

На правах рукописи

Фатеев Дмитрий Андреевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

научно-квалификационной работы (диссертации)

Оценка селекционно-значимого материала брокколи молекулярно-
генетическими маркерами

Направление: 06.06.01 — Биологические науки

Специальность: 03.02.07 «Генетика»

Санкт-Петербург, 2020 г

Работа выполнена в

отделе генетических ресурсов овощных и бахчевых культур

(наименование отдела)

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Заведующий отделом: Артемьева Анна Майевна, к.с.-х.н., вед. н.с.
(Ф.И.О., ученая степень, звание, должность)

(подпись)

Научный руководитель: Артемьева Анна Майевна, к.с.-х.н., вед. н.с.
(Ф.И.О., ученая степень, звание, должность)

(подпись)

Рецензенты:

Анисимова Ирина Николаевна, д.б.н., вед.н.с.
(Ф.И.О., ученая степень, звание, должность)

(подпись)

Хатефов Эдуард Балилович, д.б.н., вед.н.с.
(Ф.И.О., ученая степень, звание, должность)

(подпись)

Содержание

Введение	4
1. Место, условия, материал и методика исследований	9
1.1. Место проведения исследований	9
1.2. Материал и методика исследований	9
2. Основная часть.....	16
2.1. Фенологические и морфологические особенности брокколи	16
2.2. Биохимический анализ головок брокколи	22
2.2.1. Метаболомный анализ.	25
2.3. Молекулярно-генетический анализ образцов брокколи	30
2.3.1. Изучение генетических взаимосвязей образцов.....	34
2.3.2. Ассоциативное картирование с использованием SSR маркеров.....	36
2.3.3. QTL-анализ	38
Выводы	42
Список литературы	45
Список опубликованных работ	48

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Капуста брокколи (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.) – однолетнее овощное растение семейства Крестоцветные Brassicaceae Burnett (Cruciferae Juss.), разновидность капусты огородной. Капуста брокколи обладает ценным питательным составом, содержит сераорганические соединения, фенолы, витамины, минералы и другие фитоконпоненты. Взаимодействие этих составляющих обуславливает диетические и лечебно-проофилактические свойства брокколи. Кроме того, это растение обладает ценными антиоксидантными свойствами (Jagdish et al., 2006) и антимикробной активностью (Basten et al., 2002). Потребление брокколи снижает риск развития определенных видов раковых (Verhoeven et al., 1996; Michaud et al., 1999) и сердечно-сосудистых заболеваний (Yochum et al., 1999; Lingyun et al., 2004). Благодаря этим качествам брокколи является важной частью функционального питания.

В настоящее время в генных банках Европы насчитывается более 500 селекционных сортов брокколи (<https://genesys-pgr.org>). В Российской Федерации продукция капусты брокколи составляет приблизительно 0,5% от общего объема производства капустных культур и импортируется из других стран в значительных объемах (Фролова и др., 2014). На 2020 год в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории РФ, включено 55 сортов и гибридов капусты брокколи. Основная часть сортов брокколи (87,5%) отечественной селекции, в то время как доля отечественных гибридов составляет 23%. Принимая во внимание ценный биохимический состав брокколи необходимо расширить сортимент отечественных сортов и гибридов.

Для ускорения селекционного процесса на современном этапе развития сельскохозяйственной биологии используют методы и подходы

маркер-вспомогательной селекцией применительно к образцам коллекций генетических ресурсов растений. Одним из таких подходов является оценка образцов коллекций с использованием молекулярно-генетических маркеров. Такая оценка образцов мировой коллекции брокколи ВИР позволит выявить исходный материал, который может быть использован для получения новых и улучшения существующих сортов данной сельскохозяйственной культуры. В коллекции ВИР сохраняется около 150 образцов брокколи различного статуса.

Разработка методов изучения генетического разнообразия и генотипирования сортов существенно расширяет возможности регистрации, систематизации и сохранения сортового генофонда в генбанках, и его рационального использования в селекции и семеноводстве.

Цель и задачи исследования

Цель: Определение генетического разнообразия образцов брокколи с помощью молекулярных маркеров, выявление образцов с хозяйственно ценными признаками и установление структурно-функциональных особенностей генома *B.oleracea*.

Задачи:

1. Провести полевую оценку стержневой коллекции брокколи по основным морфологическим, фенологическим и хозяйственно-ценным признакам;
2. Провести биохимическую оценку изучаемых образцов брокколи;
3. Провести молекулярно-генетический анализ образцов коллекции брокколи с использованием SSR маркеров;
4. Провести QTL-анализ картирующей популяции брокколи х белоцветковая капуста и ассоциативное картирование изученных

морфологических и биохимических признаков с использованием образцов коллекции брокколи.

Научная новизна.

Впервые в Северо-Западной зоне РФ изучено большое сортовое разнообразие брокколи по биологическим признакам, включая хозяйственно ценные признаки. Впервые определена изменчивость большого набора морфологических признаков по дескриптору ВИР, фенологических, физиологических и биохимических признаков культуры, вклад взаимодействия генотип-среда в их изменчивость. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов брокколи. Найдены локусы количественных признаков, сцепленных с биохимическими и морфологическими характеристиками у картирующей популяции. С использованием SSR маркеров проведено ассоциативное картирование, которое впервые на материале коллекции ВИР позволило установить маркеры, сцепленные с хозяйственно ценными признаками. Установлено сходное положение ряда хромосомных локусов количественных признаков по результатам QTL анализа и ассоциативного картирования.

Теоретическая и практическая значимость.

Выделены перспективные образцы брокколи для выращивания в открытом грунте Ленинградской области. Выделены источники для селекции на скороспелость, продуктивность, качество головки и биохимические признаки качества. Выделены SSR маркеры, сцепленные с хозяйственно ценными признаками, которые могут быть использованы для скрининга коллекционного и селекционного материала.

Положения, выносимые на защиту:

- Коллекция брокколи ВИР характеризуется широким разнообразием морфологических, фенологических, биохимических признаков, в том числе для успешного отбора исходного материала по различным направлениям селекции
- Подобранный набор из 25 полиморфных микросателлитных маркеров перспективен для определения генетического разнообразия брокколи
- Ряд микросателлитных маркеров типов BC, BRMS, OI, Ra, Na, KS ассоциирована с признаками селекционного интереса для маркерной помощи отбору у брокколи.

Апробация результатов. Результаты исследований по диссертации были представлены на:

1. Международной научно-практической конференции "Современные направления использования генофонда культурных растений для устойчивого сельского хозяйства", посвященной 115-летию академика ВАСХНИЛ и Россельхозакадемии М.С.Дунина (21-23 сентября 2016, ВСТИСП, Москва),
2. Международной научно-практической конференции профессорско-педагогического состава "Научное обеспечение развития сельского хозяйства и снижение технологических рисков в продовольственной сфере" (26-28 января 2017 г., СПбГАУ, СПб),
3. Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего» (27-29 сентября 2017, АФИ, СПб),

4. IV Вавиловской международной конференции "Идеи Н.И. Вавилова в современном мире", посвященной 130-летию со дня рождения Н.И. Вавилова (20-24 ноября 2017, ВИР, СПб),
5. XVIII Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева (19-20 апреля 2018, ВНИИСБ, Москва),
6. II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего», посвященной памяти академика Е.И. Ермакова (2–4 октября 2019, АФИ, СПб),
7. Международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (25 – 28 ноября 2019, ВИР, СПб), Международной конференции «Развитие АПК на основе современных научных достижений и цифровых технологий» (23-25 января 2020, СПбГАУ, СПб).

1. Место, условия, материал и методика исследований

1.1 Место проведения исследований

Научно-исследовательская работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР) в НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (г. Пушкин, Ленинградская область) в 2016-2019 годах.

1.2 Материал и методика исследований

Материалом исследований послужила стержневая коллекция брокколи ВИР, включающая образцы различного эколого-географического происхождения, отражающая разнообразие культуры, картирующая популяция удвоенных гаплоидов брокколи x белоцветковая капуста (AGDH).

Изученный материал включал 40 образцов брокколи коллекции ВИР и 103 линии удвоенных гаплоидов картирующей популяции AGDH (табл. 1).

Таблица 1. Название и происхождение изученных образцов коллекции брокколи ВИР

Кат.№	Название	Происхождение	Кат.№	Название	Происхождение
Брокколи					
к-186	Calabrese	США	к-295	Southern Comet Hybrid	Япония
к-190	Green Sprouting early	США	к-302	El Centro	Великобритания
к-192	Green Sprouting 47	США	к-303	Charade (F1)	Япония
к-196	Coastle 57051A	Канада	к-304	Decathlon (F1)	Нидерланды
к-211	Burpees green bud	США	к-305	Monterey (F1)	Япония
к-212	Coastle 87038	Канада	к-306	Pentathlon (F1)	Япония
к-252	Тонус	Россия	к-309	Medway (F1)	Нидерланды
к-276	Бонанза	США	к-310	Nutri-bud	США
к-284	Hybrid Express Corona	Япония	вр.к-159	Sureen	Нидерланды

к-285	Clippere #73367 (F1) R.S.	Нидерланды	вр.к-194	Fordgook Late Hybrid	Новая Зеландия
к-289	Violet Queen (F1) Purple	США	вр.к-202	Packman (F1)	США
к-290	Денди Эрли (F1)	Япония	вр.к-277	Green Goliath	США
к-291	Arcadia (F1)	Япония	вр.к-326	Patriot (F1)	Япония
к-292	Emerald City (F1)	Япония	вр.к-332	Agassi (F1)	Нидерланды
к-296	Cape Queen (F1)	Япония	вр.к-333	25-91 RZ	Нидерланды
к-297	Marathon (F1)	Япония	вр.к-335	OPV-12317	Испания
к-298	Everest (F1)	Канада	вр.к-341	Lufeng	Нидерланды
к-299	Comanche (F1)	Япония	вр.к-347	Brodway (F1)	Нидерланды
к-300	Senshi (F1)	Япония	вр.к-350	Furio	Нидерланды
к-301	Triathlon (F1)	Япония	вр.к-353	Red head	Финляндия

Полевые опыты были заложены в соответствии с «Методическими указаниями ВИР по изучению и поддержанию мировой коллекции капусты» (1988), «Методикой полевого опыта в овощеводстве» (2011). Статистическая обработка данных проведена по Б. А. Доспехову (1985) с использованием пакета прикладных программ MS Excel, Statistica 12.

При анализе материала в течение вегетационного периода проводили фенологические наблюдения, биометрические измерения и морфологическое описание растений. Оценку качественных и количественных признаков коллекционных образцов проводили по Методическим указаниям ВИР (1988) с дополнениями и методике Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Учитывали следующие количественные показатели:

Фенологические – Даты появления массовых всходов, начала формирования головки, наступления хозяйственной годности 10%, 75% растений, начала цветения и массового цветения;

Габитус растения – Высота растения, диаметр растения;

Признаки черешка – длина, толщина, число пар нормальных и зачаточных долей, характер окаймления;

Признаки листа – тип листьев, длина, ширина листовой пластинки, форма, поверхность ткани, характер нервации, характер края, надрезанность края, окраска, восковой налет;

Признаки головки – диаметр, высота, толщина внутренней кочерыжки, толщина бокового побега, форма, плотность, характер поверхности, размер бутонов, окраска, восковой налет;

Пасынки – количество, масса.

Схема размещения растений 70×30 см. Повторность опыта трехкратная, расположение рендомизированное, 15 растений в повторности.

Биохимическую оценку образцов проводили в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР в фазе технической спелости головки. Определение сухого вещества проводили высушиванием в термостате до постоянной массы, аскорбиновой кислоты – титрованием с краской Тильманса, пигменты (хлорофиллы α и β , каротиноиды, суммарное содержание каротинов, β -каротин) – спектрофотометрическим методом. Для метаболомного анализа брали 10 г образца, взвешивали, гомогенизировали с адекватным количеством этанола, пробу настаивали в течение 30 дней при 5...6°C. Экстракт (200 мкл) выпаривали досуха на установке CentriVarConcentrator фирмы «Labconco» (США). Сухой остаток силилировали с помощью бис(триметилсилил)трифторацетамида. Разделение силилированных соединений проводили на капиллярной колонке HP-5MS 5% фенилметилполисилоксан (30,0 м, 250,00 мкм, 0,25 мкм) на хроматографе «Agilent 6850» с квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 5975B VL MSD фирмы «AgilentTechnologi» (США). Полученные результаты обрабатывали с помощью программы “UniChrom”, “AMDIS” и библиотек масс спектров NIST 2010, научного

парка Санкт-Петербургского университета и ботанического института Российской академии наук (Смоликова и др., 2015).

Тотальную ДНК выделяли из навески листьев пяти растений с использованием методики Дорохова и Клоке (1997).

В исследовании использовали 30 SSR-маркеров. Данные маркеры были использованы для генотипирования картирующих популяций брокколи, селекционных образцов белокочанной капусты, цветной капусты, репы и рапса (Bohuon et al., 1996; Lowe et al., 2004; Suwabe et al., 2006; Ma Rongcai., 2007; Walley et al., 2011). Информация о SSR-маркерах, последовательности праймеров, размере и числе выявленных аллелей, а также их хромосомной локализации были получены из литературных источников и базы данных маркеров овощных культур VegMarks (<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/>) (табл. 2). Праймеры синтезированы компанией «Евроген» (Россия) (<http://evrogen.ru/>).

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК образцов брокколи, 1× реакционный буфер (Евроген, Москва), 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ каждого из dNTPs, 0,2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 е.а. Taq-полимеразы (Евроген, Москва). Условия ПЦР соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров, в ряде случаев условия ПЦР были оптимизированы.

Фрагменты ПЦР разделяли в 3% агарозном геле в буфере TBE с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете. Полученные результаты анализировали с использованием системы геледокументирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ImageLab® Software v6.0.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины.

Информация об аллельном составе SSR локусов у изученных образцов была занесена в электронную базу данных в формате Microsoft Excel. Наличие определенного амплифицированного фрагмента ДНК у данного генотипа обозначали цифрой «1», отсутствие - цифрой «0». Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использован индекс PIC (Polymorphic Index Content)/ $PIC = 1 - \sum p_i^2$ - где p_i - частота i аллели, выявленной в данной выборке (Nei, 1979). Характеристика полиморфных микросателлитных локусов была выполнена с помощью программы iMec – MarkerEfficiencyCalculator (Amiryousefi et al., 2018). Поскольку нельзя исключить вероятность того, что используемый метод кластерного анализа может оказывать некоторое влияние на группировку сортов, для кластеризации использовали несколько методов: Neighbor Joining (NJ), Simple linkage, UPGMA, WPGMA, Ward в программе DARwin6. Расстояния рассчитывали по Дайсу (Dice), по Жаккарду (Jaccard), в качестве критерия сходства использовали среднее евклидово расстояние (Euclidean).

С использованием программы STRUCTURE 2.3.4 была определена генотипическая структура изученной выборки образцов. Для выбора оптимального K (генетические группы), где $2 \leq K \leq 6$, использовался логарифм правдоподобия $\ln PD$ с помощью приложения Clumpak (Kopelman et al., 2015), в котором используется метод Evanno для определения наиболее вероятного числа генетических групп.

Материалом для QTL анализа служила картирующая популяция AGDH, полученная от скрещивания брокколи (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cytnosa* Duch. - 'GDDH33', сорт 'Green Duke') и китайской брокколи (белоцветковой капусты) (*B. oleracea* var. *alboglabra* (L.) Bailey 'A12DHd'). Были выбраны 103 наиболее информативные линии удвоенных гаплоидов из 206 линий, принадлежащих к данной

картирующей популяции. Исходные для создания популяции образцы имеют различные продуктовые органы: у брокколи нераскрывшиеся соцветия, а у китайской брокколи стебли. Популяция была создана в лаборатории отдела изучения овощных и масличных культур исследовательского центра им. Джона Иннеса, Великобритания (Brassica and Oilseeds Research Department, John Innes Centre) при использовании культуры пыльников (Bohuon et al., 1996). Линии этой популяции насыщены RFLP, AFLP и SSR молекулярными маркерами (Rae et al, 1999).

QTL анализ был выполнен с помощью компьютерной программы MAPQTL 6.0, с помощью которой установили наличие и положение QTL в группе сцепления (интервал картирования 5 сантиморганид (сМ)), значения LOD (от logarithm of odds) ($P = 0.05$) и степени варьирования признаков (% Expl.). Для каждого признака проводили отдельный QTL анализ. Графическое изображение молекулярно-генетических карт было выполнено на основе полученных данных по картированию выявленных QTL с помощью компьютерной программы MapChart 2.3. Для полногемного анализа ассоциаций использовали программное обеспечение TASSEL 5.0 (Bradbury et al, 2007).

Таблица. 2. Молекулярно-генетические маркеры, использованные в исследовании

Локус	Группа сцепления	Мотив	Последовательность 5'-3'	Ожидаемая длина фрагмента, пн.	Источник
BC7	C05	(ACC)6	F: AGTTGGCCCCATTTTCATTGTTAT R: CATCTTGACGGCCTCCATCTCCA	153	Ma Rongcai (2007)
BC38	R03	(ATC)7...(AAG)5	F: CTTTTGCTGCCCCGACGAGA R: AGGAAGCAGGAAAGAGATAAAAG	198	Ma Rongcai (2007)
BC46	R01	(GAA)6	F: AGGTTTCGAGGTTTGTGGCTTCT R: СТАААСТСАТСГСТТССГТАААСА	184	Ma Rongcai (2007)
BC48	R02	(TCT)7	F: GGTGGTGGGCTGGGGAGTA R: CGTCGATCGATTTCATAACCGTAGA	237	Ma Rongcai (2007)
BC51	R06	(GAA)6	F: CCGAGGAAGAAAGCTGTTGAGTTG R: ATCGCTTCCGTAGACACCTTCGTT	154	Ma Rongcai (2007)
BC65	R04	(AG)7	F: TTCCGTCCCTTCCCTAAACAA R: TGAACAСТACTGCCAGAGAACAC	200	Ma Rongcai (2007)
BC89	R06	(AG)7	F: CGTCCGTAGCGCTATTTTCAGA R: ACGTTGTGCGATCGCCAGTTC	199	Ma Rongcai (2007)

BC105	R05	(CT)7	F: GACGCCTCAATTGCTTACTT R: AGGGAATGAGGATGGGTCTG	207 – 214	Ma Ron- gcai (2007)
BC107	R09	(TC)10	F: ATACAATCTTCGTGACTCTACAG R: AGCATCAACGCCAACTTTATCC	284 – 295	Ma Ron- gcai (2007)
Br372	C07	Нет информации	F: AACGTAGTCACCAACGAAAC R: TCTGAGAAAAGAAGGAGCTG	165	Suwabe et al. (2006)
BRMS019	R10	(GT)10	F: CCCAAACGCTTTTGACACAT R: GGCACAATCCACTCAGCTT	241	Suwabe et al. (2006)
BRMS043	R03	(A)21(T)14(G)6	F: GCGATGTTTTTCTTCAGTGTC R: TTAATCCCTACCCACAATTTCC	318	Suwabe et al. (2006)
BRMS051	R09	(TC)15	F: GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA R: GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG	262	Suwabe et al. (2006)
BRMS071	C03	(TC)5(TC)28	F: AAAGCGAGAAAGTGCAGTTGAGAG R: CCACGAAACTACTGCAGATTGAAA	256	Suwabe et al. (2006)
FITO284	C09	Нет информации	F: AGCAATAAGCCAGAAACTTG R: GTTCATCATCACAACCTAACCT	300	Iniguez- Luy et al. (2008)
FITO285	C03	Нет информации	F: TGAAGATGGGACTCAAACA R: GATGAAGCAGAGAATGACAAG	190	Iniguez- Luy et al. (2008)
KS31100	R07	Нет информации	F: ATAAGGGCATCGCCTCAACA R: TGCACGCATCCACATAAACA	233	Suwabe et al. (2006)
KS50200	R03	Нет информации	F: ACTAGGGCATCGCCTCAACC R: TGCACGCAGCATATAAAC	148	Suwabe et al. (2006)
Na10D09	C04	Нет информации	F: AAGAACGTCAAGATCCTCTGC R: ACCACCACGGTAGTAGAGCG	273	Lowe et al. (2004)
Na10c03	C01	Нет информации	F: TTGGGTGTCTTTGTTACCCC R: ACCGAGAAGACTGATACGGG	304	Lowe et al. (2004)
Na12c03	C02	Нет информации	F: ATCGTTGCCATTAGGAGTGG R: ACCAAATTAACCCCTTTTGC	272	Lowe et al. (2003)
Na12c08	C01	(GA/CT) ₅₀	F: GCAAACGATTTGTTTACCCG R: CGTGTAGGGTGATCTAGATGGG	315	Lowe et al. (2003)
O111B05	C03	Нет информации	F: TCGCGACGTTGTTTTGTTT R: ACCATCTTCCTCGACCCTG	115	Lowe et al. (2004)
O111H06	C09	Нет информации	F: TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R: TTCTTCACTTCACAGGCACG	198	Lowe et al. (2004)
O112A04	C09	(GA/CT) ₁₇	F: TGGGTAAGTAACTGTGGTGGC R: AGAGTTCGCATACTCTGGAGC	138	Lowe et al. (2004)
O110D08	C09	Нет информации	F: TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC R: GAGCTGTATGTCTCCCGTGC	201	Lowe et al. (2003)
O112F02	R09	Нет информации	F: GGCCCATGATATGGAGATG R: CATTTCTCAATGATGAATAGT	200	Lowe et al. (2004)
O112G04	C08	Нет информации	F: CGAACATCTTAGGCCGAATC R: GGTAACTGCGGGATATTG	157	Lowe et al. (2004)
Ra2E12	C06	Нет информации	F: TGTCAGTGTGCCACTTCGC R: AGAGAAACCCAATAAAGTAGAACC	148	Lowe et al. (2003)
Ra2G09	C02	Нет информации	F: ACAGCAAGGATGTGTTGACG R: GATGAGCCTCTGGTTCAAGC	254	Lowe et al. (2003)

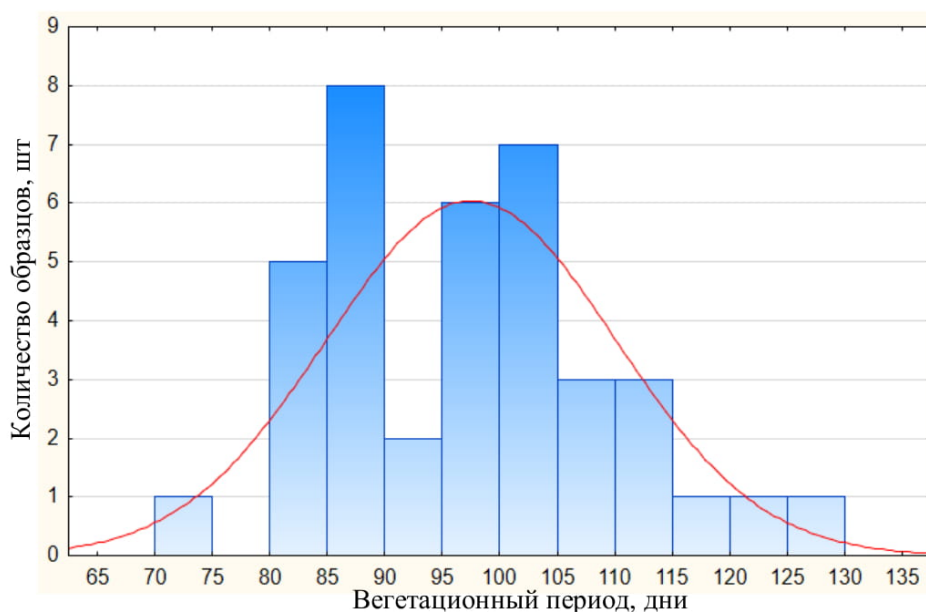
2. Основная часть

2.1 Фенологические и морфологические особенности брокколи

Изучение разнообразия коллекции брокколи позволило выявить значительную изменчивость важных хозяйственно ценных признаков.

Вегетационный период. Продолжительность вегетационного периода является одним из важных хозяйственно-ценных признаков. Фенологические наблюдения, проведенные в условиях открытого грунта в 2016-2019 годах, выявили значительное разнообразие по длине вегетационного периода.

Рисунок 1. Гистограмма распределения образцов брокколи по длине вегетационного периода, среднее за три года изучения



По результатам нашего исследования, образцы брокколи распределены по продолжительности вегетационного периода в 6 групп: ультраскороспелая группа до 80 дней, скороспелая 80-90 дней, среднеранняя 91-100 дней, среднеспелая 101-110 дней, среднепоздняя 111-120 дней, позднеспелая более 121 дня. В результате анализа было выявлено, что больше половины изученных образцов являлись

скороспелыми (35%), среднеранними (22,5%) и среднеспелыми (25%).
 Меньшая часть образцов оказалась среднепоздней (10%), позднеспелой (5%) и один образец ультраскороспелый (вр.к-341, Lufeng) (рис. 1).
 Данный образец образует небольшую головку, с цветками желтыми или белыми, что указывает на возможное родство с китайской брокколи.

Изменчивость продолжительности вегетационного периода в разные годы у отдельных генотипов достигала 19,3%, в среднем у всех изученных образцов была в пределах 9,7-10,6%.

Изучение *морфологических признаков и продуктивности* растений образцов коллекции выявило широкую амплитуду сортовой изменчивости.

В таблице 3 отображены основные характеристики важных количественных признаков изучаемой коллекции брокколи за три года изучения. Средней изменчивостью характеризовались признаки высота и диаметр розетки, длина и ширина листа, высота головки.–Коэффициенты вариации признака “площадь листовой поверхности” и основных признаков продуктивности были высокими и очень высокими; таким образом, сортообразцы коллекции различаются по этим признакам очень существенно.

Таблица 3. Характеристика количественных признаков листового аппарата и головки образцов брокколи в среднем за 2016-2019 гг. (Пушкин)

Признак	X _{ср}	X _{min}	X _{max}	Std. Dev	C _v , %	Standart error
Высота розетка, см	42,5	31,5	56,5	6,445	15,15	1,17
Диаметр розетки, см	63,18	44,2	94,5	11,64	18,88	2,13
Длина листа, см	21,88	15,25	35,3	3,822	17,46	0,62
Ширина листа, см	16,36	10,73	24,75	2,942	17,97	0,47
Площадь листовой поверхности, см ²	9464	5640	17930	1895	31,12	346,85
Высота головки, см	11,41	6,	15,50	2,31	20,28	0,37
Диаметр головки, см	14,50	7,0	21,500	3,64	25,15	0,59

Масса головки, кг	0,33	0,065	1,070	0,209	61,51	0,03
Количество пасынков, шт	4,11	0,00	11,500	2,94	71,37	0,47
Масса пасынков	32,68	0,00	125,00 0	25,73	72,73	4,17
Урожайность центральной головки	1,69	0,32	5,350	1,04	61,51	0,16

Высота и диаметр розетки, длина и ширина листа, количество листьев – все эти признаки являются определяющими для габитус растений. Анализ полученных данных по размеру розетки листьев брокколи показал, что в изученной коллекции преобладают образцы с розеткой среднего размера (диаметр 45–75 см, высота 36–44 см).

Наименьшими значениями размера розетки (до 50 см) характеризовались в основном скороспелые образцы японской селекции, отличающиеся одной небольшой, рыхлой центральной головкой и большим количеством боковых головок в пазухах листьев (пасынки), большие розетки формировались у образцов европейской селекции, образующих одну крупную головку. У остальных образцов было различное соотношение высоты и диаметра. Площадь листовой поверхности изменялась в широких диапазонах. У брокколи значение этой величины зависит от длины листовой пластинки и количества листьев. Для определения площади листьев растения использовали изображение листа, полученное при помощи сканера. Далее отсканированное изображение обрабатывалось при помощи программы Adobe Photoshop с определением общей площади листа в абсолютных и относительных единицах.

Одним из главных количественных признаков растений брокколи является размер и масса головки (высота, диаметр и масса). Основная часть изученных образцов характеризовалась высотой головки от 10,0 до 14,0 см и диаметром – от 10,0 до 18,0 см, массой – от 0,1 до 0,4 кг. Эти образцы имели куполовидную форму головки. В результате изучения

коллекции выделились формы с крупными, куполовидными головками из Нидерландов (к-304, Decathlon; к-297, Marathon (F1)), и Японии (к-301, Triathlon (F1); к-299, Comanche (F1)). Образец Monterey (F1) к-305, образовывал два стебля и две крупных головки, центральная головка достигала в среднем 0,6 кг, вторая головка чуть меньшего размера (до 0,4 кг).

Основными признаками качества товарной головки являются плотность соцветия и размер бутонов. Современная селекция брокколи направлена на высокую плотность головки и на небольшой размер бутонов. Бутоны должны быть небольшими и удерживаться во время процесса замораживания (Myers, 2014). Основная часть изученных образцов характеризовалась бутонами среднего размера (2-3 мм). Были выделены образцы с мелкими бутонами (менее 2 мм) в период технической спелости (вр.к-335 OPV-12317; к-300, Senshi (F1)). Данные характеристики связаны с устойчивостью растений к раннему цветению. Скороспелые сорта подвержены раннему распаду головки на цветущие побеги, что приводит к потере товарности. Образец японской селекции (к-300, Senshi (F1)) отличался самой высокой устойчивостью к расхождению головки. Головка у данного образца не расходилась в течении трех недель после наступления технической спелости.

Пасынкообразовательная способность образцов – способность образовывать небольшие соцветия, боковые головки в пазухах листьев, является важным признаком для сортов и гибридов, используемых в малых и приусадебных хозяйствах, без использования методов механизированной уборки. Чаще всего эта особенность проявляется после среза центральной головки. Основная часть изученных образцов формировала дополнительно 2-5 пасынков, после среза центральной головки, а средняя масса пасынков составила 32 г. Были выделены образцы с высокой

пасынкообразовательной способностью (к-212, Coastle 87038; к-190, Green Sprouting early strain). Также выделены образцы, образующие небольшое (1-3) количество крупных пасынков (до 100 гр.) (к-304, Decathlon (F1); к-300, Senshi (F1)).

В результате изучения образцов из коллекции ВИР выделили образцы, которые можно использовать в качестве источников хозяйственно ценных признаков (табл. 4).

Таблица 4. Выделившиеся по комплексу хозяйственно ценных признаков образцы брокколи

Кат.№	Название	Происхождение	Хоз. годность (дни)	Головка			Пасынки		Габитус растения	
				Масса (г)	Д ср. (см)	Высота (см)	Кол-во в среднем с одного растения	Средняя масса одного пасынка	Д ср. (см)	Высота (см)
210	Burpees green bud	США	81,5±1,8	99±15,2	12,1±0,8	9,5±0,63	6,5	15,8	51,4±4,1	35,7±1,5
297	Marathon (F1)	Япония	91,5±1,2	487±54,1	18±0,67	11,8±0,43	3,3	12,1	65,4±6,2	38,9±1,82
299	Comanche (F1)	Япония	99,3±1,9	465±28,5	15,75±2,84	11,7±1,9	4	37,5	48,6±2,1	36,6±2,4
300	Senshi (F1)	Япония	97,8±2,7	511±98,3	17,3±2,1	11,4±1,7	2,5	101,3	73,5±3,7	47,5±2,1
304	Decathlon (F1)	Нидерланды	85,7±2,1	498±73,3	18,1±2,1	12,7±1,1	1,5	89,1	76±3,1	50±1,1
306	Pentathlon (F1)	Япония	95,2±2,7	373,4 ±25,1	15,8±1,3	14,9±0,66	4,5	57,3	82,4±3,21	49,1±2,8
Вр. 332	Agassi (F1)	Нидерланды	98,5±2,6	431,5±31,2	17,6±1,6	14,5±0,71	1,5	35,7	74,8±3,91	39,5±2,3
Вр. 333	25-91 RZ	Нидерланды	102,1±3,3	254,3±19,1	14,1±1,1	12,6±0,5	4,1	29,7	66,9±3,24	40,3±1,9
Вр. 347	Brodway (F1)	Нидерланды	113,4±3,4	455,3±29,5	15,2±0,9	13,2±1,3	4,5	30,2	57,3±2,67	38,2±3,01
Вр. 341	Lufeng	Нидерланды	64,1±1,6	107,8±20,1	12,3±1,1	9,4±0,67	1,5	20,5	54,5±2,9	34,9±1,95
Вр. 350	Furio	Нидерланды	93,8±1,7	553±121,7	18,5±1,71	13,6±1,1	3	43,4	61,6±5,7	36,8±2,4

2.2. Биохимический анализ головок брокколи

Улучшение вкусовых качеств и повышение содержания витаминов и биологически активных веществ является одной из актуальных задач селекции брокколи. Сравнительное биохимическое исследование 40 образцов брокколи показало, что диапазон сортовой изменчивости содержания химических компонентов был довольно высок. Содержание сухого вещества в головках колебалось от 8,00 до 16,36%, аскорбиновой кислоты – от 28,2 до 129,72 мг/100г. Преобладающая часть сухих веществ головок брокколи представлена углеводами – моно- и дисахаридами, в связи, с чем этот показатель имеет большое значение для сравнительной оценки образцов. Углеводный комплекс представлен 13-15 сахарами, среди которых 81-87% составляют моносахара.

Большинство изученных образцов брокколи имели содержание сухого вещества в пределах 8,0-15,4% (табл. 5). Это позднеспелые образцы японской селекции. Наибольшее количество сухого вещества (более 13%) отмечалось у образцов из Великобритании (к-302, El Centro) и Японии (к-306, Pentathlon (F1), к-295, Southern Comet Hybrid), которые могут быть использованы в качестве источников для селекции на повышенное содержание сухого вещества.

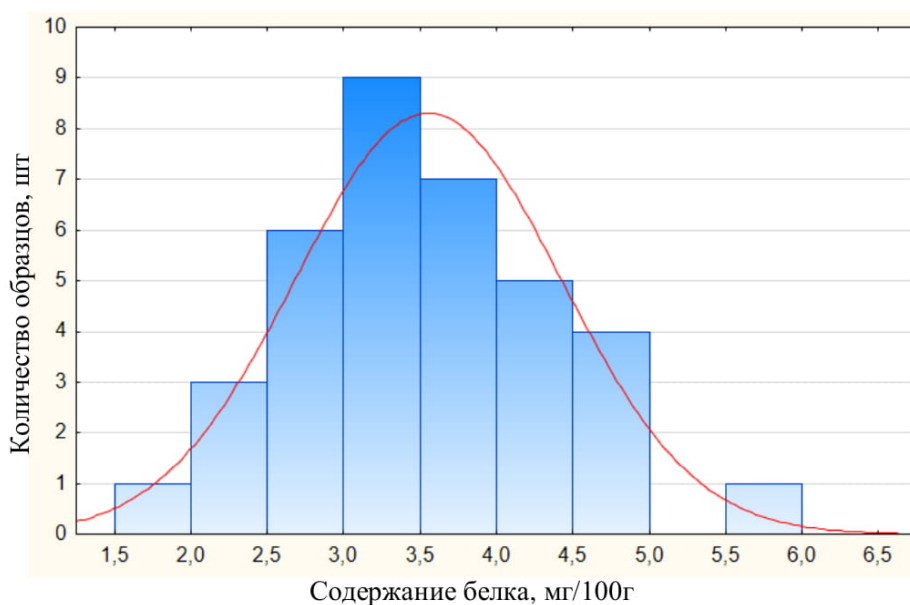
Таблица 5. Содержание основных биохимических компонентов в брокколи

Признак	X _{ср}	X _{min}	X _{max}	Variance	Std. Dev.	Cv, %	Standard error
Сухое Вещество (%)	11,29	8,00	15,44	3,54	1,88	16,66	0,343
Сахара (%)	1,82	0,42	4,94	1,17	1,08	59,5	0,197
Белок (мг/100г)	3,67	2,4	5,7	0,64	0,8	21,83	0,146
Орг. кислоты (мг/100г)	240,36	106,80	529,16	10829	104,06	43,29	18,999
Аскорбинов. Кислота (мг/100г)	53,67	28,20	118,44	490,71	22,15	41,27	4,044
Хлорофилл а (мг/100г)	14,84	5,41	35,82	44,56	6,68	44,98	1,219
Хлорофилл b (мг/100г)	8,52	3,22	17,30	10,46	3,23	37,96	0,591
Хлорофиллы (мг/100г)	23,36	8,63	53,12	96,13	9,80	41,97	1,790
Каротиноиды (мг/100г)	7,10	2,74	13,31	7,02	2,65	37,3	0,484
β-каротин (мг/100г)	1,20	0,45	2,42	0,2103	0,46	38,28	0,084

Амплитуда изменчивости содержания аскорбиновой кислоты в головках была высокой ($Cv=41,27\%$). Наибольшее содержание (до 100 мг/100г) отмечалось у раннеспелых образцов с высокой пасынкообразовательной способностью. Большинство образцов содержало витамина С в пределах 30-50 мг/100г, к ним относились среднеспелые и позднеспелые образцы. Перспективны для селекции на повышенное содержание аскорбиновой кислоты образцы из Нидерландов (вр. к-159, Sureen) и из Японии (к-296, Cape Queen (F1), к-292, Emerald City (F1)).

Содержание белка в брокколи является важным показателем; белок богат незаменимыми аминокислотами. Изученные образцы обладали небольшой изменчивостью по содержанию белка ($Cv=21,83\%$). Содержание белка колебалось от 1,9 мг/100г до 5,7 мг/100г (рис. 2). Наибольшее содержание (5,7 мг/100г) выявлено у позднеспелого образца японской селекции (к-306, Pentathlon (F1))

Рисунок 2. Гистограмма распределения образцов по содержанию белка



Высокое содержание суммы хлорофиллов α и β (53,12 мг/100г), а также коррелирующих с ним показателей содержания каротиноидов (13,31 мг/100г) и β -каротина (2,42 мг/100г) обнаружено у раннеспелого образца канадской селекции (к-212, Coastle 87038).

2.2.1 Метаболомный анализ.

С помощью метаболомного анализа установлено 136 компонентов биохимического состава образцов капусты брокколи, взятых в изучение. Идентифицировано 95 компонентов из групп органических кислот, свободных аминокислот, в том числе незаменимых, жирных кислот, многоатомных спиртов, сахаров, а также фенолсодержащих соединений, восков, нуклеозидов и др.

Углеводный комплекс брокколи представлен 13 сахарами. Содержание сахаров в брокколи в среднем составило 1,81% (от 0,4 до 8,3%). Основная часть сахаров – это моносахара. Олигосахара представлены дисахарами (сахарозой) и трисахарами (раффинозой). Сумма олигосахаров в среднем составила 0,32% (от 0,12 до 0,94 %). Общими для всех образцов брокколи оказались фруктоза, глюкоза, манноза, галактоза, сорбоза, сахароза и раффиноза. У брокколи 70% образцов содержали ликсозу. Определены метаболически активные производные сахаров – глюконо-1,4 лактон, глюкоза-1,5 лактон. Суммарное содержание производных сахаров в брокколи составило 181,1 мг/100 г (от 68,2 до 831,6 мг/100 г) (табл. 6).

Таблица 6. Содержание компонентов биохимического состава в изученных образцах брокколи (мг/100г)

Моносахара			
Фруктоза	0,721±0,08	Ксилоза	0,01 (у 1 образца)
Глюкоза	0,412±0,06	Рибоза	0,003±0,001 (у 3 образцов)
Сахароза	0,315±0,007	Рамноза	0,002 (у 1 образцов)
Манноза	0,298±0,05	Ликсоза	0,001±0,001 (у 70% образцов)
Сорбоза	0,075±0,01	Арабиноза	0,001 (у 1 образцов)
Галактоза	0,056±0,13		
Дисахара		Трисахара	
Сахароза	0,315±0,05	Раффиноза	0,002±0,001
Лактоны			
Глюкоза-1,4 лактон	26,96131±4,22	Глюкоза-1,5 лактон	3,240289±0,81
Сахароспирты			
Инозитол	147,81±18,01	Фитол	1,92±0,25
Глицерол	6,72±0,66	Эритритол	1,41±0,25
Галактинол	4,16±0,54	Этаноламин	1,35±0,38
mag 1-c16:0	4,07±0,53	Ксилитол	1,27±0,2
Сорбитол	3,35±1,02 (у 25% образцов)	Арабинитол	1,12 ±0,24 (у 15% образцов)
Свободные аминокислоты			
Оксопролин	62,94±9,86	Аланин	2,67±0,66
Глутамин	27,84±7,47	Норлейцин	(у 30% образцов)
Глутаминовая к-та	13,77±4,05	Гамма-аминомасляная	2,63±0,7
	12,41±3,13	Глицин	2,49±0,43
Серин	9,23±2,1	Пипеколовая к-та	2,31±0,85
Пролин	8,28±1,93	Орнитин	1,06±0,23 (у 70% образцов)
Аспарагиновая к-та	4,70±0,89	N ацетил серин	0,86 (у 1 образца)
Аспарагин	4,53±1,58		
Незаменимые аминокислоты			
Метионин	6,47±4,21 (у 3 образцов)	Триптофан	3,11±0,39
Фенилаланин	4,27±1,54 (у 3 образцов)	Лейцин	1,38±0,25
Треонин	3,67±0,9	Изолейцин	0,33±0,22 (у 3 образцов)
Валин	3,32±0,6	Тирозин	0,24 (у 1 образца)

Органические кислоты			
Яблочная	80,32±9,05	Глюконовая	5,64±1,14
Аскорбин. к-та	56,19±4,57	Щавелевая	3,03±0,32
Фосфорная	25,88±4,01	Абиетиновая	2,92±0,28
Треоновая	24,49±3,35	Пировиноградная	2,3±1,58 (у 30% образцов)
Лимонная	20,57±3,15	Фумаровая	1,28±0,28
Янтарная	7,45±0,93	Винная	1,24±0,28 (у 4 образцов)
Молочная	6,71±0,6	Азелаиновая	1,19±0,22
Глицериновая	6,55±0,94	Малеиновая	1,09±0,88
Метилмалоновая	6,39 (у 1 образца)	Мезоксалева	0,09±0,03
Рибоновая	6,36±1,01		
Фенольные соединения			
Хинная	34,99±4,59	Амирин	0,80±0,17
Синаповая	3,36±0,42	2,3-дигидроксибензойная	0,41±0,15
Шикимовая	2,97±0,54	Байкалин	0,41±0,084
Кониферилловый спирт	2,35±0,58	Никотиновая	0,34±0,04
Феруловая	1,91±0,25	Бензойная	0,27±0,05
Гидроксикоричная	1,69±0,32	Кофейная	0,16±0,05
Хлорогеновая	1,62±0,27	Токоферол	0,12±0,13
Салициловая	1,35±0,2		
Жирные кислоты			
αC16:0 Пальмитиновая	18,47±1,29	αC18:1 Олеиновая	2,97±0,56
αC18:3 Линоленовая	12,69±1,91	αC11:0 Ундециловая	1,39 (у 1 образца)
αC18:2 Линолевая	9,24±1,16	nOH18:0 Гидрокси октодекановая	1,09 ±0,08 (у 10% образцов)
αC18:0 Стеариновая	4,68±0,38		
Фитостеролы			
Кампестерол	2,23±0,35	Ситостерол	11,88±1,68

Органические кислоты. Установлены общие для всех образцов 19 органических кислот, при этом 16 часто встречающихся. Отмечено наибольшее количество яблочной кислоты (80,32 мг/100 г), далее по убывающей – аскорбиновой (56,2 мг/100 г), фосфорной (25,88 мг/100 г), треоновой (24,5 мг/100г), лимонной (20,57 мг/100 г). Остальные

органические кислоты присутствовали в количестве менее 10 мг/100г. Щавелевая кислота – один из самых распространенных продуктов обмена веществ, в брокколи ее содержалось в среднем 3,03 мг/100 г (диапазон изменчивости от 1,01 до 8,9 мг/100 г). Наибольшее количество органических кислот отмечено у представителей образцов брокколи: Furio (0,53%), Pentathlon (0,48%) и Brodway (0,37%).

Фенольные соединения. В брокколи найдены 15 летучих фенольных соединений (ФС): хинная, синаповая, шикимовая, ферулованя, гидроксикоричная, хлоргеновая, салициловая, амирин, 2,3-дигидроксibenзойная, никотиновая, бензойная, кофейная кислота, кониферилловый спирт, токоферол, байкалин. Суммарное содержание ФС в капусте брокколи изменялось в пределах от 14,4 до 121,79 мг/100 г. Основным ФС является хинная кислота, содержание которой составляет до 90% ФС.

Аминокислоты. Диапазон изменчивости аминокислот в образцах брокколи варьировал от 12,8 до 659,2 мг/100 г (среднее значение – 156,4 мг/100г). Общими у изученных образцов были глютамин, оксипролин, аспарагин, серин, аланин. Большая часть изученных образцов коллекции содержала глютаминовую, аспарагиновую, а также незаменимые аминокислоты треонин, валин и лейцин. Выделены образцы брокколи с высоким (более 300 мг/100 г) содержанием свободных аминокислот: Pentathlon (F1) (659,2 мг/100 г), Fordhook Late Hybrid (424,7 мг/100г), Furio (369,3 мг/100 г).

Жирные кислоты. Суммарное содержание свободных жирных кислот варьировало от 0,78 до 100,37 мг/100 г (среднее значение – 45,26 мг/100 г, табл. б). Жирные кислоты делятся на насыщенные (пальмитиновая, стеариновая), моно- и полиненасыщенные (олеиновая (омега-9)), в том числе незаменимые линолевая и линоленовая (омега-3). Наиболее высоким

содержанием свободных жирных кислот отличался образец Emerald City (F1) – 100,37 мг/100 г.

В образцах брокколи найдено 10 многоатомных спиртов, девять из которых относятся к сахароспиртам (инозитол, глицерол, галактинол, tag 1-s16:0 , сорбитол, эритритол, ксилитол, арабтинол), один – простейший стабильный аминспирт (этаноламин) и одноненасыщенный дитерпеновый спирт – фитол. Содержание спиртов в образцах варьировало от 0,32 до 362,1 мг/100 г (среднее значение – 160,9 мг/100 г). Самым широко представленным многоатомным спиртом для образцов оказался инозитол, содержание которого доходило до 304,6 мг/100 г.

Фитостеролы. В изученных образцах капусты брокколи были идентифицированы два фитостерола: кампестерол и ситостерол. Ситостерол, один из наиболее распространенных и биологически активных фитостеролов, характерен для всех образцов, кампестерол – для 80%. Содержание фитостеролов в капусте брокколи варьировало от 0,2 до 51,07 мг/100 г (в среднем – 1,66 мг/100 г). В изученных образцах наиболее высокое накопление фитостеролов отмечалось у пяти образцов (более 20 мг/100 г): Monterey (F1) (51,3), Furio (26,1), Medway (F1) (25,3), Pentathlon (F1) (24,9) и Brodway (F1) (21,15).

2.3 Молекулярно-генетический анализ образцов брокколи

Анализ полиморфизма 40 образцов проводили с использованием 30 пар SSR-праймеров, которые в совокупности генерировали 110 амплификационных фрагмента размером от 96 до 307 п.н. (табл. 7). Аллельный состав микросателлитных локусов для каждого образца определяли по набору индивидуальных фрагментов ДНК, амплифицированных парой праймеров, специфичных к уникальным последовательностям, фланкирующим определенный микросателлит. Число аллелей на локус в изученной выборке образцов варьировало от 2 (локус KS50200) до 7 (локус Na12H09), при этом среднее значение составило 4,4. Одним из главных параметров, определяющих меру информативности маркеров, является PIC. Для выбранных маркеров значения H и PIC не могут превышать 0,5, поскольку для расчетов используется бинарная матрица наличия или отсутствия полиморфного фрагмента. Для отобранных нами локусов значение PIC варьировало от 0,268 до 0,375 и в среднем составило 0,316. Наиболее информативными ($PIC > 0,35$) оказались локусы BC7, BC51, BC65, KS50200, O111B05, которые также характеризовались высокими значениями ожидаемой гетерозиготности. Ожидаемая гетерозиготность (H) варьировала от 0,301 до 0,5 и в среднем составила 0,396; Эффективное мультиплексное отношение (E) варьировало от 0,258 до 1,3 и в среднем составило 1,12. Праймеры, с помощью которых амплифицировалось большое количество полиморфных фрагментов, отличались наиболее высокими значениями E . Дискриминационная сила маркеров (D) варьировала от 0,753 до 0,966 и в среднем составила 0,91.

Двадцать пять из 30 изученных SSR-локусов оказались полиморфными в изученной выборке генотипов.

Таблица 7. Характеристика полиморфных микросателлитных локусов, выявленных у образцов брокколи

Локус	Размер фрагментов (от...до)	Число аллелей	H	PIС	E	D
BC7	105–195	6	0,462	0,355	2,175	0,869
BC38	144–254	5	0,379	0,307	1,275	0,935
BC46	108–184	3	0,444	0,345	1,000	0,890
BC48	139–215	4	0,429	0,337	1,25	0,903
BC51	99–171	2	0,500	0,375	1,000	0,753
BC65	162–246	3	0,493	0,371	1,325	0,807
BC71	158-220	4	0,438	0,342	1,30	0,895
BC89	137–205	6	0,304	0,258	1,125	0,965
Br372	162–252	3	0,449	0,348	1,025	0,885
Bras069	107–217	4	0,424	0,334	1,225	0,907
BRMS019	102–182	4	0,381	0,308	1,025	0,935
BRMS051	132–198	3	0,444	0,345	1,00	0,890
BRMS071	106–190	6	0,324	0,272	1,225	0,958
KS31100	241–272	5	0,331	0,276	1,05	0,956
KS50200	122–244	2	0,500	0,375	1,000	0,753
Na10D09	101–193	5	0,369	0,301	1,225	0,940
Na12c08	124–254	5	0,389	0,313	1,325	0,930
Na12H09	170–296	7	0,352	0,290	1,8	0,948
O111B05	96–218	3	0,476	0,362	1,175	0,848
O112F02	151–307	5	0,348	0,287	1,125	0,950
O112A04	168–266	5	0,301	0,256	0,92	0,966
O110D08	183–285	6	0,339	0,281	1,3	0,954
O112G04	122–202	5	0,320	0,268	1,000	0,960

Локус	Размер фрагментов (от...до)	Число аллелей	H	PIС	E	D
Ra2E12	100–178	5	0,320	0,268	1,000	0,960
Ra2G09	143–215	4	0,391	0,322	1,025	0,905
Средние значения		4,4	0,396	0,315	1,188	0,906

Сорта голландской селекции оказались менее полиморфными (в среднем 1,2 фрагмента на маркер), чем сорта селекции Японии и США (в среднем 1,4 фрагмента на маркер).

Таблица 8. Число и частота встречаемости аллелей 25 SSR локусов, в исследуемой выборке

Частота встречаемости	Количество локусов
Больше 95%	1
Больше 70%	9
Больше 50%	22
Больше 30%	27
Больше 10%	29
Редкие (менее 7,5%)	5
Очень редкие (менее 5%)	7
Уникальные	10

Частота встречаемости различных аллелей 25 микросателлитных локусов в изученной выборке варьировала от 0,25% до 95,1%. При этом подавляющее большинство аллелей встречалось с частотой менее 50%. Оценивая полиморфизм SSR локусов у изученных образцов, отдельно учитывали частоту встречаемости уникальных аллелей, которые присутствовали только у одного образца данной выборки и редких аллелей, частота встречаемости которых не превышала 5%.

В общей сложности у 40 образцов выявлено 5 редких, 7 очень редких и 10 уникальных аллелей (табл. 8). Уникальные аллельные профили встречались у образцов: Green Sprouting early и Hybrid Express Corona

(локус O110D08), Marathon (F1) (KS31100), Southern Comet Hybrid (O112F02), Cape Queen (F1) (BC7), Furio (O112A04), Green Goliath (Ra2E12), Coastle 87038 (BC89), Burpees green bud (BC89). Число редких аллелей составило от 1 до 3 в зависимости от локуса.

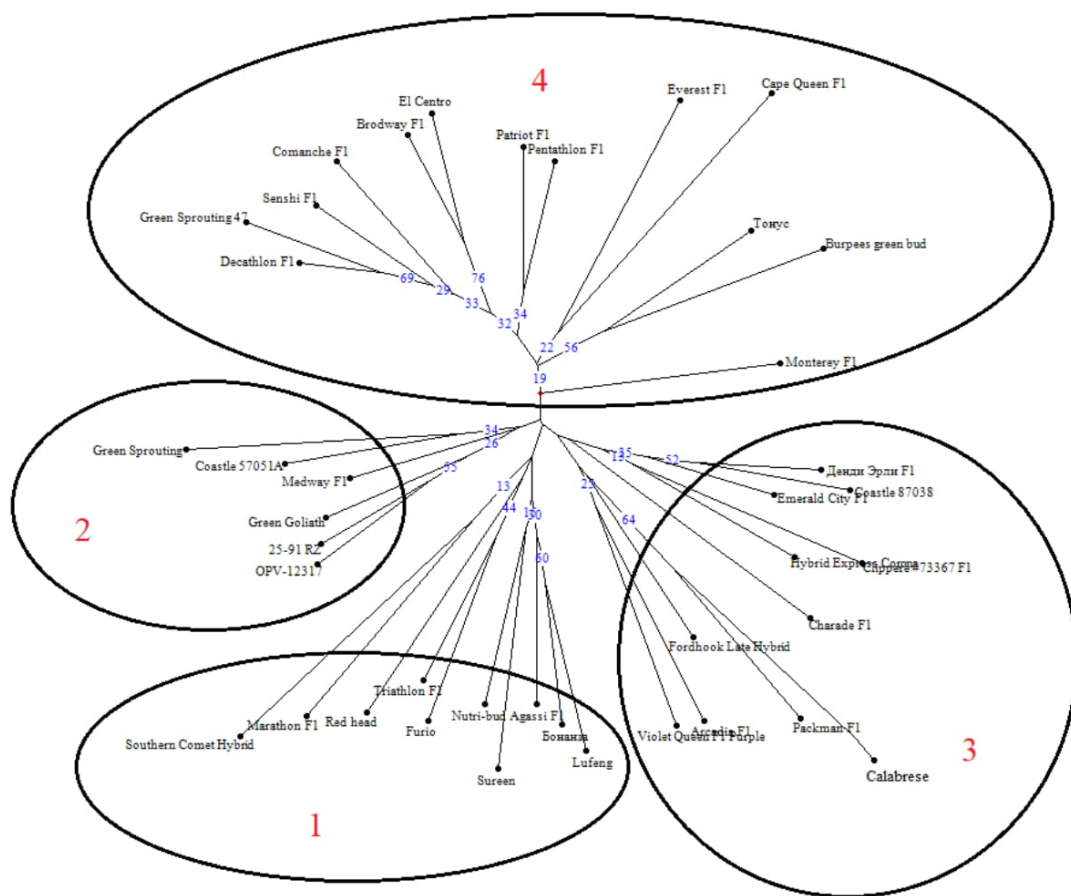
Частота встречаемости отдельных аллелей была очень высокой. Так, аллель 241 пн локуса KS31100 длиной 241 пн был представлен у 87% исследованных образцов, а аллель 201 пн локуса BC65 встречался у 95% образцов. При этом общее число аллелей, выявленное с помощью данных маркеров, составило 5 и 3 соответственно. Аллели 160 пн (локус BC46), 150 пн (BC51), 205 пн (BC89), 153 пн (O111B05) встречались у всех исследуемых образцов. Возможно, они являются специфичными для культуры.

2.3.1 Изучение генетических взаимосвязей образцов

По результатам исследования полиморфизма 25 SSR локусов был выполнен кластерный анализ для 40 сортов брокколи. Изученные образцы независимо от примененных методов кластерного анализа объединялись в смешанные группы.

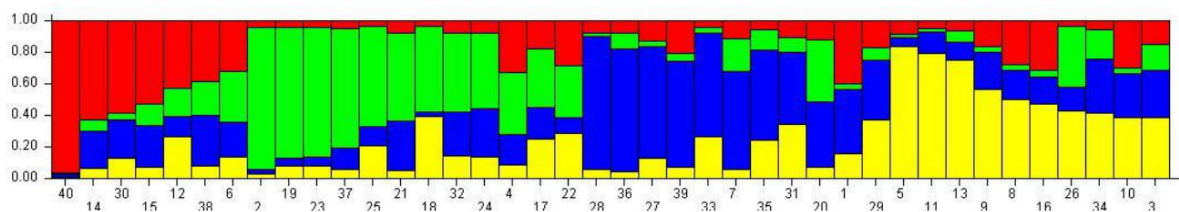
Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 25 SSR-маркеров, были использованы для построения дендрограммы генетического сходства сортов и гибридных популяций стержневой коллекции брокколи (рис. 3). На дендрограмме выделились четыре больших кластера. Образцы, входящие в состав кластеров, различались размером головки и наличием/отсутствием и количеством пасынков. В первом кластере находились образцы среднеспелые, образующие одну головку среднего размера. Во втором кластере образцы с высокой пасынкообразовательной способностью. В третий кластер вошли в основном скороспелые образцы. В четвертом кластере расположены самые позднеспелые образцы, образующие одну крупную головку.

Рисунок 3. Дендрограмма кластеризации образцов брокколи, построенная по результатам молекулярно-генетического анализа.



Анализ распределения генотипов в программе STRUCTURE показывает, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой популяции на четыре кластера ($K=4$), которые соответствуют четырем группам генотипов (рис. 4).

Рисунок 4. Результаты определения генотипической структуры изученной выборки образцов в программе STRUCTURE 2.3.4.



2.3.2 Ассоциативное картирование с использованием SSR

маркеров

При анализе ассоциаций на материале из коллекции брокколи обнаружили SSR-маркеры, тесно сцепленные с признаками качества. Были обнаружены локусы с высоким уровнем значимости. Так, определены хромосомные локусы, ассоциированные с признаками высота розетки (Na10D09_150), диаметр розетки (BC7_160, O112A04_132), ширина листовой пластинки (BC48_210, BRMS071_237, O110D08_202), длина листовой пластинки (O112A04_138), толщина черешка (KS31100_270), ширина черешка (Na10D09_155), диаметр головки и высота головки (Na10D09_155), масса головки (Ra2E12_150, KS31100_270), период вегетации (BC7_160, Na10D09_155), содержание аскорбиновой кислоты (O112F02_170), хлорофиллов (O111B05_110, BC89_205, BRMS071_280), бета-каротина (O111B05_110), органических кислот (O112A04_132), лактонов и гликозидов (O110D08_180).

Большинство маркеров, сцепленных с признаками качества, находились на третьей, четвертой и девятой группах сцепления (табл. 9).

Таблица 9. Результаты ассоциативного картирования

Признак	Локус	Группа сцепления	Уровень значимости	Значение признака при наличии локуса	Стандартное отклонение	Значение признака при отсутствии локуса	Стандартное отклонение
Морфологические и фенологические признаки							
Высота розетки (см)	Na10D09 (150)	C04	0,04	39,76±1,17	4,85	48,11±1,84	6,65
Диаметр розетки (см)	BC7 (160)	C05	0,005	69,91±3,37	11,68	58,05±2,15	9,12
	O112A04 (132)	C09	0,004	69,8±2,9	11,24	55,8±1,81	7,01
Ширина лист. пластинки (см)	BC48 (210)	R02	0,001	21,58±2,68	4,64	16,18±0,29	1,54
	BRMS071 (237)	C03	0,001	19,29±1,68	4,12	15,08±0,29	1,46
	O110D08 (202)	C08	0,001	24,75	-	16,44±0,37	2,04

Признак	Локус	Группа сцепления	Уровень значимости	Значение признака при наличии локуса	Стандартное отклонение	Значение признака при отсутствии локуса	Стандартное отклонение
Длина лист. пластинки (см)	O112A04 (138)	C09	0,01	25,63±0,66	2,58	20,36±0,65	2,54
Толщина черешка (см)	KS31100 (270)	R07	0,005	1,4	-	0,99±0,04	0,19
Ширина черешка (см)	Na10D09 (155)	C04	0,003	1,2±0,07	0,2	0,93±0,04	0,21
Диаметр головка (см)	Na10D09 (155)	C04	0,003	17,27±0,61	1,94	13,77±0,64	2,88
Высота головки (см)	Na10D09 (155)	C04	0,005775	13,27±0,43	1,36	11,05±0,42	1,9
Масса головки (кг)	Ra2E12 (150)	C02	0,007	0,15±0,02	0,03	0,38±0,03	0,16
	KS31100 (270)	R07	0,006	0,56	-	0,34±0,03	0,16
Период вегетации (дни)	BC7 (160)	C05	0,001	108,67±2,95	10,24	90,13±1,88	8,01
	Na10D09 (155)	C04	0,002	108,15±3,13	9,89	92,95±2,25	10,1
Биохимические признаки							
Аскорбиновая к-та (мг/100г)	O112F02 (170)	R09	0,002	118,44	-	51,44±3,49	18,79
Сумма хлорофиллов (мг/100г)	O111B05 (110)	C03	0,001	21,48±3,01	7,97	12,81±1,01	4,8
	BC89 (205)	R06	0,002	53,11	-	22,22±1,55	8,38
	BRMS071 (280)	C03	0,003	17,42±1,75	5,8	26,79±2,31	10,1
Хлорофилл α (мг/100г)	O111B05 (110)	C03	0,001	21,48±3,01	7,97	12,81±1,01	4,8
	BC89 (205)	R06	0,001	35,81	-	14,11±1,01	5,46
Хлорофилл β (мг/100г)	O111B05 (110)	C03	0,002	11,91±0,93	2,81	6,93±0,53	2,46
	BRMS071 (280)	C03	0,003	6,91±0,81	2,7	9,67±0,75	3,28
Каротиноиды (мг/100г)	OL12A04 (120)	C09	0,006	9,71±1,31	2,6	7,1±0,47	2,4
Бега-каротин (мг/100г)	O111B05 (110)	C03	0,002	1,63±0,17	0,45	1,06±0,07	0,37
Органические кислоты (мг/100г)	O112A04 (132)	C09	0,007	450,77±78,38	110,84	225,33±16,54	87,53
Лактоны (мг/100г)	O110D08 (180)	C09	0,002	85,81	-	25,69±3,29	17,75
Гликозиды (мг/100г)	O110D08 (180)	C09	0,001	32,11	-	4,93±0,98	5,29

2.3.3 QTL-анализ

Морфологические и биохимические данные о картирующей популяции AGDH, собранные в течение двух лет, были использованы для QTL-анализа.

В результате проведенных исследований было осуществлены измерения по восьми идентифицированным признакам. Выявлено 23 QTL, проявляющиеся во всех экологических условиях, из которых 3 имели $LOD \geq 3$; 16 - $3 > LOD \geq 2$; 4 - $2 > LOD \geq 1$. Локусы с LOD-оценкой выше 3 расценивались как основные, с LOD между 2 и 3 – как сильные, а с LOD ниже 2 – как минорные (табл. 10; указаны названия признаков, а также местоположение графических пиков QTL, соответствующих максимальному значению LOD-оценки для анализируемого QTL).

Таблица 10. Картирование QTL морфологических и биохимических признаков качества

Группа сцепления	Позиция	Локус	LOD (среднее за два года)	% Expl.
Диаметр розетки листьев				
02	13,000	pW116E1	2,45	24,0
05	14,700	pN23E3	2,47	24,7
06	0,000	AC-CTCE01	1,71	19,7
Высота растения				
01	69,700		2,21	15,7
03	16,700	LEW6E1	2,58	25,2
04	71,000	pW139E1	1,76	20,7
09	50,900	pO106E3	2,03	14,7
Длина черешка				
01	67,700		1,09	11,5
04	38,300	AC-CACE20	2,64	28,0

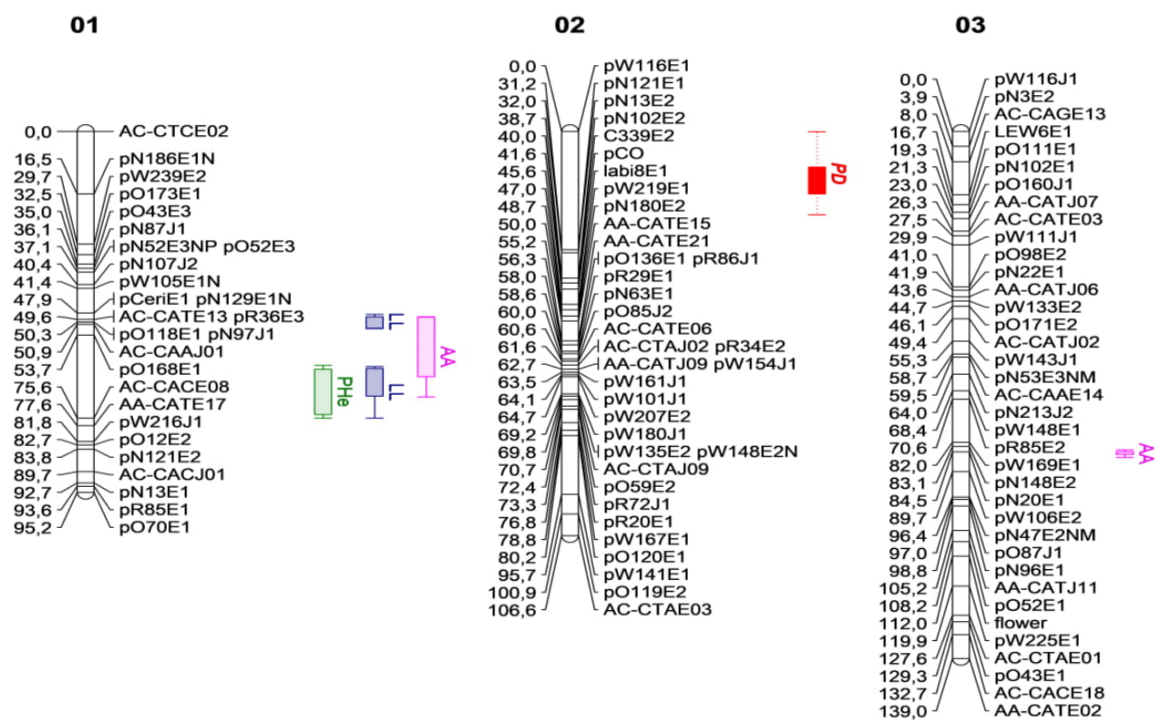
06	28,800	pS29	2,81	27,1
09	2,000	pN87E3NP	2,01	13,0
Длина пластинки листа				
01	64,700		2,83	27,3
04	23,600	pO171J1	2,53	27,0
08	77,500	pN34E1	2,48	24,3
09	2,000	pN87E3NP	1,99	13,0
Содержание аскорбиновой кислоты				
01	61,700		2,08	21,8
01	95,200	pO70E1	2,30	23,8
03	85,200	AC-CAGE01	2,82	28,3
Содержание белка				
04	37,000	pN180E6N	2,33	24,0
07	25,500	pR3E1	3,05	30,3
Сухое вещество				
09	69,300	pW195J1	3,41	33,1
Содержание каротиноидов				
09	85,600	pC14(cos)	3,01	29,7

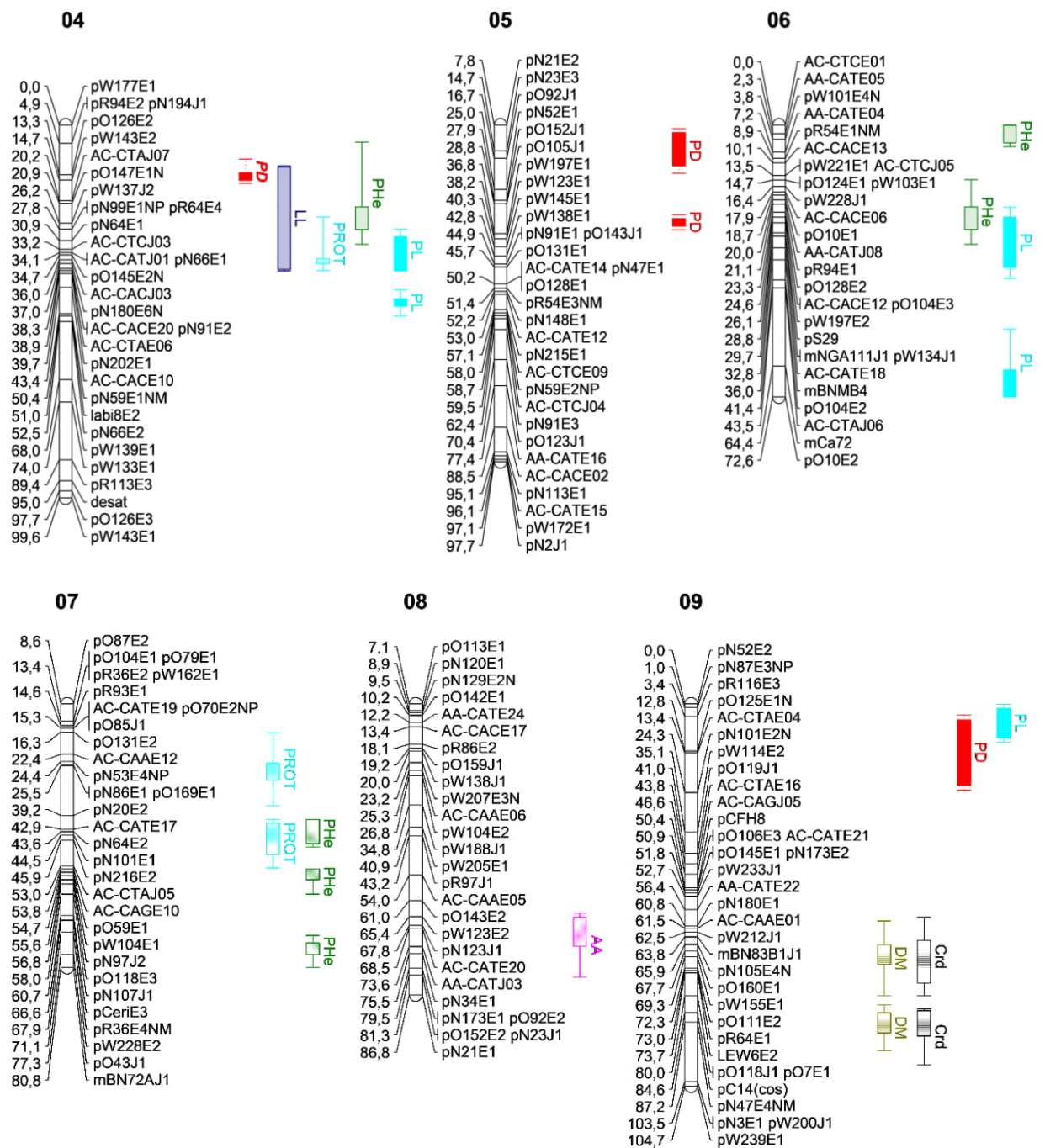
Так, в популяции AGDH были выявлены QTL, контролирующие диаметр розетки, высоту растения, длину черешка, длину пластинки, содержание аскорбиновой кислоты, белков, каротиноидов, сухого вещества. Локусы, контролирующие изученные морфологические и биохимические признаки, находились преимущественно в одном кластере в первой, четвертой и в девятой группах сцепления. Высота растения, длина пластинки и содержание аскорбиновой кислоты - в первой группе сцепления и были локализованы в позиции 61,7-77 сМ. В четвертой группе сцепления были обнаружены локусы, контролирующие длину пластинки листа, высоту растения, длину черешка и содержания белка (в позиции 23,4-34,1 сМ). Локусы, которые влияют на морфологические и биохимические признаки качества находились в разных участках девятой хромосомы. Локусы морфологических признаков высоты растения и длины черешка были сгруппированы в позиции 35 сМ, а биохимических

признаков содержания сухого вещества и каротиноидов в позиции 89 сМ. Отдельные QTL содержания аскорбиновой кислоты отмечались во второй и восьмой хромосоме; высота растения и длина черешка в шестой и седьмой хромосоме; диаметр розетки в пятой хромосоме (рис. 5).

По результатам QTL-анализа были картированы в группах сцепления *B. oleracea* локусы количественных признаков. Многие локусы, сцепленные с различными признаками качества кластеризовались в сходных позициях. Так были идентифицированы кластеры QTL, находящиеся в первой (содержание аскорбиновой кислоты, длина листовой пластинки, высота растения), в четвертой (диаметр растения, длина листовой пластинки, содержания белка, высота растения, длина черешка), седьмой (содержание белка, высота растения) и девятой (диаметр растения, длина черешка) группах сцепления.

Рисунок 5. Картирование QTL в группах сцепления *B. oleracea*





PD – диаметр розетки; Phe – высота растения; PL – длина черешка; LL – длина пластинки; AA – содержание аскорбиновой кислоты; PROT – содержание белка; Crd – содержание каротиноидов; DM – содержание сухого вещества .

Выводы

1. Изученная коллекция брокколи характеризуется широким диапазоном изменчивости по фенологическим, морфологическим и биохимическим признакам и продуктивности ($C_v=17,9-55,7\%$), что способствует высокой результативности отбора по признакам селекционного интереса.

Амплитуда изменчивости продолжительности вегетационного периода 78-125 дней, массы головки – 75-655 г; урожайности 1,3-8,3 кг/м².

2. Выявлено 136 компонентов биохимического состава образцов брокколи. Идентифицировано 95 компонентов из групп органических кислот, свободных аминокислот, в том числе незаменимых, жирных кислот, в том числе незаменимых, многоатомных спиртов, сахаров, а также фенолсодержащих соединений, восков, нуклеозидов.

Амплитуда изменчивости содержания сухого вещества в условиях Ленинградской области – 8,0-15,4%, аскорбиновой кислоты – 28,2-118,4 мг/100г.

3. Выделен перспективный исходный материал для селекции: - *на скороспелость*: Cape Queen (F1) (к-296, Япония), Emerald City (F1) (к-292, Япония), Дэнди Эрли (F1) (к-290, Япония), Hybrid Express Corona (к-284, Япония); - *на компактную листовую розетку*: Everest (F1) (к-298, Канада), Бонанза (к-276, США), Comanche (F1) (к-299, Япония), Fugio (вр.к-350, Нидерланды); - *на продуктивность*: Decathlon (F1) (к-304, Нидерланды), Triathlon (F1) (к-301, Япония), Marathon (F1) (к-297, Нидерланды); - *на повышенное содержание сухого вещества, белка и аскорбиновой кислоты*: El Centro (к-302,

Великобритания), Pentathlon (F1) (к-306, Япония), Southern Comet Hybrid (к-295, Япония); на повышенное содержание хлорофиллов, каротиноидов, бета каротина: Coastle 87038 (к-212, Канада).

4. С помощью 25 микросателлитных локусов генотипированы 40 образцов стержневой коллекции брокколи (*B. oleracea* var. *italica* L.). Установлен высокий полиморфизм некоторых микросателлитных локусов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения протестированных маркеров для оценки генетического разнообразия брокколи, а также при разработке методов идентификации и паспортизации сортов. С помощью отобранного нами набора из 7 SSR-маркеров (O110D08, KS31100, O112F02, BC7, O112A04, Ra2E12, BC89) могут быть идентифицированы и паспортизированы 10 образцов брокколи.
5. По результатам ассоциативного картирования в третьей, четвертой и девятой группах сцепления идентифицированы маркеры, сцепленные с морфологическими и биохимическими признаками качества.
6. Определены молекулярные маркеры, генетически сцепленные с идентифицированными QTL, определяющими морфологические и биохимические признаки качества. Выявленные локусы количественных признаков были картированы на группах сцепления *B. oleracea*. Найденные молекулярные маркеры могут быть использованы для скрининга образцов коллекции и селекционного материала по изученным в данной работе признакам качества, а также для переноса в селекционные сорта локусов хромосом, определяющих эти хозяйственно ценные признаки.
7. QTL-анализ картирующей популяции и ассоциативное картирование образцов коллекции брокколи привели к сходным результатам. Были

найжены и картированы генетические локусы, расположенные в четвертой и девятой группах сцепления *B. oleracea* var. *italica* L., ассоциированные с признаками высота и диаметр розетки листьев, длина листовой пластинки, ширина черешка и содержание сухого вещества.

Список литературы

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Москва, 12 марта 2020 г. / Официальный сайт ФБНУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений» (ФГБУ «Госсорткомиссия») <http://reestr.gossort.com>
2. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов. Генетика, 1997, 33(4): 358-365.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985.
4. Методические указания по изучению и поддержанию мировой коллекции капусты. Л., ВИР. 1988. -117с.
5. Смоликова Г.Н., Шаварда А.Л., Алексейчук И.В., Чанцева В.В., Медведев С.С. Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1): 121-127.
6. Фролова, О. Брокколи. Вкус и польза от природы. Овощи России. – 2014;25(4): 88-93
7. Amiryousefi A., Hyvönen J., Poczai P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 2018;6(6).
8. Basten GP, Bao Y, Williamson G. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*. 2002;23: 1399–1404
9. Bohuon E.J.R., Keith D.J., Parkin I.A.P., Sharpe A.G., Lydiate D.J. Alignment of the conserved C genomes of *Brassica oleracea* and *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1996;93: 833–839.

10. Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 2007;23: 2633-2635.
11. Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour*. 2015;15(5):1179-1191.
12. Lowe A.J., Jones A.E., Raybould A.F., Trick M, Moule C.J., Edwards K.J. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the Utriangle. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2:7–11.
13. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Curhan GC, Willett WC, Giovannucci EL: Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *N. Engl. J. Med.* 1999;340, 1390–1397.
14. Myers J. R. Broccoli Breeding, Evaluation and Seed Production. Research report to Oregon Processed Vegetable Commission. OSU Dept of Hort. – 2014. 1-12
15. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *PNAS USA*, 1979;76: 5269-5273
16. Rae A., Howell E., Kearsey M. More QTL for flowering time revealed by substitution lines in *Brassica oleracea*. *Heredity*. 1999;83: 586–596.
17. Singh J, Rai M, Upadhyay A.K., Bahadur A., Chaurasia S.N., Singh, K.. Antioxidant phytochemicals in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck) cultivars. *Journal of Food Science and Technology*. Mysore. 2006;43: 391-393.
18. Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana* the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics*. 2006;173: 309–319.

19. Verhoeven D., Goldbohm R.A., van Poppel Geert, Verhagen Hans, Brandt P.A. Epidemiological studies on *brassica* vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:733-748. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 1996;5: 733-48.
20. Walley P.G., Carder J., Skipper E. A new broccoli × broccoli immortal mapping population and framework genetic map: tools for breeders and complex trait analysis. *Theor Appl Genet.* 2012;124: 467–484.
21. Wu L., Hossein M., Ashraf N, Facci M., Wang R., Paterson PG., Ferrie A., Juurlink BH. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 2004;101(18): 7094-7099.
22. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR: Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* 1999;149: 943–949.

Список опубликованных работ

Список публикаций результатов исследования в журналах ВАК:

1. Фатеев Д.А., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. QTL анализ морфологических и биохимических признаков у *Brassica oleracea* L. "Плодоводство и ягодоводство России", 2016 г. Стр. 336-339.

2. Артемьева А.М., Кочерина Н.В., Курина А.Б., Фатеев Д.А., Чесноков Ю.В. Картирование локусов хозяйственно ценных признаков у овощных культур семейства капустные (*Brassicaceae* Burnett). Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего. Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Агрофизического НИИ. 2017. С. 231-235.

3. Фотев Ю.В., Артемьева А.М., Фатеев Д.А., Наумова Н.Б., Бугровская Г.А., Белоусова В.П., Кукушкина Т.А. особенности морфологии, биохимического состава и генетического полиморфизма китайской брокколи - новой для России овощной культуры. Овощи России. 2018. № 1 (39). С. 12-19.

4. Фатеев Д.А., Артемьева А.М. "Молекулярно-генетическая характеристика образцов брокколи (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) коллекции вир". Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции (в печати).

В других изданиях:

1. Fateev D.A., Artemeva A.M., Chesnokov Yu.V. QTL analysis of *Brassica oleracea* L. biochemical traits. тезисы доклада на конференции "Biotehnologii Avansate – Realizări Şi Perspective". Al IV-lea Simpozion național cu participare internațională. 2016. С. 13.

2. Фатеев Д.А., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Молекулярно-генетический анализ образцов брокколи коллекции вир *Brassica oleracea*

var. italica. Идеи Н. И. Вавилова в современном мире Тезисы докладов IV Вавиловской международной научной конференции. Федеральное агентство научных организаций; Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР); Вавиловское общество генетиков и селекционеров Санкт-Петербурга; Научный совет «Биология и медицина»; Санкт-Петербургский научный центр РАН. 2017. С. 206-207.

3. Фатеев Д.А., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Выявление QTL, определяющих биохимические признаки у *Brassica oleracea* L. Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. Сборник тезисов XVIII Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. 2018. С. 73-74.

4. Фатеев Д.А., Артемьева А.М. Морфо-биологические и молекулярно-генетические особенности образцов коллекции брокколи ВИР. 125 лет прикладной ботаники в России сборник тезисов. Министерство науки и высшего образования РФ, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. 2019. С. 192.

5. Артемьева А.М., Фатеев Д.А., Соловьёва А.Е. Оценка биохимических признаков качества у образцов брокколи и цветной капусты коллекции ВИР. 125 лет прикладной ботаники в России сборник тезисов. Министерство науки и высшего образования РФ, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. 2019. С. 112.

6. Артемьева А.М., Соловьёва А.Е., Фатеев Д.А. Каталог Мировой коллекции ВИР «Цветная, брокколи, белоцветковая (комплексная оценка по селекционно-ценным признакам)», вып. 893, ВИР, СПб, 2019