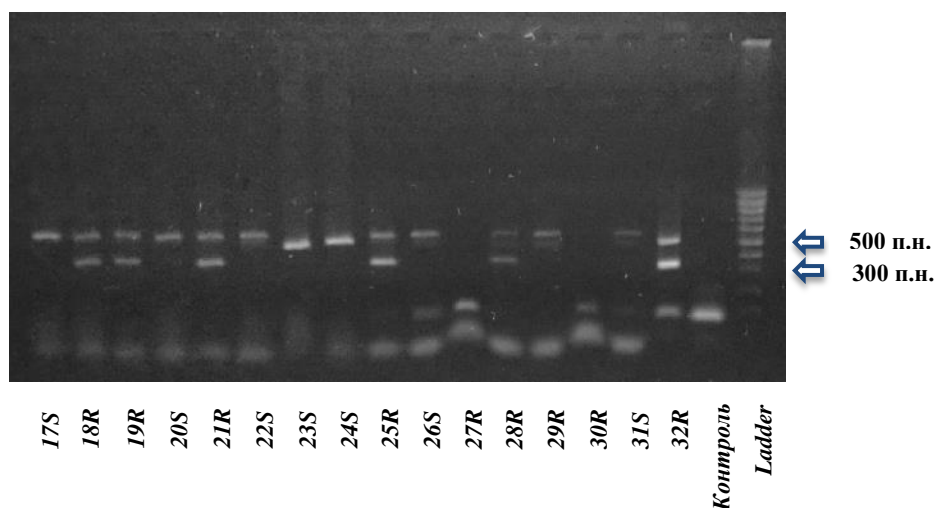


Рисунок 3 – Анализ потенциального SSR маркера GC3060 на 16 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

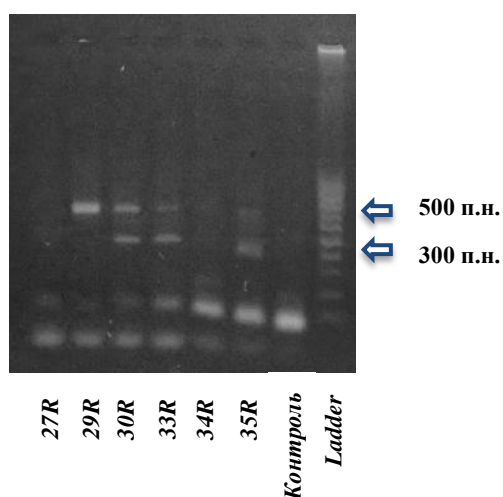


Рисунок 4 – Анализ потенциального SSR маркера GC3060 на 6 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

**Таблица 3.1 - Оценка устойчивости капусты белокочанной к киле с использованием маркера GC3060**

Образец для оценки: Текила×(Зенон×Агр)

№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R	№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R
1	-	S	19	+	R
2	-	S	20	-	S
3	-	S	21	+	R
4	-	S	22	-	S
5	-	S	23	-	S
6	+	R	24	-	S
7	-	S	25	+	R
8	+	R	26	-	S

Продолжение таблицы 3.1

9	+	R	28	+	R
10	+	R	29	-	R
11	-	S	30	+	R
12	+	R	31	-	S
13	+	R	32	+	R
14	+	R	33	+	R
15	+	R	35	+	R
16	+	R			
17	-	S			
18	+	R			

Примечание: R - устойчивость к киле, S – восприимчивость к киле, (+) - присутствие маркера или (-) - отсутствие маркера GC3060.

Исходя из таблицы 3.1, получилось 14 восприимчивых (14 S) и 19 устойчивых образцов (19 R).

Из формулы (2.3) следует:  $X^2 = \frac{(14-16,5)^2}{16,5} + \frac{(19-16,5)^2}{16,5} = 0,5 + 0,5 = 0,76;$

$X^2_{\text{табл.}} = 3,84;$

$X^2 < X^2_{\text{табл.}}$  Следовательно, отношение R:S = 1:1.

Далее определим частоту рекомбинации по формуле  $rf = \frac{N}{N_0} \times 100\%$ ,

где N – количество рекомбинантов,  $N_0$  – общее количество потомков.

Первый вариант кроссоверного потомства:

1) + R; 2) – S; 3) + S; 4) – R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{1}{33} \times 100\% = 3,03\%$ .

Второй вариант кроссоверного потомства:

1) – R; 2) + S; 3) – S; 4) + R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{32}{33} \times 100\% = 96,9\%$ .

**Таблица 3.2 - Наследование маркеров среди сегрегирующих по устойчивости к киле растений популяции Текила×(Зенон×Агр)**

ДНК-маркер	Сегрегация растений						Частота рекомбинации, %	
	RAPD-маркер		RAPD-маркер и устойчивость к киле					
	+:-	$\chi^2$	R/+	S/+	R/-	S/-		$\chi^2$
GC3060	18:15	0,28	18	0	1	0	12,6	3,03
369RAPD	7:28	12,6	4	3	17	11	66,46	42,9

Продолжение таблицы 3.2

466RAPD	6:29	15,12	3	3	18	11	71,44	40
587RAPD	19:16	0,26	11	8	10	6	12,58	48,6
337RAPD	19:16	0,26	12	7	9	7	14,51	54,3
327RAPD	15:20	0,72	7	8	14	6	23,54	37,1

Примечание: R – устойчивость к киле; S - восприимчивость к киле; «+» - присутствует маркер; «-» - отсутствует маркер. Для вероятности ошибки  $p \leq 0.05$  и  $df = 1$  критическое значение  $\chi^2 = 3.84$ , а для  $df = 3$   $\chi^2 = 7.81$ .

После проведения оценки силы сцепления маркеров SSR и RAPD можно сказать, что маркер GC3060 сцеплен с геном устойчивости, и частота рекомбинации составляет 3,03 сМ. У RAPD маркеров частоты рекомбинации варьируются от 37,1 сМ для 327 RAPD до 54,3 сМ для 337 RAPD маркера.

Известно, что для эффективного использования молекулярных маркеров в селекции рекомендуются маркеры, расположенные на расстоянии менее 5 сМ от целевого гена. В данном исследовании был выделен маркер GC3060, который находится наиболее близко к гену устойчивости, для дальнейшего изучения и обеспечения высокоэффективного маркирования гена устойчивости линии Текила×(Зенон×Агр). При амплификации с GC3060F(R) праймером получено два фрагмента на агарозном геле, один из них имеет размер около 300 п.н., а другой 500 п.н., обозначенный стрелкой на рисунках 2,3,4. По последнему фрагменту можно дифференцировать устойчивые и восприимчивые образцы.

### 3.2 Результаты по кандидатам

В ходе исследования разных групп праймеров были выявлены в качестве кандидатов некоторые RAPD праймеры. Электрофорез после ПЦР-анализа показал наличие у них полиморфных участков. Ниже проиллюстрируем сказанное.

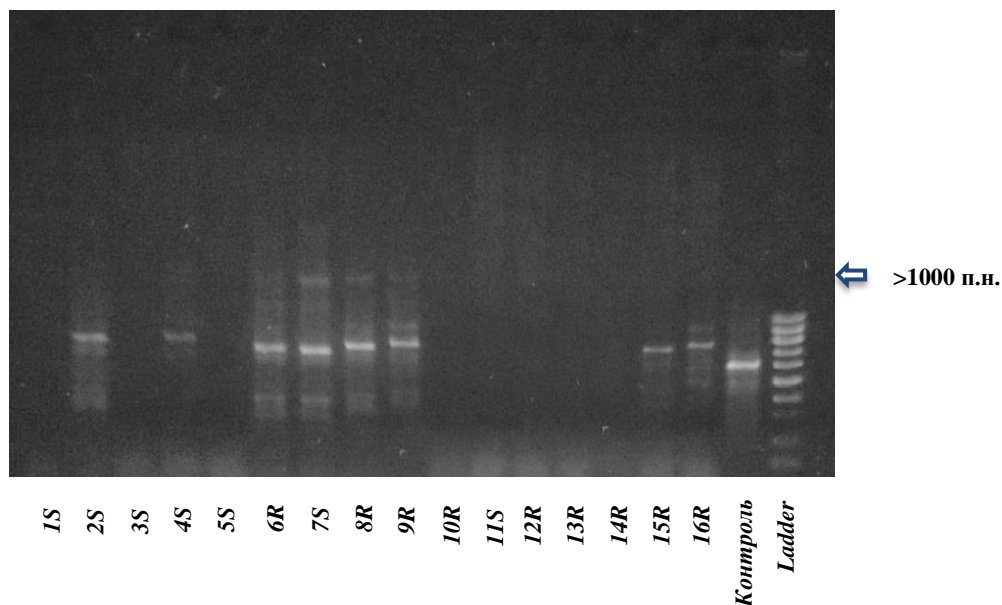


Рисунок 5 – Анализ потенциального маркера 369RAPD на 16 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

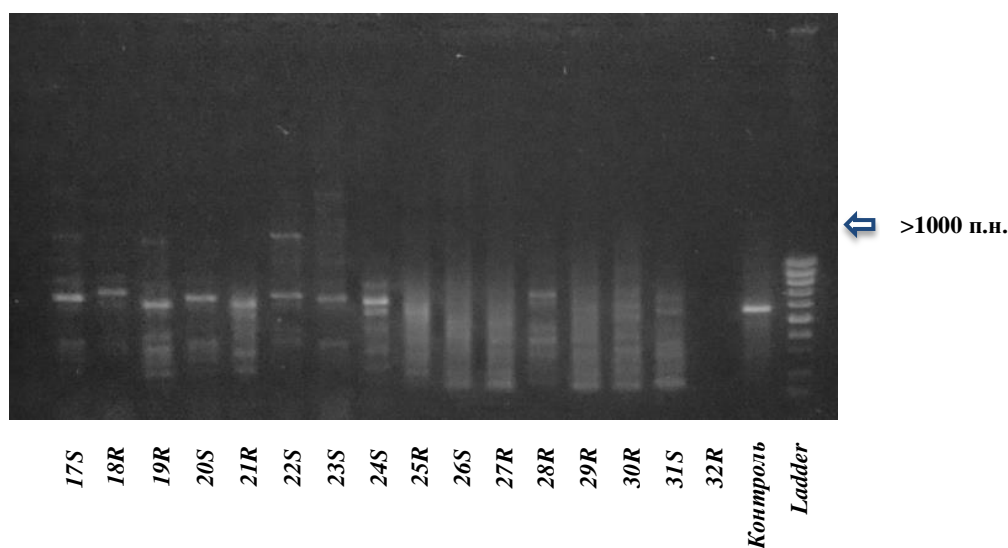


Рисунок 6 – Анализ потенциального маркера 369 RAPD на 16 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

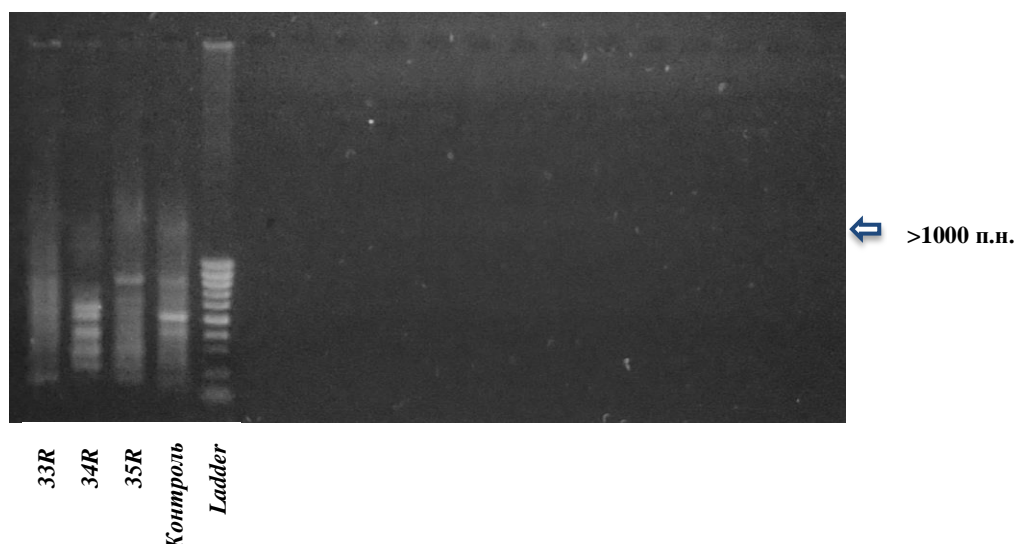


Рисунок 7 – Анализ потенциального маркера 369RAPD на 3 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

**Таблица 3.3 - Оценка устойчивости капусты белокочанной к киле с использованием маркера 369RAPD**

Образец для оценки: Текила×(Зенон×Агр)

№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R	№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R
1	-	S	19	+	R
2	-	S	20	-	S
3	-	S	21	-	R
4	-	S	22	+	S
5	-	S	23	-	S
6	+	R	24	-	S
7	+	S	25	-	R
8	+	R	26	-	S
9	+	R	27	-	R
10	-	R	28	-	R
11	-	S	29	-	R
12	-	R	30	-	R
13	-	R	31	-	S
14	-	R	32	-	R
15	-	R	33	-	R
16	-	R	34	-	R
17	+	S	35	-	R
18	-	R			

Примечание: R - устойчивость к киле, S – восприимчивость к киле, (+) - присутствие маркера или (-) - отсутствие маркера 369RAPD.

Исходя из таблицы 3.3, получилось 14 восприимчивых (14 S) и 21 устойчивых образцов (21 R).



Из формулы (2.3) следует:  $X^2 = \frac{(14-17,5)^2}{17,5} + \frac{(21-17,5)^2}{17,5} = 0,7 + 0,7 = 1,4;$

$X^2_{\text{табл.}} = 3,84;$

$X^2 < X^2_{\text{табл.}}$ . Следовательно, отношение R:S = 1:1.

Далее определим частоту рекомбинации по формуле  $rf = \frac{N}{N_0} \times 100 \%$ ,

где N – количество рекомбинантов,  $N_0$  – общее количество потомков.

Первый вариант кроссоверного потомства:

1) + R; 2) – S; 3) + S; 4) – R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{15}{35} \times 100 \% = 42,9 \%$ .

Второй вариант кроссоверного потомства:

1) – R; 2) + S; 3) – S; 4) + R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{20}{35} \times 100 \% = 57,1 \%$ .

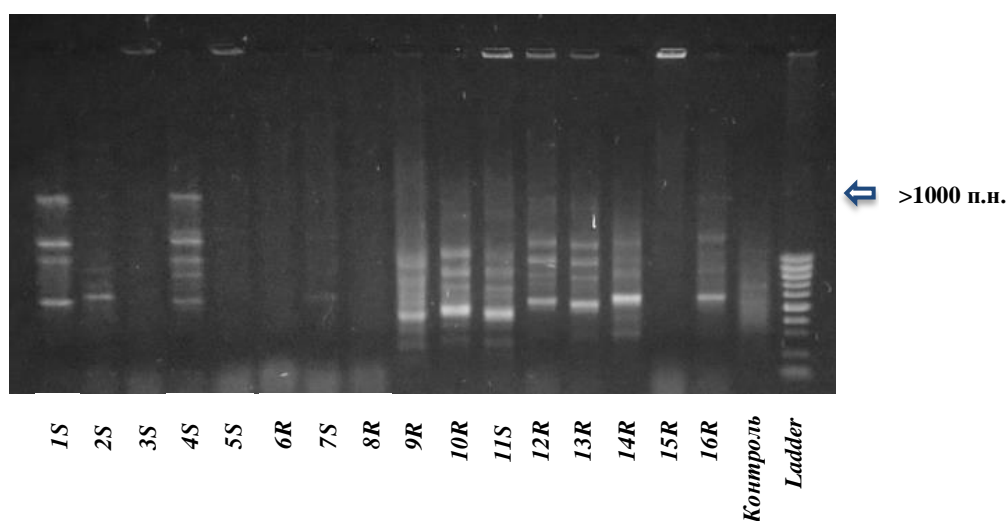


Рисунок 8 – Анализ потенциального маркера 466 RAPD на 16 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

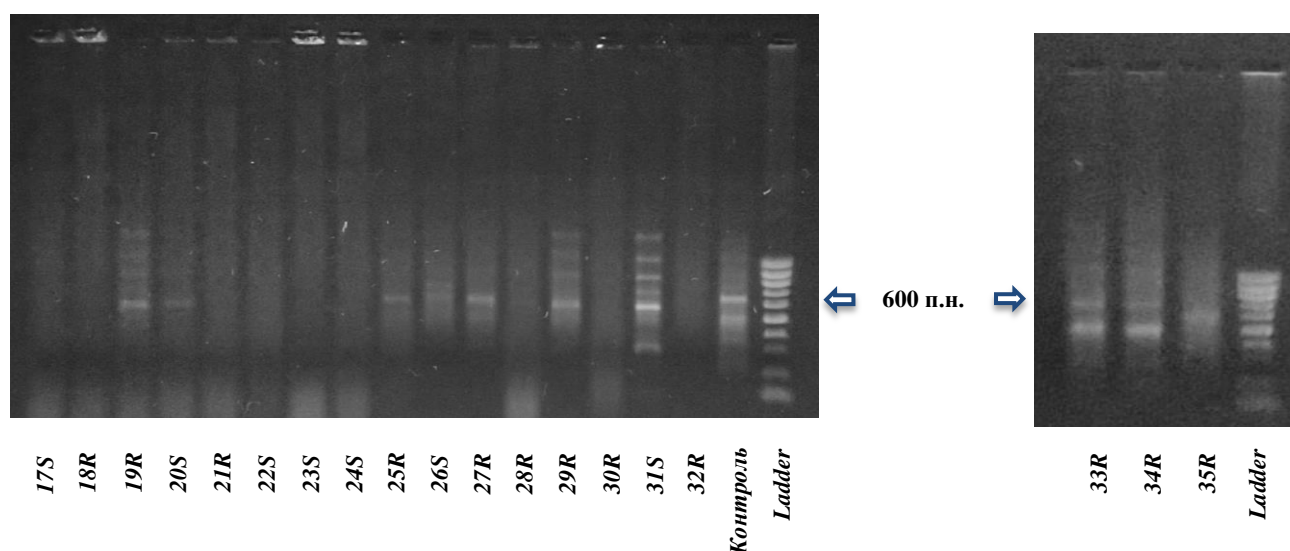


Рисунок 9 – Анализ потенциального маркера 466 RAPD на 19 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

**Таблица 3.4 - Оценка устойчивости капусты белокочанной к киле с использованием маркера 466RAPD**

Образец для оценки: Текила×(Зенон×Агр)

№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R	№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R
1	+	S	19	+	R
2	-	S	20	-	S
3	-	S	21	-	R
4	+	S	22	-	S
5	-	S	23	-	S
6	-	R	24	-	S
7	-	S	25	-	R
8	-	R	26	-	S
9	-	R	27	-	R
10	-	R	28	-	R
11	-	S	29	+	R
12	-	R	30	-	R
13	-	R	31	+	S
14	-	R	32	-	R
15	-	R	33	-	R
16	+	R	34	-	R
17	-	S	35	-	R
18	-	R			

Примечание: R - устойчивость к киле, S – восприимчивость к киле, (+) - присутствие маркера или (-) - отсутствие маркера 466RAPD.

Исходя из таблицы 3.4, получилось 14 восприимчивых (14 S) и 21 устойчивых образцов (21 R).

Из формулы (2.3) следует:  $X^2 = \frac{(14-17,5)^2}{17,5} + \frac{(21-17,5)^2}{17,5} = 0,7 + 0,7 = 1,4;$

$X^2_{\text{табл.}} = 3,84;$

$X^2 < X^2_{\text{табл.}}$ . Следовательно, отношение R:S = 1:1.

Далее определим частоту рекомбинации по формуле  $rf = \frac{N}{N_0} \times 100 \%$ ,

где N – количество рекомбинантов,  $N_0$  – общее количество потомков.

Первый вариант кроссового потомства:

1) + R; 2) – S; 3) + S; 4) – R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{14}{35} \times 100 \% = 40 \%$ .

Второй вариант кроссового потомства:

1) – R; 2) + S; 3) – S; 4) + R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{21}{35} \times 100 \% = 60 \%$ .

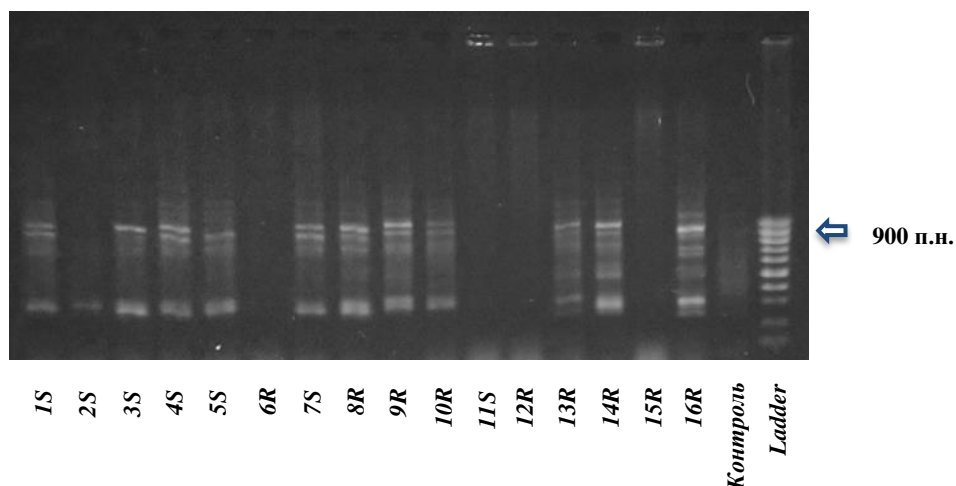


Рисунок 10 – Анализ потенциального маркера 587 RAPD на 16 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

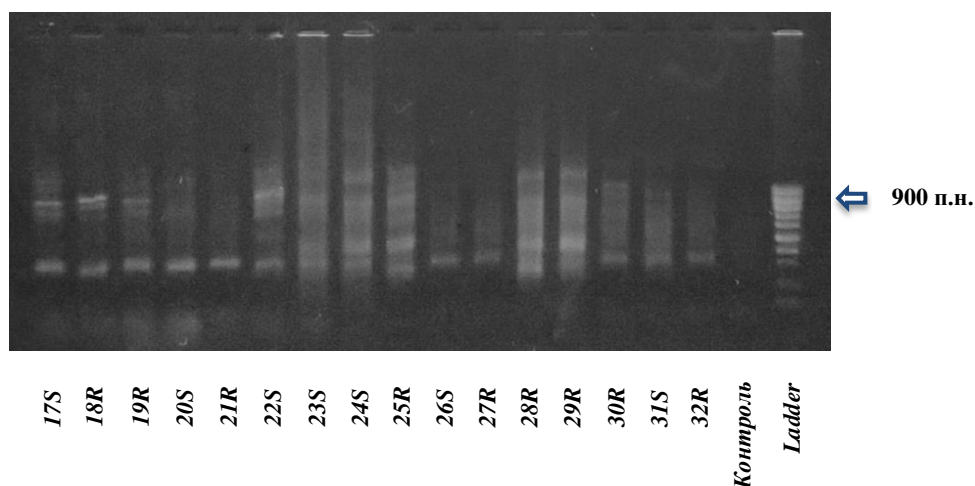


Рисунок 11 – Анализ потенциального маркера 587 RAPD на 16 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

**Таблица 3.5 - Оценка устойчивости капусты белокочанной к киле с использованием маркера 587RAPD**

Образец для оценки: Текила×(Зенон×Агр)

№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R	№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R
1	+	S	19	+	R
2	-	S	20	-	S
3	+	S	21	-	R
4	+	S	22	+	S
5	-	S	23	+	S
6	-	R	24	+	S
7	+	S	25	+	R
8	+	R	26	-	S
9	+	R	27	-	R
10	+	R	28	+	R
11	-	S	29	+	R
12	-	R	30	-	R
13	+	R	31	-	S
14	+	R	32	-	R
15	-	R	33	-	R
16	+	R	34	-	R
17	+	S	35	-	R
18	+	R			

Примечание: R - устойчивость к киле, S – восприимчивость к киле, (+) - присутствие маркера или (-) - отсутствие маркера 587RAPD.

Исходя из таблицы 3.5, получилось 14 восприимчивых (14 S) и 21 устойчивых образцов (21 R).

Из формулы (2.3) следует:  $X^2 = \frac{(14-17,5)^2}{17,5} + \frac{(21-17,5)^2}{17,5} = 0,7 + 0,7 = 1,4;$

$X^2_{\text{табл.}} = 3,84;$

$X^2 < X^2_{\text{табл.}}$ . Следовательно, отношение R:S=1:1.

Далее определим частоту рекомбинации по формуле  $rf = \frac{N}{N_0} \times 100 \%$ ,

где N – количество рекомбинантов,  $N_0$  – общее количество потомков.

Первый вариант кроссового потомства:

1) + R; 2) – S; 3) + S; 4) – R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{17}{35} \times 100 \% = 48,6 \%$ .

Второй вариант кроссового потомства:

1) – R; 2) + S; 3) – S; 4) + R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{18}{35} \times 100 \% = 51,5 \%$ .

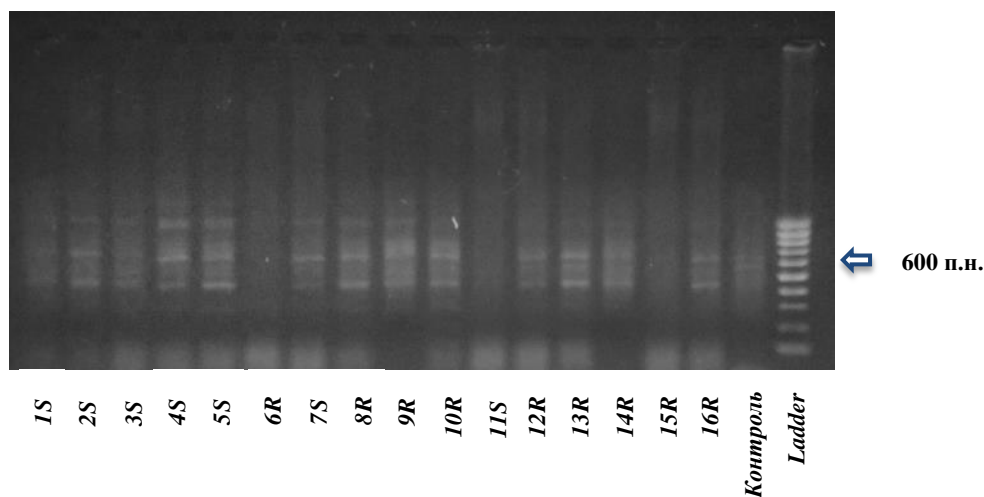


Рисунок 12 – Анализ потенциального маркера 337RAPD на 16 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

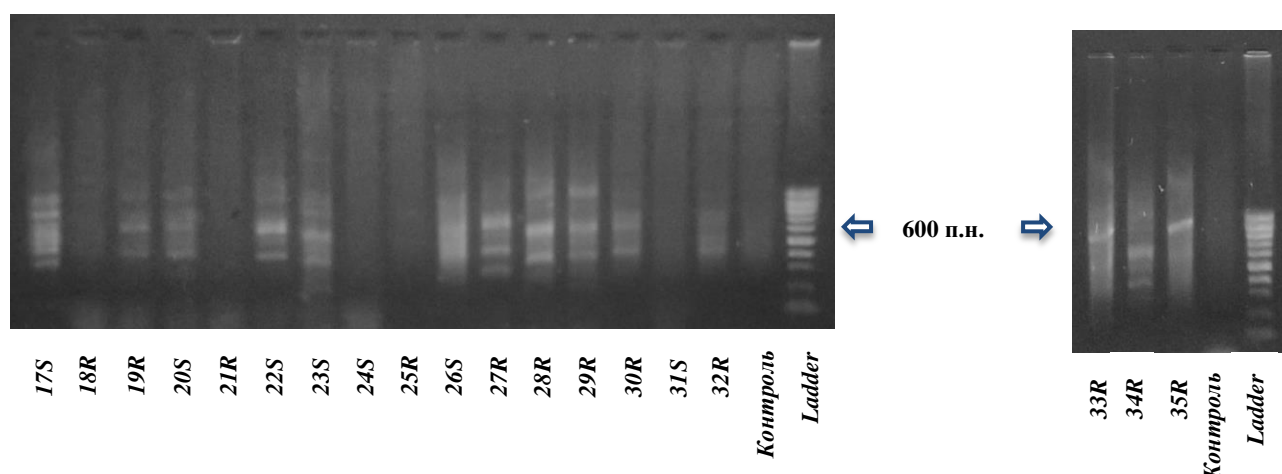


Рисунок 13 – Анализ потенциального маркера 337RAPD на 19 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

**Таблица 3.6 - Оценка устойчивости капусты белокочанной к киле с использованием маркера 337RAPD**

Образец для оценки: Текила×(Зенон×Агр)

№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R	№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R
1	-	S	19	+	R
2	+	S	20	+	S
3	-	S	21	-	R
4	+	S	22	+	S
5	+	S	23	-	S
6	-	R	24	-	S
7	+	S	25	-	R
8	+	R	26	-	S
9	+	R	27	+	R
10	+	R	28	+	R
11	-	S	29	+	R
12	+	R	30	+	R
13	+	R	31	-	S
14	+	R	32	-	R
15	-	R	33	-	R
16	+	R	34	-	R
17	+	S	35	-	R
18	-	R			

Примечание: R - устойчивость к киле, S – восприимчивость к киле, (+) - присутствие маркера или (-) - отсутствие маркера 337RAPD.

Исходя из таблицы 3.6, получилось 14 восприимчивых (14 S) и 21 устойчивых образцов (21 R).

Из формулы (2.3) следует:  $X^2 = \frac{(14-17,5)^2}{17,5} + \frac{(21-17,5)^2}{17,5} = 0,7 + 0,7 = 1,4$ ;

$X^2_{\text{табл.}} = 3,84$ ;

$X^2 < X^2_{\text{табл.}}$ . Следовательно, отношение R:S = 1:1.

Далее определим частоту рекомбинации по формуле  $rf = \frac{N}{N_0} \times 100 \%$ ,

где N – количество рекомбинантов,  $N_0$  – общее количество потомков.

Первый вариант кроссоверного потомства:

1) + R; 2) – S; 3) + S; 4) – R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{19}{35} \times 100 \% = 54,3 \%$ .

Второй вариант кроссоверного потомства:

1) – R; 2) + S; 3) – S; 4) + R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{16}{35} \times 100 \% = 45,7 \%$ .

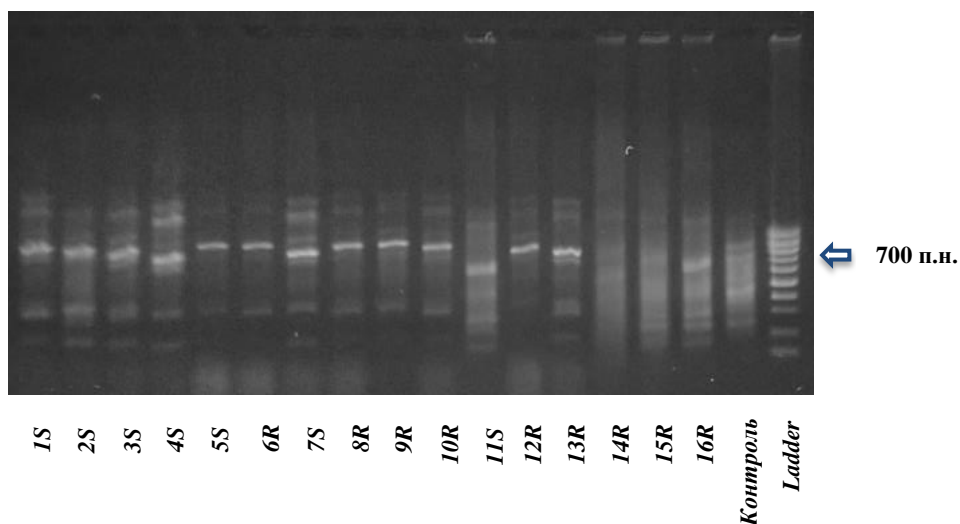


Рисунок 14 – Анализ потенциального маркера 327RAPD на 16 растениях расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр)

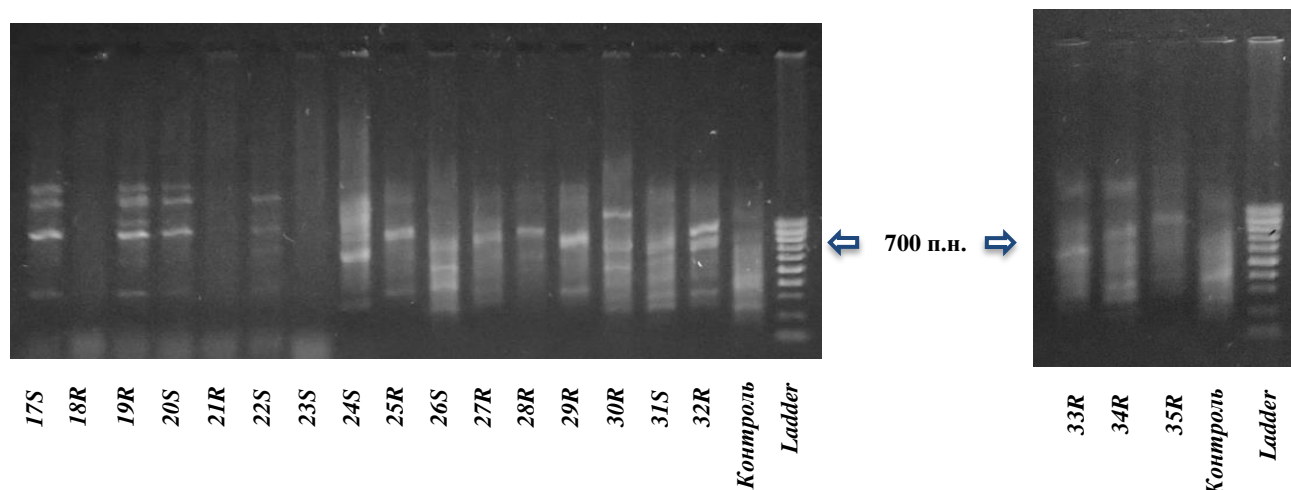


Рисунок 15 – Анализ потенциального маркера 327RAPD на 19 растениях расщепляющей популяции Текила×(Зенон×Агр)

**Таблица 3.7 - Оценка устойчивости капусты белокочанной к киле с использованием маркера 327RAPD**

Образец для оценки: Текила×(Зенон×Агр)

№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R	№ образца	Наличие бенда (+/-)	S/R
1	+	S	19	-	R
2	-	S	20	-	S
3	+	S	21	-	R
4	+	S	22	+	S
5	-	S	23	-	S
6	-	R	24	+	S
7	+	S	25	-	R
8	-	R	26	+	S
9	-	R	27	-	R
10	-	R	28	+	R
11	+	S	29	+	R
12	-	R	30	+	R
13	+	R	31	-	S
14	-	R	32	+	R
15	-	R	33	-	R
16	+	R	34	+	R
17	-	S	35	-	R
18	-	R			

Примечание: R - устойчивость к киле, S – восприимчивость к киле, (+) - присутствие маркера или (-) - отсутствие маркера 327RAPD.

Исходя из таблицы 3.7, получилось 14 восприимчивых (14 S) и 21 устойчивых образцов (21 R).



Из формулы (2.3) следует:  $X^2 = \frac{(14-17,5)^2}{17,5} + \frac{(21-17,5)^2}{17,5} = 0,7 + 0,7 = 1,4;$

$X^2_{\text{табл.}} = 3,84;$

$X^2 < X^2_{\text{табл.}}$  Следовательно, отношение R:S = 1:1.

Далее определим частоту рекомбинации по формуле  $rf = \frac{N}{N_0} \times 100 \%$ ,

где N – количество рекомбинантов,  $N_0$  – общее количество потомков.

Первый вариант кроссоверного потомства:

1) + R; 2) – S; 3) + S; 4) – R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{13}{35} \times 100 \% = 37,1 \%$ .

Второй вариант кроссоверного потомства:

1) – R; 2) + S; 3) – S; 4) + R.

Частота рекомбинации по формуле (2.4):  $rf = \frac{22}{35} \times 100 \% = 62,9 \%$ .

### 3.3 Результаты анализа наличия/отсутствия полиморфизма

Был проведен массовый сегрегационный анализ BSA с использованием ДНК растений устойчивой PR и восприимчивой PS родительских линий капусты белокочанной с целью поиска RAPD-маркеров, генетически сцепленных с новым локусом устойчивости к киле.

На основании полученных данных из 134 RAPD-праймеров было выявлено 32 маркеров, обнаруживающих полиморфизм между растениями линий PR и PS. Тем не менее только пять (369, 466, 587, 337 и 327) имели слабое сцепление с признаком устойчивости 37,1-54,3 сМ. Из 40 SSR и 15 Indel праймеров только у 10 SSR и 6 Indel обнаружен полиморфизм. Выявлен маркер GC3060, сцепленный с геном устойчивости к киле. Сила сцепления составляет 3,03 сМ.

В соответствии с рис. 2,3,4 можно сказать, что из генома растений PR при использовании праймера GC3060 амплифицировался фрагмент ДНК размером от 300 до 500 пар нуклеотидов (п.н.); рис. 5,6,7 - при использовании праймера 369 амплифицировался фрагмент размером более 1000 п.н.; рис. 8,9 - при использовании праймера 466 амплифицировался фрагмент более 1000 п.н.; рис. 10,11 - при использовании праймера 587 амплифицировался фрагмент около 900

п.н.; рис. 12,13 - при применении праймера 337 амплифицировался фрагмент около 600 п.н.; рис. 14,15 - при применении праймера 327 амплифицировался фрагмент около 700 п.н.

Амплифицированные фрагменты ДНК (ДНК-маркеры) были обозначены в соответствии с номером праймера, а именно: GC3060, 369RAPD, 466RAPD, 587RAPD, 337RAPD и 327RAPD.

Для определения силы сцепления выявленных RAPD-маркеров с новым локусом устойчивости к киле было проведено молекулярное генотипирование индивидуальных растений популяции Текила×(Зенон×Агр), для которых ранее была установлена сегрегация в соотношении 1:1 по устойчивости и восприимчивости к *P. brassicae*.

Как следует из таблицы 3.2, каждый из пяти RAPD-маркеров наследуется моногенно, поскольку среди растений расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр) отмечена их сегрегация в соотношении 1:1. Также данные свидетельствуют о том, что новый локус устойчивости к киле с каждым из RAPD-маркеров наследуется сцеплено, поскольку отсутствует ожидаемое при независимом наследовании расщепление 9:3:3:1. Наименьшая частота рекомбинации 3,03 % была между локусом устойчивости и маркером GC3060. Остальные маркеры находились значительно дальше - от 37.1 до 54.3 %.

### 3.4 Молекулярно-генетическая оценка килоустойчивых линий капусты белокочанной, редьки и их межвидовых гибридов по генам устойчивости к киле

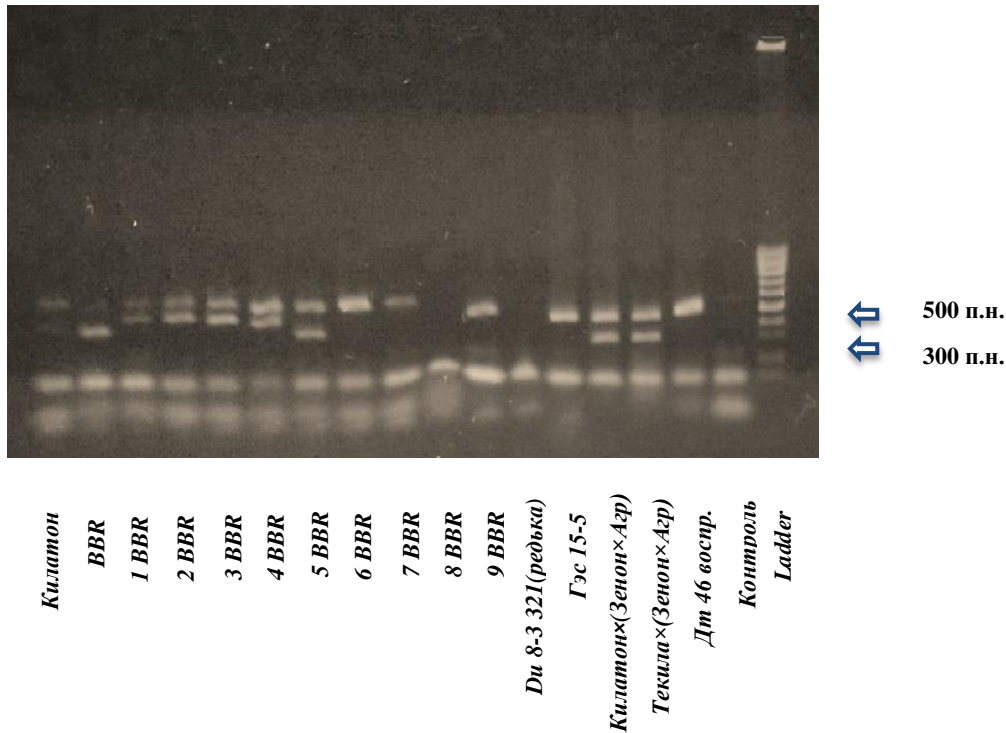


Рисунок 16 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером GC3060 F(R): стрелками обозначены полиморфные фрагменты размером 500 п.н. и 300 п.н., Ladder – маркер молекулярного веса

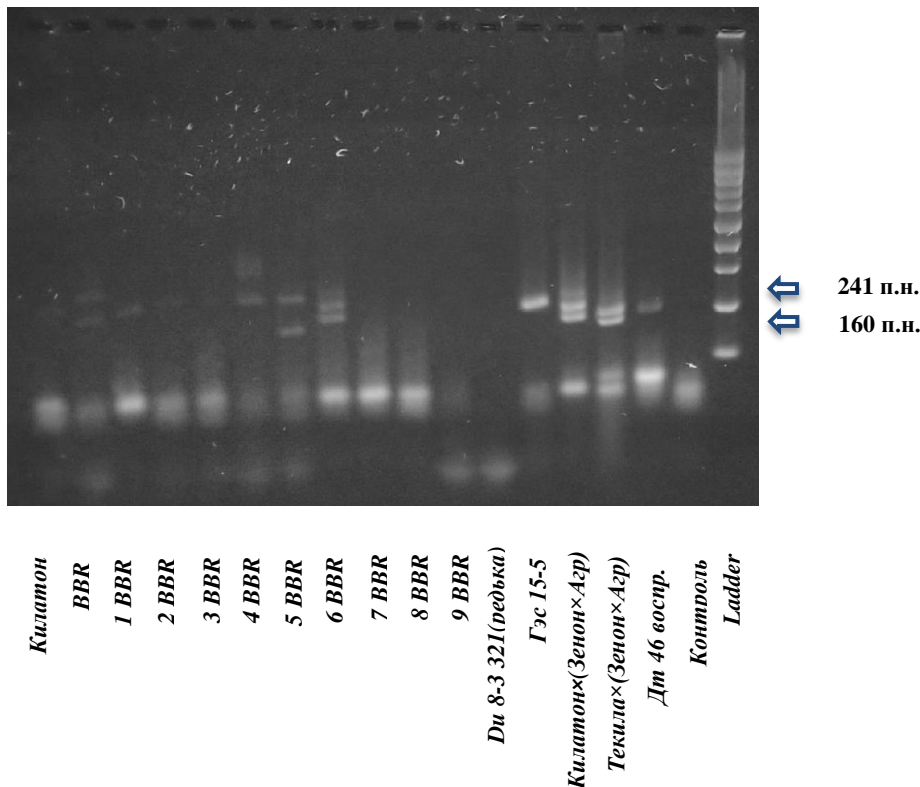


Рисунок 17 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером

B0902 F(R): стрелками обозначены полиморфные фрагменты размером 241 п.н. и 160 п.н., Ladder – маркер молекулярного веса

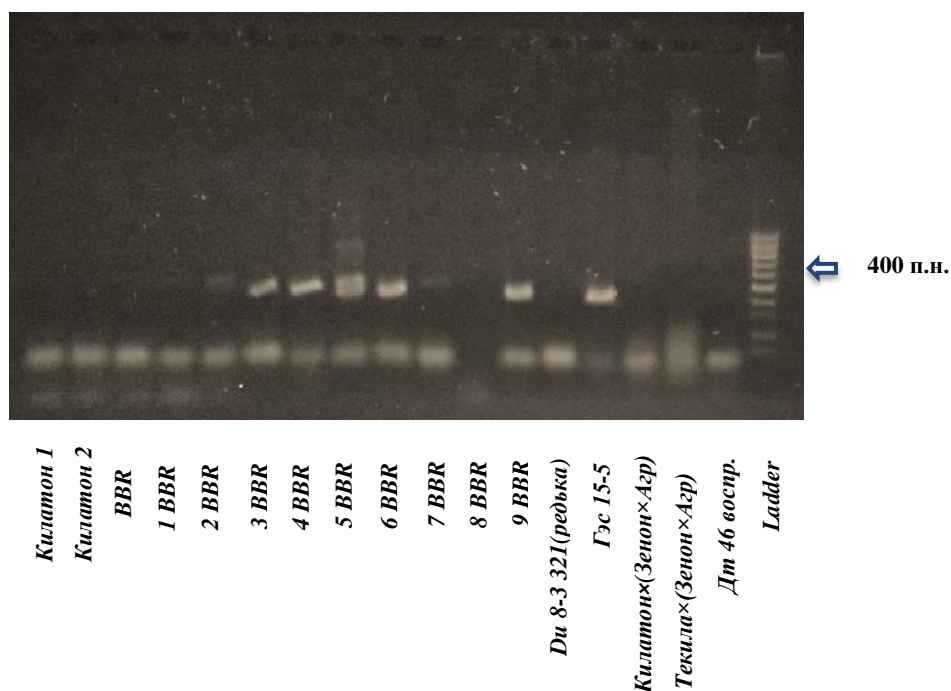


Рисунок 18 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером Тау\_сBrCR404 (BrCr026F;BrCr492R): стрелкой обозначен полиморфный фрагмент размером 400 п.н., Ladder – маркер молекулярного веса

**Таблица 3.8 – Анализ результатов скрининга килоустойчивых линий капусты белокочанной, редьки и их межвидовых гибридов по генам устойчивости к киле**

Образец	Ген CRa	Ген CRb	Ген CRA05
Килатон	+	+	-
ББР	+	+	-
1 ББР	+	-	-
2 ББР	+	-	-
3 ББР	+	-	+
4 ББР	+	-	+
5 ББР	+	+	+
6 ББР	-	+	+
7 ББР	-	-	+
8 ББР	-	-	-
9 ББР	-	-	+
Ду 8-3 321	-	-	-
Гэс 15-5	-	-	+
Килатон×(Зенон×Агр)	+	+	-
Текила×(Зенон×Агр)	+	+	-
Дт 46 воспр.	-	-	-

### **3.4 Результаты исследования по генам устойчивости к киле**

На основании полученных данных было установлено, что маркер GC3060 гена устойчивости к киле CRa обнаруживается у образцов: Килатон, BBR, BBR1, BBR2, BBR3, BBR4, BBR5 в соответствии с рис. 16; маркер B0902 гена устойчивости к киле CRb обнаруживается у образцов: Килатон, BBR, BBR5, BBR6 в соответствии с рис.17; маркер Таu\_cBrCR404 гена устойчивости к киле CRA05 обнаруживается у образцов: BBR3, BBR4, BBR5, BBR6, BBR7, BBR9, Гэс 15-5 в соответствии с рис. 18.

Выявлены образцы Килатон×(Зенон×Агр) и Текила×(Зенон×Агр), сочетающие в себе два маркера генов устойчивости CRa и CRb, что объясняется расположением этих маркеров в тесном сцеплении на одной группе сцепления. Значит, с помощью маркер-опосредованного отбора проведена дифференциация образцов с различающимися генами устойчивости к киле, в качестве потенциальных доноров генов устойчивости для пирамидирования их в одном генотипе капустных культур и создания коммерческих гибридов с надежной долговечной устойчивостью к киле.

### **3.5 Гибридизация – создание картирующей популяции для поиска молекулярного маркера и локализации гена устойчивости к киле**

Для дальнейшего эксперимента был подготовлен целевой материал: F2 Report - 3 (бут.).

Произведён посев семян в 3 кассеты (8×8), следовательно, на выходе получим 192 растения.

Дт 46ф1131 (бут.) использован в качестве стандарта восприимчивости и донора аллели восприимчивости. Посеяно 1/2 кассеты (32 семени).

## Глава 4. Охрана труда

Сельское хозяйство – это отдельное направление деятельности, отличающееся своей спецификой. Однако и для него актуальны основы охраны труда. Основной целью обеспечения охраны труда является безопасность сотрудников, сохранение их жизни и здоровья. Регламентируется она Приказом Министерства труда и соцзащиты «Об утверждении правил по ОТ в сельском хозяйстве» № 76н от 25 февраля 2016 года.

К работе в лаборатории не допускаются лица моложе 18 лет и имеющие медицинские противопоказания. Должны проводиться в обязательном порядке: повторный инструктаж по охране труда на рабочем месте не реже одного раза в три месяца; внеплановый инструктаж: при изменении правил по охране труда, замене или модернизации лабораторного оборудования, приспособлений, изменении условий и организации труда, при нарушениях инструкций по охране труда, перерывах в работе более чем на 30 календарных дней.

Работник лаборатории обязан: соблюдать Правила внутреннего трудового распорядка; пожарную безопасность, требования к эксплуатации лабораторного оборудования; использовать по назначению и бережно относиться к выданным средствам индивидуальной защиты; содержать рабочее место в чистоте и порядке.

Также необходимо обеспечить работника средствами индивидуальной защиты в соответствии с Нормами выдачи средств индивидуальной защиты.

Перед началом работы необходимо надеть специальную одежду, в нашем случае халат, бахилы или сменную обувь. Спецодежда не должна иметь развевающихся концов, рукава и ворот должны быть завязаны. Вымыть руки и высушить. Далее работник подготавливает рабочее место.

Также при использовании химических веществ необходимо надевать защитные очки и резиновые перчатки.

Необходимо выполнять только ту работу, по которой прошел обучение, инструктаж по охране труда. Не допускать к своей работе посторонних лиц.

При обнаружении неисправного оборудования, аппаратуры, инструмента, других нарушений требований охраны труда следует сообщить об этом руководству или ответственному лицу.

По окончании работ в лаборатории необходимо убрать рабочее место. Посуда должна быть тщательно вымыта, а реактивы убраны в места хранения. Все электрооборудование и вентиляцию необходимо выключить. Снять спецодежду (халат) и бахилы/сменную обувь. И в завершении тщательно вымыть руки с мылом.

Работник несет ответственность за нарушение требований настоящей Инструкции в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

## **Выводы**

1. В результате молекулярного генотипирования с использованием 132 RAPD-праймеров было обнаружено 32 полиморфных маркеров: из них только 5 имели слабое сцепление с признаком устойчивости – 37,1 – 54,3 сМ.

2. При скрининге в расщепляющейся популяции Текила×(Зенон×Агр) из 40 SSR и 15 Indel маркеров только у 10 SSR и 6 Indel был обнаружен полиморфизм.

3. Выявлен маркер GC3060, тесно сцепленный с геном устойчивости у *Brassica oleracea* к киле. Сила сцепления составила 3,03 сМ.

4. Было определено что образцы:

- BBR1, BBR2, BBR3, BBR4, BBR5 с фенотипом межвидового гибрида имеют маркер GC3060 гена устойчивости к киле CRA;

- BBR6, BBR7, BBR9 – с фенотипом капусты, Гэс 15-5 имеют маркер Тау\_cBrCR404 гена устойчивости к киле CRA05.

5. Образцы Килатон×(Зенон×Агр) и Текила×(Зенон×Агр), имеют два маркера генов устойчивости CRA и CRb, что объясняется расположением этих маркеров в тесном сцеплении на одной группе сцепления.

6. Проведена молекулярно-генетическая оценка и дифференциация образцов с различающимися генами устойчивости к киле для пирамидирования их в одном генотипе капустных культур и создания коммерческих гибридов с надежной долговечной устойчивостью к киле.



## Библиографический список

1. Алексашин, В.Н. Справочник по овощеводству / В.Н. Алексашин, А.В. Альпаев, Р.А. Андреева. и др. – Л.: Колос, 1982. – 511с.
2. Артемьева, Е.А. Усовершенствование приёмов защиты пекинской капусты от болезней (кила, слизистый и сосудистый бактериозы): Автореф. дис.канд. биол. наук: 120.35.0 — М.: 2000. — 16 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. Бондарева, Л.Л. Научное обоснование и разработка системы методов селекции и семеноводства капустных культур: Автореф. дис.канд. с-х. наук: 06.01.05 — М.: 2009. — 47 с.
6. Герасимов, Б.А. Вредители и болезни овощных культур. / Б.А. Герасимов, Е.А. Осницкая.— 3-е изд., испр. и доп. — М.: Сельхозгиз, 1955. — 607 с.
7. Инструкция по охране труда для работника производственной лаборатории [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://инструкция-по-охране-труда.рф/в-производственной-лаборатории.html>. – (Дата обращения 20.04.19).
8. Китаева, И.Е. Белокочанная капуста / И.Е. Китаева, В.Н. Орлова. – 2-е изд., перераб. и доп.— М.: Росагропромиздат, 1988г. — 45с.
9. Лизгунова, Т.В. Капуста / Т.В. Лизгунова // Культурная флора СССР Т. 11. – Л.: Колос. – 1984. – 328 с.
10. Маслова, А.А. Оценка и отбор инбредных линий капусты белокочанной на комплексную устойчивость к болезням и вредителям / А.А. Маслова // Вестник защиты растений. — 2016. — Т. 89, № 3. — С. 104 –105.
11. Маслова, А.А. Результаты исследования по устойчивости растений капусты белокочанной к *Plasmodiophora brassicae* / А.А. Ушаков, В.И. Старцев, Л.Л. Бондарева // Овощи России. — 2014. — №1. — С.68 – 71.

12. Минейкина, А.И. Оценка устойчивости гибридных комбинаций капусты белокочанной, созданных на основе линий удвоенных гаплоидов к *Plasmodiophora brassicae* Wor. / А.А. Ушаков, Л.Л. Бондарева // Овощи России. - 2016. — №2. – С.90 – 93.
13. Монахос, Г.Ф. Генетические источники устойчивости к киле крестоцветных (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) при селекции пекинской капусты / Г.Ф. Монахос, Н.С. Теренина // Известия ТСХА. – 1998. – № 3. – С.87 – 93.
14. Монахос, С.Г. Интеграция современных биотехнологических и классических методов в селекции овощных культур: Автореф. дис.канд. с-х. наук: 06.01.05 — М.: 2015. — 22 с.
15. Монахос, С.Г. Использование молекулярного маркера гена устойчивости к киле (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) в селекции капусты пекинской (*Brassica rapa* L.) / С.Г. Монахос, А.Н. Игнатов // Известия ТСХА. – 2007. — № 1. — С.26-30.
16. Монахос, Г.Ф. Наследование устойчивости к киле (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) у линий листовой капусты (*Brassica oleracea ssp. acephala*) / Г.Ф. Монахос, А.А. Ушанов // Известия ТСХА. — 1998. — № 2. — С. 106 –115.
17. Монахос, Г.Ф. Оценка устойчивости капусты к киле (возбудитель – *Plasmodiophora brassicae* Wor.): уч.-метод. пособие / Г.Ф. Монахос, Ф.С. Джалилов, С.Г. Монахос. - М.: Изд-во ТСХА.— 2009. –24 с.
18. Нгуен, М.Л. Новый локус устойчивости к киле в хромосоме A05 капусты пекинской (*Brassica rapa* L.) / М.Л. Нгуен, Г.Ф. Монахос, Р.А. Комахин, С.Г. Монахос // Генетика .— 2018. — Т. 54, № 3. — С. 306 – 315.
19. Омашева, М.Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М.Е. Омашева, К.П. Аубакирова, Н.А. Рябушкина // Биотехнология. Теория и практика. — 2013. — №4. — С. 20 – 28.
20. Переведенцева Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы: учеб. пособие / Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2009. – 199 с.
21. Прохоров, И.А. Селекция и семеноводство овощных культур / И.А. Прохоров, А.В. Крючков, В.А. Комиссаров. – М.: Колос, 1997. – 480 с.

22. Путырский, И.Н. Капуста / И.Н. Путырский. – Ростов-на-Дону.: Феникс, 2004. – 96 с.
23. Тараканов, Г.И. Овощеводство: учебник / Г. И. Тараканов, В. Д. Мухин, К. А. Шуин и др. — 2-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2003. – 472 с.
24. Ушаков, А.А. Эффективность иммунологической оценки линий капусты белокочанной к *Plasmodiophora brassicae* Wor. на искусственном инфекционном фоне / А.А. Ушаков, Л.Л. Бондарева, И.А. Енгальчева // Овощи России. — 2018. — №6. — С.97 – 100.
25. Хлесткина, Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений / Е.К. Хлесткина// Вавилов. журн. генет. и селекции. – 2011. – Т.15, № 4. — С. 757 –768.
26. Buczacki S. Plasmodiophora – an interrelationship between biological and practical problems / S. Buczacki // Academic Press London. —1983. — P. 161 –191.
27. Crute, I.R. Variation in Plasmodiophora brassicae and resistance to clubroot disease in Brassicas and allied crops / I.R. Crute, P.C. Gray, S.T. Buczacki // Plant Breed Abstr. — 1980. — Vol. 50. — P. 91 –104.
28. Crute, I.R. The relationship between genotypes of three Brassica species and collections of Plasmodiophora brassicae / I.R. Crute, K. Phelps, A. Barnes, S.T. Buczacki, P. Crisp // Plant Pathol. – 1983. – Vol. 32. – P. 405 – 420.
29. Friberg, H. Persistence of Plasmodiophora brassicae - Influence of Non-Host Plants, Soil Fauna and Organic Material / H. Friberg // Doctoral thesis. — 2005. — Vol. 26.
30. Ingram, D.S. The life history of the Plasmodiophora brassicae Woron. / D.S. Ingram, I.C. Tommerup // Proc. R. Soc. London. – 1972. – Vol. 180. – P. 103 – 112.
31. Kunjupillai, V. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis / V. Kunjupillai // Int. J. Indust. Entomol. – 2005. – Vol. 10. – P. 79 – 86.

32. Macfarlane, I. 1970. Germination of resting spores of *Plasmodiophora brassicae*/ I. Macfarlane // Transactions of the British Mycological Society. – 1970. – Vol. 55. – P. 97 – 112.
33. Melese, L. Marker assisted selection in comparison to conventional plant breeding: review article/ L. Melese // Agri Res. Tech: Open Access J. – 2018 – Vol. 14.
34. Savita Scientific Cultivation of Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)/ Savita, Jaipaul, Anil K. Choudhary, Mahendra Singh Negi and Anil Kumar // Advances in Vegetable Agronomy. – 2012. – P. 79 – 86.
35. Takahashi, K. Influences of some environmental factors on the viability of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* Wor. incubated in sterile soil / K. Takahashi // Phytopathological Society of Japan. – 1994. – Vol. 60. – P. 65 – 66.
36. Toxopeus, H. Clubroot control – the breeding and genetics of resistance / H. Toxopeus // Woronin + 100 international conference on clubroot. – Madison, Wisconsin, 1978b. – P. 29 – 35.
37. Wallenhammar, A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels / A.C. Wallenhammar // Plant Pathol. – 1996. – Vol. 45. – P. 710 – 719.
38. Williams, P.H. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga / P.H. Williams // Phytopathology. – 1966. – Vol. 56. – P. 624 – 626.