

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДВУХ QTL, КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЬНА К ФУЗАРИОЗНОМУ УВЯДАНИЮ

© 2024 г. Т.А. Рожмина*, А.А. Канапин**, М.П. Банкин**, М.Г. Самсонова**, #

*Федеральный научный центр лубяных культур, Комсомольский пр., 17/56, Тверь, 170041, Россия

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Политехническая ул., 29, Санкт-Петербург, 195251, Россия

#E-mail: m.g.samsonova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 20.06.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Совместный анализ сегрегантов был применен для анализа популяции F₂ от скрещивания двух сортов льна, различающихся по генам устойчивости к фузариозному увяданию. Возбудитель этого заболевания, гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* — один из основных патогенов льна, причиняющий огромный экономический ущерб его мировому производству. Секвенирование пулов ДНК сильно устойчивых и чувствительных к фузариозному увяданию растений F₂ и их последующий анализ идентифицировали два района на 9-й и 13-й хромосомах, которые обуславливают устойчивость к фузариозному увяданию. Гены-кандидаты для последующего анализа выбраны путем функциональной аннотации генов и анализа экспрессии генов QTL-районов в транскриптомных данных, полученных в результате заражения устойчивого к фузариозу сорта Atalante. В результате объединения двух подходов было идентифицировано по три гена в каждом из QTL-районов, которые по литературным данным участвуют в ответе растения на заражение и дифференциально экспрессировались в транскриптомном эксперименте.

Ключевые слова: лен; фузариозное увядание, устойчивость, QTL, совместный анализ сегрегантов.

DOI: 10.31857/S0006302924010072, **EDN:** RDOSAW

Одним из основных патогенов льна (*Linum usitatissimum* L.), причиняющим огромный экономический ущерб производству этой важной сельскохозяйственной культуры, является гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Гриб проникает в растение через корни, а затем колонизирует ксилему и блокирует поступление воды и питательных веществ. В результате растение желтеет, листья увядают, а повреждение сосудистой ткани в конечном итоге приводит к гибели растения [1]. Хламидоспоры гриба в почве крайне трудно поддаются элиминации и могут сохраняться в ней до 50 лет [2].

Для борьбы с фузариозом используют различные агротехнические приемы и пестициды [3], однако пестициды опасны для здоровья человека [4] и наносят ущерб структуре и функционированию экосистемы [5]. Поэтому наиболее эффективными средствами борьбы с заболеванием остаются создание устойчивых сортов и мониторинг почв на присутствие патогена [6, 7].

Коллекция льна, созданная в Федеральном научном центре лубяных культур, является одной из крупнейших в мире. Скрининг этой коллекции

на устойчивость к фузариозному увяданию позволил идентифицировать 10 генов устойчивости [6, 7], однако локализация этих генов в геноме льна не установлена.

Механизмы устойчивости льна к фузариозному увяданию до сих пор полностью не изучены. Важную роль в восприятии патогена на начальном этапе заражения играют рецепторы распознавания паттерна [8], которые являются эволюционно консервативными рецептор-подобными киназами, локализованными в мембране. Они распознают характерные молекулы — молекулярные паттерны, связанные с патогенами/микробами, и тем самым включают иммунный ответ, называемый «иммунитетом, запускаемым паттерном». Данный иммунитет играет важную роль в базальной резистентности в ответ на успешное заражение адаптированным патогеном [9]. В установлении следующего уровня защиты, так называемого эффекторного иммунитета, принимает участие второй класс рецепторов, кодируемых R-генами и распознающих эффекторы — продукты генов авирулентности патогена [10, 11]. Гены R классифицированы по пяти классам и

включают гены, кодирующие белки NBS-LRR с доменом связывания нуклеотидов и богатыми лейцином повторами: гены рецептор-подобных киназ, гены, продуцирующие рецептор-подобные трансмембранные белки, гены серинтреонинкиназ и атипичные R-гены [12, 13]. Не так давно было продемонстрировано, что распознавание R-гена эффектором может быть как прямым, так и опосредованным [14]. Нижестоящие сигнальные пути, такие как каскады MAP-киназ, потоки кальция, продукция активных форм кислорода и сети гормональной регуляции, являются во многом общими для иммунитета, запускаемого паттерном, и эффекторного иммунитета [15].

Из-за возросшего экономического значения лен становится объектом интенсивных исследований в области геномики. Анализ омиксных данных расширил наши знания о генах устойчивости к фузариозному увяданию, полученных с помощью классических генетических подходов [2]. Транскриптомные эксперименты подтвердили важную роль R-белков, компонентов клеточной стенки, факторов транскрипции, вторичных метаболитов и антиоксидантов в ответной реакции льна на *F. oxysporum* f. sp. *lini* [16–18].

QTL-анализ (анализ локусов количественных признаков — Quantitative Trait Loci) позволил идентифицировать два района, объясняющих 38 и 26% фенотипической вариативности по признаку устойчивости, расположенных в группах сцепления 6 и 10 [19, 20], а в наших исследованиях были выявлены три района на 1-й, 8-й и 13-й хромосомах, ассоциированных с устойчивостью [21].

Ассоциативное картирование широко используется для идентификации районов генома, обуславливающих наблюдаемую фенотипическую вариацию признака. Одним из его вариантов является BSA-анализ (совместный анализ сегрегантов — Bulk Segregant Analysis) [22, 23]. Метод оперирует с сегрегирующей популяцией от генетического скрещивания, растения которой тестируют на признак интереса и создают две группы (пула) сегрегантов путем отбора растений из хвостов фенотипического распределения. Частоты аллелей оцениваются в этих двух группах путем полногеномного секвенирования суммарной ДНК образцов, входящих в группы. В геномных регионах, не содержащих ассоциаций, влияющих на признак, частоты аллелей должны быть приблизительно равны между двумя группами. И наоборот, регионы генома, содержащие причинные ассоциации, должны иметь статистически значимые различия в частоте аллелей между группами, которые выявляют путем вычисления G-статистики.

Здесь мы применили BSA-анализ для анализа сегрегирующей популяции F_2 от скрещивания двух сортов льна, различающихся по генам устойчивости, и идентифицировали два района на 9-й

и 13-й хромосомах льна, обуславливающих устойчивость к фузариозу. Один из этих районов на 9-й хромосоме является новым, не выявленным ранее в GWAS-анализе [21].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве исходного материала были использованы гибриды F_1 и F_2 от скрещиваний селекционной линии № 3896 (Ru5635, Россия), обладающей геном устойчивости к фузариозному увяданию *Fu4* [24] и высокоустойчивой к популяции патогена линии AGT 987 (CzAGT7225, Чехия). Оценка гибридов F_1 , F_2 и их исходных родительских форм проведена на инфекционном фоне с моноизолятом MI39 гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

Оценка на устойчивость к фузариозному увяданию выполнена в условиях вегетационного домика в ящичном посеве. Закладка питомников и оценка материала осуществлялись в соответствии с методическими указаниями по фитопатологической оценке устойчивости льна-долгунца к болезням. Инфекционный фон при посеве в ящиках создавался путем внесения чистой культуры моноизолята MI39 гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* из расчета 400 г на ящик размером 50 × 85 × 20 см.

Почва для инфекционного питомника на устойчивость к фузариозному увяданию рано весной была просеяна через грохот, в первых числах мая приступили к набивке (заполнению) ящиков. После набивки на 2/3 ящика в него была внесена чистая культура возбудителя, затем ее засыпали почвой до верха ящика. Наполненные таким образом ящики с почвой обильно поливали водой, затем покрывали полиэтиленовой пленкой для развития инфекции фузариума в почве. Посев гибридов F_1 , F_2 и их родительских форм был проведен спустя две недели после внесения инфекции. Родительские формы и гибриды F_1 высевались по 16 штук семян, гибриды F_2 — 190 штук семян. В качестве стандартов использовали контрастные по устойчивости к фузариозному увяданию генотипы льна-долгунца: сильновосприимчивый AP 5 и высокоустойчивый И-7. Перед посевом почва тщательно выравнивалась, затем маркировалась ящичным маркером. Площадь питания одного растения составляла 2.5 × 2.5 см.

Учет пораженности болезнями проводили в фазу полных всходов льна. Окончательный учет пораженности льна фузариозом выполнен в период уборки — в фазу ранней желтой спелости. При фитопатологическом анализе стеблей льна определяли количество пораженных растений и степень поражения по четырехбалльной шкале:

0 — отсутствие поражения, здоровое растение;

1 — частичное побурение растения, одностороннее побурение стебля;

2 — побурение всего растения с коробочками;

3 — полностью бурое, погибшее или отмершее растение до образования коробочек.

При анализе расщепления в F_2 по устойчивости к фузариозному увяданию все растения были разделены на два класса — устойчивые (балл 0) и восприимчивые (баллы 1, 2, 3).

Для проведения молекулярных исследований выполнен сбор листьев с каждого растения гибридов F_2 , который осуществляли в период начала фазы «елочка» (три-четыре пары настоящих листьев). После проведения фитопатологической оценки для данных целей был отобран биоматериал от контрастных по устойчивости к фузариозному увяданию растений, выборка включала 17 устойчивых и 17 восприимчивых растений.

Выделение ДНК и секвенирование. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США) был использован для выделения ДНК из собранных листьев. Для секвенирования ДНК в Пекинском институте генома (BGI, Китай) использовался протокол Illumina, генерирующий парные концевые чтения 150 п.н. Чтения были обработаны и выровнены относительно референсной геномной сборки льна NCBI ASM22429v2 с помощью bwa-mem с использованием параметров по умолчанию [25]. NGSEP [26] версии 4.0. использовался для поиска вариантов.

G'-анализ. Поиск районов со статистически значимыми различиями в частоте аллелей между группами сегрегантов выполнили, применяя пакет QTLsegr [22, 27], версия 0.7.5.2. Фильтрацию данных проводили со следующими параметрами: refAlleleFreq = 0.25, minTotalDepth = 50, maxTotalDepth = 300, depthDifference = 50, minSampleDepth = 40, minGQ = 99. Значение параметра фильтрации для функции runGprimeAnalysis по параметру absolute delta SNP index составляло 0.1.

Транскриптомный анализ. Проростки устойчивого к фузариозному увяданию сорта масличного льна Atalante заразили штаммом гриба MI39. Выделение РНК было выполнено в трех независимых повторностях (репликатах) на третьи и пятые сутки после заражения как в контрольных условиях, так и при грибковой инфекции. Из девяти образцов, каждый из которых включал материал от трех до пяти корней, была выделена РНК. Тотальную РНК из инфицированных корней выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Качество тотальной РНК оценивали методом капиллярного электрофореза на чипах с помощью биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Образцы РНК хранили при -20°C . Выделенные транскрипты секвенировали на платформе DNBSEQ в Пекин-

ском институте генома с длиной парных прочтений 100 нуклеотидов. Полученные прочтения были отфильтрованы с помощью SOAPnuke [28] со следующими параметрами: доля пропущенных значений менее 3%, совпадение последовательности прочтения с последовательностями адаптеров менее 25%, качество половины нуклеотидов в прочтении более 20 по шкале phred64 [29].

Аннотирование генов в QTL-регионах. Функция генов-кандидатов была определена на основе функции их ортологов у *Arabidopsis* (база данных TAIR), аннотации генома льна, предоставленной группой С. Клубье (Научно-исследовательский центр Оттавы, Канада) [30], и функции гомологичных генов у других видов растений, как описано в литературе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический анализ сегрегирующей популяции. Для идентификации районов генома льна, обуславливающих устойчивость к фузариозному увяданию была получена сегрегирующая популяция F_2 от скрещивания сортов 3896 (Ru5635) $\times$ AGT 987 (CzAGT7225), устойчивых к фузариозному увяданию под воздействием высоковирулентного моноизолята MI39 *F. oxysporum* f. sp. *lini*.

Оценка родительских форм льна на фоне с MI39 показала высокий уровень их устойчивости к патогену: 100 и 93.7% соответственно. На жесткость инфекционного фона указывает степень поражения восприимчивого стандарта — линии AP 5, степень поражения которого составила 87.5%. Высокий уровень устойчивости линии AGT 987 к MI39 указывает на наличие у нее высокоэффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию. Устойчивость к фузариозному увяданию у льна детерминруется доминантными генами, что подтверждают результаты оценки F_1 от скрещиваний родительских линий, где устойчивость составила 100%.

По результатам гибридологического анализа расщепления F_2 соотношение составило 169 устойчивых и 19 восприимчивых к фузариозному увяданию растений. Как показывают расчеты, проведенные с учетом неполной пенетрантности признака [31], данное расщепление соответствует теоретически ожидаемому 15R : 1S (табл. 1).

Из полученных результатов следует, что устойчивость к фузариозному увяданию у линии AGT 987 детерминруется одним доминантным эффективным геном, который не идентичен гену *Fu4*.

Таблица 1. Расщепление по устойчивости к фузариозному увяданию в F₂ от скрещивания между устойчивыми линиями (инфекционный фон – М139 *F. oxysporum*)

Ген Fu ♀	Гибридная комбинация	Поражено растений, %			Соотношение фенотипов R : S в F ₂		χ^2	P
		P ₁	P ₂	F ₁	фактическое	теоретическое		
4	№ 3896 (Ru5635) × AGT 987 (CzAGT7225)	0	6.3	0	168 : 19	15 : 1	0.12	0.5–0.8

Примечание: χ^2 рассчитан с поправкой на неполную пенетрантность признака.

Формирование и секвенирование пулов ДНК.

У 17 сильно устойчивых и 17 чувствительных к фузариозному увяданию растений были собраны листья, из которых затем была выделена ДНК. Пулы ДНК для растений устойчивой и чувствительных групп были созданы путем объединения аликвот ДНК индивидуальных растений, рассчитанных так, чтобы количество ДНК, пришедшее от каждого растения в пул, было бы одинаковым.

Секвенирование пулов дало 282134312 прочтений или около 141 млн прочтений на пул ДНК. Для исходных родительских генотипов было получено 64 460786 прочтений или около 32 млн прочтений на образец. Выравнивание с референсной геномной сборки льна NCBI ASM22429v2 позволило картировать не ниже 95% чистых прочтений. Средняя глубина секвенирования для пулов ДНК составила 68×, а для родительских линий – 12×. Поиск вариантов выявил 1282380 биаллельных снупов, различающихся у родительских сортов.

BSA-анализ. Совместный анализ сегрегантов идентифицировал два статистически значимых района, которые локализуются на 9-й и 13-й хромосомах (табл. 2). QTL на хромосоме 13 имеет размер 840691 п.н. и включает в себя полиморфную позицию 4884610, ассоциированную с устойчивостью к фузариозу по результатам ранее выполненного GWAS [21]. QTL на хромосоме 9 идентифицирован впервые, он имеет размер 748334 п.н.

Выбор генов-кандидатов для последующего анализа. Гены-кандидаты для последующего анализа выбирали, используя два подхода: путем функциональной аннотации генов и анализа экспрессии генов QTL-районов в транскриптомных данных, полученных в результате заражения устойчивого к фузариозу сорта Atalante моноизолятом М139. В результате объединения этих двух подходов было идентифицировано по три гена на каждой из хромосом, которые по литературным данным участвуют в ответе растения на заражение и дифференциально экспрессировались в транскриптомном эксперименте (табл. 3). Гены *Lus10005483*, *Lus10005484* и *Lus10005491* начинали экспрессироваться на третьи сутки после заражения.

Таблица 2. QTL-районы устойчивости к фузариозному увяданию, выявленные методом совместного анализа сегрегантов

QTL	Хромосома	Координаты		Количество снупов	Пик G'	Координата пика	Среднее G'	Стандартное отклонение G'	qval
		начало	конец						
1	9	8147198	8895532	1151	5.31	8895532	5.28	0.06	0.005
2	13	4386470	5227161	587	5.22	5121314	5.12	0.09	0.006

Примечание: qval – p-уровень значимости с поправкой Бенджамини–Хохберга (q-value).

Таблица 3. Гены QTL-районов, значимо экспрессирующиеся при заражении устойчивого к фузариозу сорта *At-alante* моноизолятом MI39

Хромосома	Ген	Координаты	Функция	Дифференциальная экспрессия			
				на третьи сутки		между третьими и пятыми сутками	
				qval	LFC	qval	LFC
9	Lus10005483	8277987–8280578	NADP-malic enzyme 2	5.74e-4	3.22	—	—
9	Lus10005484	8281754–8284844	NADP-malic enzyme 3	7.03e-4	2.61	—	—
9	Lus10005491	8321723–8324951	Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain	6.44e-5	2.80	—	—
13	Lus10009328	4871884–4875204	Homolog of RPW8 3	2.61e-4	6.42	0.04	1.75
13	Lus10009352	5059456–5061003	Accelerated cell death 2 (ACD2)	0.007	1.35	0.04	1.45
13	Lus10034795	4643996–4646254	RLK	—	—	0.003	11.33

Примечание: LFC — логарифм по основанию 2 отношения нормализованных количественных оценок экспрессии между условиями; qval — *p*-уровень значимости с поправкой Бенджамини–Хохберга (*q*-value).

Lus10005483 и *Lus10005484*, ортологи генов *AT5G11670* и *AT5G25880* соответственно, кодируют НАДФ-зависимые ферменты, которые участвуют в метаболизме малата и обеспечивают строительные блоки и энергию для синтеза двух связанных с защитой от патогенов вторичных метаболитов, флавоноидов и предшественника лигнина, монолигнола. Кроме того, эти ферменты могут производить НАДФ для синтеза активных форм кислорода [32]. Киназы с доменами, составленными обогащенными лейцином повторами (LRR), одну из которых кодирует ген *Lus10005491*, играют центральную роль в передаче сигналов во время распознавания патогенов и последующей активации защитных механизмов растений [33]. Ортолог этого гена у *A. thaliana*, *AT5G25930*, кодирует LRR-киназу трансмембранного рецептора, который связывает фитоцитоклиновые сигнальные пептиды SCREW во время иммунного ответа растения [34]. Гены *Lus10009328* и *Lus10009352* на хромосоме 13 дифференциально экспрессируются на третьи сутки заражения и между третьими и пятыми сутками. Ортолог *Lus10009328* у *Arabidopsis*, *AT3G50470* (*RPW8*, *HR3*), определяет устойчивость этого растения к грибу-возбудителю мучнистой росы и локализуется в экстрагаусториальной мембране

[35]. Интересно, что у льна также обнаружен кластер генов *RPW8* на 13-й хромосоме, который ассоциирован с устойчивостью к мучнистой росе и положение которого (4.7–5.2 Mb), совпадает с обнаруженным нами QTL [36]. Белок *Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH 2* (*ACD2*), ортолог *Lus10009352*, участвует в регуляции гиперчувствительного ответа растений при патогенной инфекции [37]. Еще один ген на хромосоме 13, *Lus10034795*, кодирует рецептор-подобную протеинкиназу и сильно дифференциально экспрессируется между третьими и пятыми сутками заражения. Ферменты этого класса играют ключевую роль в базальном иммунитете путем распознавания патогенных/микробно-ассоциированных молекулярных паттернов [38].

ВЫВОДЫ

Совместный анализ сегрегантов популяции F₂ от скрещивания двух устойчивых сортов льна, позволил идентифицировать новый район, ассоциированный с устойчивостью к фузариозному увяданию, на 9-й хромосоме QTL-Lu9-(8147198-8895532) и подтвердить статистическую значимость QTL-Lu13-(4386470-5227161) на 13-й хромосоме. Последнее важно, поскольку, хотя в ра-

боте [21] в этой области и был идентифицирован QTN Chr13:4884610, ассоциированный с устойчивостью, аллельный эффект этого полиморфизма не был статистически значим. Значимость района QTL-Lu13-(4386470-5227161) для контроля устойчивости к фузариозному увяданию подтверждается также присутствием в этой области генов с высоким уровнем транскрипционного ответа на инфекцию (табл. 3). Интересно также, что QTL-Lu13-(4386470-5227161) совпадает с QTL, обнаруженным в работе [36] и ассоциированным с устойчивостью к мучнистой росе. Вместе с тем высокая гетерозиготность родительских генотипов не позволяет однозначно ответить на вопрос о том, какой из этих районов соответствует гену *Fu4*, идентифицированному классическими методами гибридологического анализа. Ответ на этот вопрос может быть получен при аналогичном анализе популяции F₂ от скрещивания растений *Fu4* на чувствительный сорт.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-16-00037).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит экспериментов с использованием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dean R., Van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, **13** (4), 414–430 (2012). DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Knowles P. F. and Houston B. R. Inheritance of Resistance to Fusarium Wilt of Flax in Dakota Selection 48–94. *Agron. J.*, **47**, 131–135 (1955). DOI: 10.2134/agronj1955.00021962004700030006x
- Rashid K. Y. and Kenaschuk E. O. Effect of trifluralin on fusarium wilt in flax. *Can. J. Plant Sci.*, **73**, 893–901 (1993). DOI: 10.4141/cjps93-117
- Sánchez-Martín J. and Keller B. Contribution of recent technological advances to future resistance breeding. *Theor. Appl. Genet.*, **132**, 713–732 (2019). DOI: 10.1007/s00122-019-03297-1
- Sanchez-Bayo F. Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems. In: *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, Ed. by F. Sánchez-Bayo, P. J. van den Brink, and R. M. Mann (Bentham Science Publishers Ltd, 2011), pp. 63–87.
- Рожмина Т. А. и Лошакова Н. И. Образцы прядильного и масличного льна (*Linum usitatissimum* L.) — источники эффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию и ее зависимость от температуры. *С.-х. биология*, **51** (3), 310–317 (2016). DOI: 10.15389/agrobiology.2016.3.310rus
- Рожмина Т. А., Пролётова Н. В. и Ушаповский И. В. Изучение контроля устойчивости к фузариозному увяданию (*Fusarium oxysporum* f. *lini*) на начальных этапах селекционного процесса льна-долгунца Кормопроизводство, HYPERLINK “https://elibrary.ru/contents.asp?id=50173285&selid=50173290” **9**, 22–26 (2022).
- Kourelis J. and van der Hoorn R. A. L. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell*, **30** (2), 285–299 (2018). DOI: 10.1105/tpc.17.00579J.
- Jones J. D. G. and Dangl J. L. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **444** (7117), 323–329 (2006). DOI: 10.1038/nature05286
- Tsuda L., Inoue Y. H., Yoo M. A., Mizuno M., Hata M., Lim Y. M., Adachi-Yamada T., Ryo H., Masamune Y., and Nishida Y. A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in *Drosophila*. *Cell*, **72**, 407–414 (1993).
- Künstler A., Bacsó R., Gullner G., Hafez Y. M., and Király L. Staying alive — is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **93**, 75–84 (2016). DOI: 10.1016/j.pmpp.2016.01.003
- Zhong Y. and Cheng Z. M. A unique RPW8-encoding class of genes that originated in early land plants and evolved through domain fission, fusion, and duplication. *Sci. Rep.*, **6**, 32923 (2016). DOI: 10.1038/srep32923
- Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.*, **20** (8), 1163–1178 (2019). DOI: 10.1111/mpm.12821
- de Araújo A. C., Fonseca F. C. D. A., Cotta M. G., Alves G. S. C., and Miller R. N. G. Plant NLR receptor proteins and their potential in the development of durable genetic resistance to biotic stresses. *Biotechnol. Res. Innovation*, **3**, 80–94 (2019).
- Block A., Alfano J. R. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 39–46 (2011). DOI: 10.1016/j.mib.2010.12.011
- Dmitriev A. A., Krasnov G. S., Rozhmina T. A., Novakovskiy R. O., Snezhkina A. V., Fedorova M. S., Yurkevich O. Yu., Muravenko O. V., Bolsheva N. L., Kudryavtseva A. V., and Melnikova N. V. Differential gene expression in response to *Fusarium oxysporum* infection in resistant and susceptible genotypes of flax

- (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol.*, **17** (Suppl. 2), Art. 253 (2017). DOI: 10.1186/s12870-017-1192-2
17. Galindo-González L. and Deyholos M. K. RNA-seq Transcriptome Response of Flax (*Linum usitatissimum* L.) to the Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Front. Plant Sci.*, **24** (7), 1766 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.01766
 18. Boba A., Kostyn K., Kozak B., Zalewski I., Szopa J., and Kulma A. Transcriptomic profiling of susceptible and resistant flax seedlings after *Fusarium oxysporum lini* infection. *PLoS One*, **16** (1), e0246052 (2021). DOI: 10.1371/journal.pone
 19. Spielmeier W., Green A., Bittisnich D., Mendham N., and Lagudah E. S. Identification of quantitative trait loci contributing to Fusarium wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*). *Theor. Appl. Genet.*, **97**, 633–641 (1998). DOI: 10.1007/s001220050939
 20. Spielmeier W., Lagudah E. S., Mendham N., and Green A. G. Inheritance of resistance to flax wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* Schlecht) in a doubled haploid population of *Linum usitatissimum* L. *Euphytica*, **101**, 287–291 (1998).
 21. Kanapin A., Bankin M., Rozhmina T., Samsonova A., and Samsonova M. Genomic regions associated with Fusarium wilt resistance in flax. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12383 (2021). DOI: 10.3390/ijms222212383
 22. Takagi H., Abe A., Yoshida K., Kosugi S., Natsume S., Mitsuoka C., Uemura A., Utsushi H., Tamiru M., Takuno S., Innan H., Cano L. M., Kamoun S., and Terauchi R. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J.*, **74**, 174–183 (2013). DOI: 10.1111/tpj.12105
 23. Magwene P. M., Willis J. H., and Kelly J. K. The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLoS Comput. Biol.*, **7**, e1002255 (2011).
 24. Рожмина Т. А. Селекционно-ценные гены устойчивости к фузариозному увяданию у льна. Достижения науки и техники АПК, **29** (12), 47–49 (2015).
 25. Li H. and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25** (14), 1754–1760 (2009). DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
 26. Tello D., Gil J., Loaiza C. D., Riascos J. J., Cardozo N., and Duitama J. NGSEP3: accurate variant calling across species and sequencing protocols. *Bioinformatics*, **35** (22), 4716–4723 (2019). DOI: 10.1093/bioinformatics/btz275
 27. Singh V. K., Khan A. W., Jaganathan D., Thudi M., Roorkiwal M., Takagi H., Garg V., Kumar V., Chitiki-neni A., Gaur P. M., Sutton T., Terauchi R., and Varshney R. K. QTL-seq for rapid identification of candidate genes for 100-seed weight and root/total plant dry weight ratio under rainfed conditions in chickpea. *Plant Biotechnol. J.*, **14** (11), 2110–2119 (2016). DOI: 10.1111/pbi.12567
 28. Chen Y., Chen Y., Shi C., Huang Z., Zhang Y., Li S., Li Y., Ye J., Yu C., Li Z., Zhang X., Wang J., Yang H., Fang L., and Chen Q. Soapnuke: a mapreduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, **7** (1), 1–6 (2018). DOI: 10.1093/giga-science/gix120
 29. Ewing B., Hillier L., Wendl M. C., and Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8** (3), 175–185 (1998). DOI: 10.1101/gr.8.3.175
 30. You F. M. and Cloutier S. Mapping quantitative trait loci onto chromosome-scale pseudomolecules in flax. *Methods Protoc.*, **3**, 28 (2020). DOI: 10.3390/mps3020028
 31. D. R. Metcalfe and S. B. Helgason. Inheritance of loose smut resistance. *Can. J. Plant Sci.*, **42**, 472–480 (1962). DOI: 10.4141/cjps62-075
 32. Sun X., Han G., Meng Z., Lin L., and Sui N. Roles of Malic Enzymes in Plant Development and Stress Responses. *Plant Signal. Behav.*, **14** (10), e1644596 (2019). DOI: 10.1080/15592324.2019.1644596
 33. Romeis T. Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4** (5), 407–414 (2001). DOI: 10.1016/s1369-5266(00)00193-x
 34. Liu Z., Hou S., Rodrigues O., Wang P., Luo D., Munemasa S., Lei J., Liu J., Ortiz-Moreno F. A., Wang X., Nomura K., Yin C., Wang H., Zhang W., Zhu-Salzman K., He S. Y., He P., and Shan L. Phytocytokine signalling reopens stomata in plant immunity and water loss. *Nature*, **605** (7909), 332–339 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04684-3
 35. Berkey R., Zhang Y., Ma X., King H., Zhang Q., Wang W., and Xiao S. Homologues of the RPW8 Resistance Protein Are Localized to the Extrahaustorial Membrane that Is Likely Synthesized De Novo. *Plant Physiol.*, **173** (1), 600–613 (2017). DOI: 10.1104/pp.16.01539
 36. C. Zheng, K. Y. Rashid, S. Cloutier, et al., In: *The FlaxGenome. Compendium of Plant Genomes*. Ed by F. M. You and B. Fofana (Springer, 2023), pp. 121–148.
 37. Yao N. and Greenberg J. T. Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death. *Plant Cell*, **18** (2), 397–411 (2005). DOI: 10.1105/tpc.105.036251
 38. He K. and Wu Y. Receptor-like kinases and regulation of plant innate immunity. *Enzyme*, **40**, 105–142 (2016). DOI: 10.1016/bs.enz.2016.09.003

Identification of Two QTLs Controlling Flax Resistance to Fusarium Wilt

T.A. Rozhmina*, A.A. Kanapin**, M.P. Bankin**, and M.G. Samsonova**

*Federal Research Centre for Bast Crops, Komsomolsky prosp. 17/56, Tver, 170041 Russia

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya ul. 29, Saint-Petersburg, 195251 Russia

Bulk segregant analysis was applied to the evaluation of F₂ population developed by crossing two flax cultivars which differ in the resistance genes to Fusarium wilt. The causative agent of this disease, the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, is one of the main flax pathogens causing enormous economic damage to the linen industry worldwide. DNA pools of highly resistant and susceptible F₂ plants to Fusarium wilt were sequenced and subsequent data analysis identified two regions on chromosomes 9 and 13 that conferred resistance to Fusarium wilt. Candidate genes for subsequent analysis were selected by functional gene annotation and by analyzing the expression of genes in QTL regions based on data generated in transcriptomic experiment made with the infected flax cultivar Atalante resistant to Fusarium. By combining these two approaches, three candidate genes were identified within each of QTL regions which, according to the literature data, are involved in the plant response to infection and have been differentially expressed in the transcriptomics experiment.

Keywords: flax; Fusarium wilt, resistance, QTL, bulk segregant analysis