

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ *BRASSICA OLERACEA* L. НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ

Дубина Е.В., канд. биол. наук, Макуха Ю.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»,
Российская Федерация, г. Краснодар

Аннотация. В данной работе изучен полиморфизм SSR-локусов по признаку устойчивости капусты белокочанной к сосудистому бактериозу. Из 26 апробированных кодоминантных молекулярных SSR маркеров, взятых из базы данных на сайте www.VegMarks, отобрано два SSR праймера, пригодных для анализа селекционного материала, отличающегося по проявлению признака резистентности к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Dows. Даны рекомендации дальнейшего использования проанализированных селекционных образцов в научной работе по созданию резистентных форм капусты белокочанной к сосудистому бактериозу.

Ключевые слова. Капуста белокочанная, маркер сопутствующая селекция (MAS), ПЦР – анализ, гибрид, устойчивость, сосудистый бактериоз.

MOLECULAR MARKERING IN THE BREEDING OF *BRASSICA OLERACEA* L. FOR RESISTANCE TO VASCULAR BACTERIOSIS.

Dubina E.V., Cand. Sc. (Biol.), Makukha Yu.A.

FSBSI «All-Russian Rice Research Institute», Russian Federation, Krasnodar

Abstract. In this work, the polymorphism of SSR loci on the basis of the resistance of cabbage to black rot was studied. Of the 26 approved codominant molecular SSR markers taken from the database at www.VegMarks, to identify the polymorphism between the resistant and susceptible forms of cabbage to black rot 2 were selected, which showed polymorphism (allelic difference) between contrasting forms. Recommendations for the further use of the analyzed breeding samples in scientific work on development of forms of cabbage resistant to black rot are given.

Keywords. White cabbage (*Brassica oleracea*), marker assisted selection, PCR-analysis, hibrid, resistance, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Dows.

Сосудистый бактериоз – одно из самых вредоносных заболеваний сельскохозяйственных растений. К сожалению, как и большинство представителей семейства Brassicaceae капуста белокочанная восприимчива к сосудистому бактериозу. Данное заболевание вызывается бактериями *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Dows. Бактерии рода *Xanthomonas* поражают более 400 видов растений [1, с. 308-356], включая основные продовольственные и технические культурные растения. Род *Xanthomonas* включает более 27 видов [2, с. 472-489], обладающих сходными физиологическими и генетическими признаками. Возбудитель представлен несколькими физиологическими расами

(6 рас по S. Katoon (1992) в модификации А.Игнатова) [3]. В России наиболее распространены четыре из них: 0, 1, 3 и 4; в Краснодарском крае – три: 0, 1 и 3.

Потери от сосудистого бактериоза могут быть значительными в зависимости от устойчивости сорта или гибрида, уровня агротехники и климатических факторов среды. В результате развития сосудистого бактериоза происходит значительное снижение урожая, пищевой ценности продукции (ухудшение качества кочанов), что проявляется в снижении содержания сахаров в 1,5 раза, а аскорбиновой кислоты на 11-17 % [4, с.15-16], повышается восприимчивость к слизистому бактериозу.

В условиях Кубани болезнь может принять эпифитотийный характер в случае наличия источника инфекции, благоприятных погодных условий (высокие температуры и влажность), отсутствии генетической защиты сорта или гибрида.

В связи с дорогими химическими средствами защиты от данного заболевания в условиях интенсивного возделывания капусты белокочанной наиболее актуальным на сегодняшний день является создание гибридов, сортов и линий с генетической устойчивостью. Это позволит сократить применение химических средств защиты и минимизировать потери урожай данной культуры.

Перспективно и особо востребовано в селекции сортов и гибридов нового поколения использование современных постгеномных технологий (ДНК-маркирование), позволяющих ускорять процесс создания форм, устойчивых к различным стресс-факторам. Это способствует повышению конкурентоспособности и импортозамещению продукции капусты белокочанной.

Одним из наиболее современных методов ДНК-анализа является изучение микросателлитных локусов. Метод SSR-анализа (Simple Sequence Repeats) нашел широкое применение в научных и прикладных исследованиях для анализа генома растений и в качестве маркеров при конструировании генетических карт и идентификации видов и сортов сельскохозяйственных культур. Микросателлиты представляют собой простые, наиболее доступные, удобные и относительно недорогие маркеры, пригодные, прежде всего, для идентификации генотипов. Они стабильны в соматических клетках, локуспецифичны, их наследование, как правило, носит кодоминантный характер, что позволяет отличать гомозиготное состояние исследуемого локуса ДНК от гетерозиготного [5, с. 1717-1725].

Устойчивость капустных растений к сосудистому бактериозу проявляется в мезофилле (листовая устойчивость), окружающем гидатоды [6, с. 57] и сосудах ксилемы (стеблевая устойчивость) [7, с. 160-164; 8, с. 45-48; 9, с. 79-80]. К настоящему времени клонирован ряд генов устойчивости, проведена их молекулярная характеристика и выявлены их консервативные области [2, с.72-489; 10, с. 157-169; 11, с. 127-132; 12, с.309-319; 5, с. 1717-1725]. Листовая устойчивость определяется несколькими специфичными генами и проявляется в виде ответной реакции сверхчувствительности растений на проникновение патогена в мезофилл листа. Стеблевая устойчивость определяется одним или двумя не-

специфичными доминантными генами (Rs), независимыми от расоспецифической листовой устойчивости [8, с. 45-48].

Цель исследований – разработать с применением метода молекулярного маркирования методическую схему оценки капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу, позволяющую ускорить создание высокопродуктивных сортов и гетерозисных гибридов *Brassica oleracea* L.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выбрать из Международной базы данных VegMarks 50 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров. На основе ПЦР-анализа апробировать их на контрастных по резистентности к сосудистому бактериозу образцах капусты белокочанной. По данным ПЦР-анализа установить аллельную разницу между устойчивыми и восприимчивыми к заболеванию формами.

2. Произвести отбор наиболее информативных SSR-маркеров, показавших аллельный полиморфизм по устойчивости к сосудистому бактериозу и внедрить их в селекционный процесс для ведения маркерной селекции капусты белокочанной по данному признаку.

3. Провести ДНК-анализ селекционных образцов капусты белокочанной с использованием отобранных полиморфных SSR-маркеров для идентификации аллелей устойчивости и их состояния (гомо- или гетерозиготное).

Материалы и методы. За последние годы число доступных праймеров к микросателлитным локусам *Brassica oleracea* L. значительно увеличилось. В настоящее время в Международной базе данных *Brassica* Microsatellite Information Exchange (<http://www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm>) представлено 628 пар праймеров к фланкирующим областям микросателлитов. В базе данных <http://www.VegMarks> также имеется более 600 кодоминантных микросателлитных молекулярных маркеров для SSR молекулярно-генетических исследований капусты белокочанной [10, с. 157-169].

Для молекулярно-генетических исследований ДНК устойчивых и восприимчивых форм капусты белокочанной, а также селекционных образцов отдела овощекартофелеводства использовали кодоминантные SSR-маркеры, взятые из базы данных генетических ресурсов VegMarks, доступной на web-странице www.VegMarks [10, с. 157-169; 11, с. 127-132; 12, с. 309-319; 13, с. 1103-1112].

Праймеры, использованные в исследованиях (таблица), синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (г. Москва).

Таблица

Праймеры для генотипирования *Brassica oleracea* L.

№	Название праймера	Последовательности праймеров	Диапазон длин ПЦР-фрагментов, п. н.	Мотив	Геном-специфичность
1	2	3	4	5	6
1	Na10-D09	F -AAGAACGTCAAGATCCTCTGC R -ACCACCACGGTAGTAGAGCG	150-170	(GT) _n	ABC

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6
2	Na12-A02	F -AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R -AGTGAATCGATGATCTCGCC	160-218	(CT) _n	ABC
3	Na12-F12	F -CGTTCTCACCTCCGATAAGC R -TCCGATGTAGAATCAGCAGC	170-190	(CCG) _n	ABC
4	Ni2-B02	F -CGCTGCAATTATACGAAAGC R -CCTCATGCTCTCCAAAGACC	80-110	(GGC) _n	ABC
5	Ra2-E12	F -TGTCAGTGTGTCCACTTCGC R -AGAGAAACCCAATAAAGTAG AACC	125-165	(GA) _n	ABC
6	Ni3-G04B	F -ATACTCGGGATAGGTGTGCG R -ATGTGGCAATCCTACATTTAC	70-140	(AG) _n	ABC
7	Ol12-A04	F -TGGGTAAGTAACTGTGGTGGC R -AGAGTTCGCATACTCTGGAGC	110-150	(CT) _n	ABC
8	BRMS-006	F -TGGTGGCTTGAGATTAGTTC R -ACTCGAAGCCTAATGAAAAG	140-175	(GA) _n	ABC
9	BRMS 043	F - GCGATGTTTTTTCTTCAGTGTC R - TTAATCCCTACCCACAATTTCC	318	(A) ₂₁ (T) ₁₄ (G T) ₆	ABC
10	BRMS 014	F - CCGTAAGGAATATTGAGGCA R - TTCCCAATTCTCAAACGGTA	263-295	(TC) ₁₅	ABC
11	BRMS 050	F - AACTTTGCTTCCACTGATTTTT R - TTGCTTAACGCTAAATCCATAT	164	(AAT) ₄ , (TC) ₁₉ (TTC) ₃	ABC
12	BRMS 051	F -GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA R -GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG	262	(TC) ₁₅	ABC
13	BRMS 096	F - AGTCGAGATCTCGTTCGTGTCTCCC R - TGAAGAAGGATTGAAGCTGTTGTT G	194-220	(CT) ₃₀	ABC
14	AF051772	F - TCCGAAAGTGGGGAAAGG R - TGTGTCAGAAAGCGAGAAGG	154–187	(aag) ₅	ABC
15	AF458409	F - AGAAAGCAGACGGGAATGG R - TGGTTAAAGCGAAAGTGTGC	133–168	(aga) ₆	ABC
16	AJ427337	F - GCTGATGTTGATGGTGATGG R - GCCGAAGCAGACAAATAAAAC	187–212	(ga) ₅	ABC
17	BZ523957	F - ATTATGACGCCTGGTTTTA R - TTGGTTAGAAGTTATGGGAAC	231–272	(ttg) ₆	ABC
18	CC956628	F - GTCCCCTCTCTCTCCCATCC R - GAGCCATTTCTTTATTTGTTCC	201–218	(tc) ₅	ABC
19	CC956699	F - TCTCACCTATCTTCTTCTTTCTTT C R - CGCCTCGTGCTTCTTTCTC	158–198	(cac) ₉	ABC
20	CC969431	F - AAGCCACCTCACCTTAGCC R - GAAATCCCAGAGACTGAAAACC	237–272	(ga) ₆	ABC
21	CC969459	F - CCAAAGATTGAGAGGAAATGG R - GCGTCAAAAACGGTGTGC	190–205	(cgg) ₅	ABC

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6
22	CC969497	F - CAAATGACTACGGGAACAGGA R - GGGTGGTGCTCAAGGATAAA	129–145	(tgc)5	ABC
23	CC969507	F - AACTGAAACGACCAAGAAGTCC R - CCAGGAGGAGAGAGAGAGAGC	298–301	(ct)5	ABC
24	X94979	F - TCCAAGACCGTAGAGGAGGA R - AAGCCAACAACACTTCAACAACA	128–138	(atg)5	ABC
25	BC46	F -AGGTTTCGAGGTTGTGGCTTCT R - CTAAACTCATCGCTTCCGTAAACA	208-214	(ga)13	ABC
26	BC7	F -AAATTGTTTCTCTTCCCCAT R -GTGTTAGGGAGCTGGAGAAT	119-151	(ct)24	ABC

Биоматериалом для выделения ДНК послужили свежесрезанные, в фазе 5-7 листьев, листовые пластинки устойчивых (линии Тен 133-3; 272-510; 272-576; Бр129-10) и восприимчивых (линия 279-488) растений капусты белокочанной, а также по 32 растения трёх опытных образцов, участвующих в селекционном процессе отдела овощекартофелеводства по созданию резистентных форм к сосудистому бактериозу.

ДНК выделяли стандартным методом СТАВ по Марее [15, с. 4321-4325]. Метод заключается в использовании цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ) в качестве основного компонента буфера экстракции и преципитации.

Для проведения ПЦР нами подбирались оптимальные условия, при которых продукты амплификации четко визуализировались. На начальном этапе при постановке ПЦР в реакционную смесь вносили разное количество праймеров и dNTP (трифосфатов). Анализ продуктов ПЦР позволил установить, что оптимальная концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 0,3 мкМ, а dNTP – 10мкл, при которой четко выявляются целевые фрагменты.

Одновременно отработывалась программа амплификации. Были апробированы разные температуры денатурации, отжига, а также количество циклов каждого этапа амплификации. При этом наблюдалось как ингибирование синтеза целевых фрагментов, так и их четкая визуализация. В результате удалось подобрать оптимальные параметры, при которых продукты амплификации четко визуализировались.

Протокол ДНК-анализа:

ПЦР смесь: 40-50 нг ДНК, 2,5 мкл буфера Taq полимеразы; 10,0 мкл трифосфата (0,5 мМ); по 0,3 мкМ прямого (F) и обратного (R) праймеров; 1 единицу Taq полимеразы в объеме 25 мкл.

ПЦР программа: 15 минут при 95°C – начальная денатурация – 1 цикл, следующих 25 циклов: 2 мин денатурация при 94°C, 1 мин денатурация при 94°C, 30 секунд отжиг праймеров при 65°C, 45 секунд синтез при 72°C; затем каждый второй цикл температуру отжига снижаем на 1°C до достижения температуры 55°C и остальные 20 циклов: 1 мин денатурация при 94°C, 30 секунд отжиг праймеров при 55°C, 45 секунд синтез при 72°C, завершающий цикл синтеза 1 минута при 72°C.

При проведении SSR-анализа в данных условиях были получены четкие электрофоретические профили с использованием вышеуказанных молекулярных маркеров для каждого исследуемого образца капусты белокочанной.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 8 %-ном акриламидном (ПААГ) и 2 %-ном агарозном гелях на основе 1*ТБЕ буфера при напряженности поля 6 V/см. Визуализация результата электрофоретического разделения продуктов ПЦР в ПААГ проводилась с использованием бромистого этидия (BrEt, 2,7-диамино-10-этил-9-фенилфенатридинийбромид, хомидий бромид), который способен интеркалировать в двойную спираль ДНК и при таком связывании усиливается флюоресценция в проходящем УФ свете.

Результаты. В целях получения информации об эффективных молекулярных маркерах пригодных для идентификации и выявления аллельной разницы между устойчивыми и восприимчивыми образцами капусты белокочанной к сосудистому бактериозу, из базы данных [VegMarks](#) отобрано 26 кодоминантных SSR- маркеров, у которых повторяющийся мотив (разница в нуклеотидной последовательности) два-три, пять-шесть, девять нуклеотидов. В результате была получена амплификация фрагментов различной длины, хорошо разделяемых в полиакриламидном и агарозном геле.

При сравнении SSR-профилей контрастных форм капусты белокочанной по признаку «устойчивости к сосудистому бактериозу» из апробированных микросателлитных маркеров высокий полиморфизм выявлен у 7 кодоминантных SSR-маркеров. Пример, полученных генетических профилей исследуемых образцов с использованием праймеров BZ523957, CC956699, CC969431, AF458409, CC969459, CC969507 и BC46, представлен на рисунке 1.

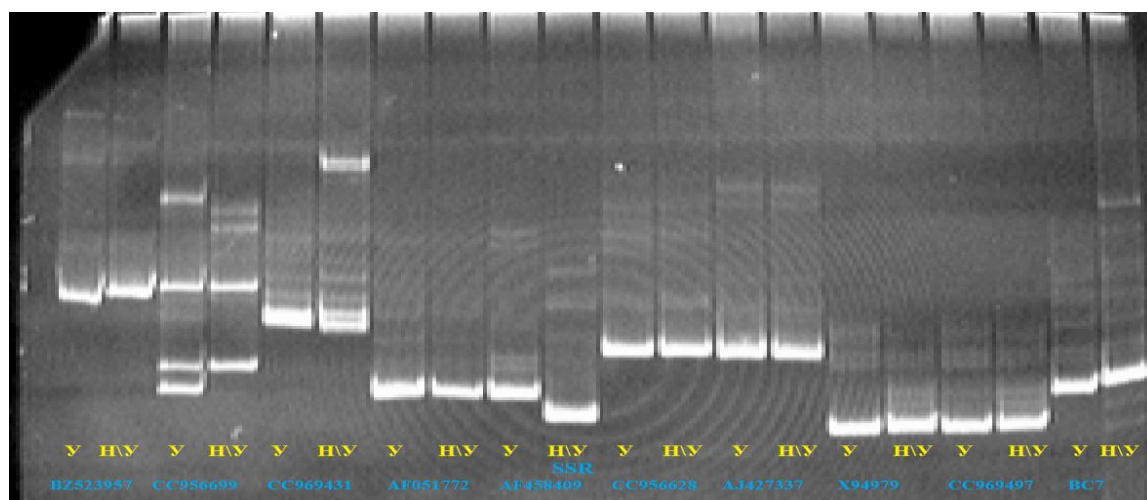


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в ПААГ

Примечание: BZ523957, CC956699, AF051772, AF 458409, CC956628, AJ427337, X94979, CC969497, BC7– кодоминантные микросателлитные маркеры; У – линия Тен 133-3 (донор устойчивости к расам 0, 1, 3, стандарт); Н/У – линия 279-488 (неустойчивая, стандарт).

Как видно из рисунка 1, наибольшее количество SSR-фрагментов было получено при использовании праймеров BC46, CC956699, AF 458409 и BC7, а наименьшее – при использовании праймеров AF051772, CC956628, AJ427337, X94979, CC969497.

Полученный полиморфизм был использован для маркирования устойчивости капусты белокочанной к сосудистому бактериозу у селекционных образцов, созданных в отделе овощекartофелеводства. На основе ПЦР с использованием отобранных полиморфных SSR-маркеров проведен ДНК-анализ трех селекционных образцов капусты белокочанной (по 32 растения каждого образца) для идентификации устойчивого аллеля в генотипах анализируемых растений.

На рисунках 2-3 приведены примеры генетических профилей геномной ДНК, выделенной из растений исследуемого селекционного образца №2 отдела овощекartофелеводства.

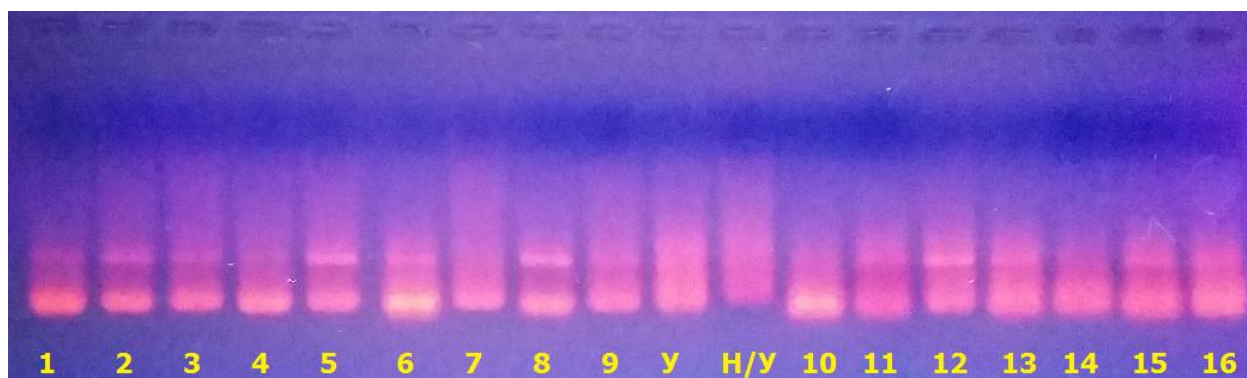


Рисунок 2. Электрофоретические профили ПЦР продуктов анализируемых растений капусты белокочанной при использовании пары праймеров BC46 в 2%-ном агарозном геле

Примечание: 1-16 – анализируемые растения селекционного образца №2; У – устойчивая линия Тен 133-3, имеющая в генотипе донорную аллель; Н/У – неустойчивая линия 279-488.

Из рисунка 2 видно, что по локусу BC46 донорную аллель в генотипе имеют растения под №№ 6, 8, 10, 11, 13, 15 и 16. Данные растения могут быть использованы в дальнейшей работе по созданию резистентных линий и гибридов капусты белокочанной к сосудистому бактериозу. Остальные растения селекционного образца №2 можно выбраковать по данному признаку.

На рисунке 3 представлены результаты амплификации анализируемых растений капусты белокочанной селекционного образца №2 по локусу AF 458409.

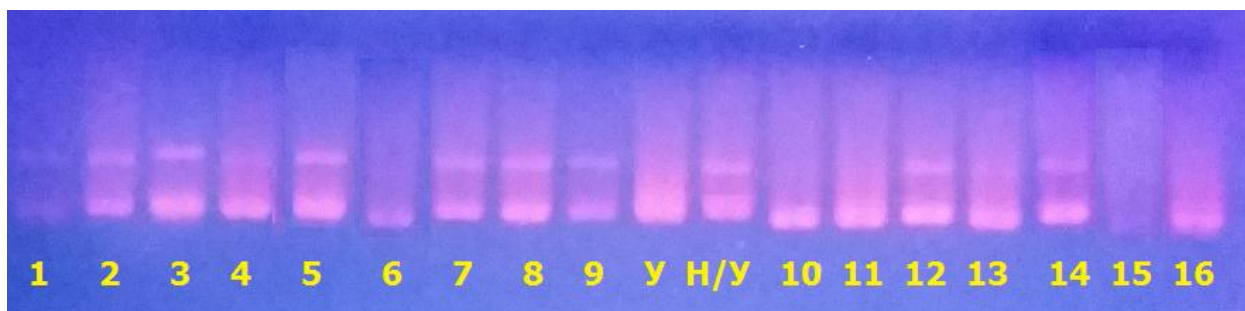


Рисунок 3. Электрофоретические профили ПЦР продуктов анализируемых растений капусты белокочанной при использовании пары праймеров AF 458409 в 2%-ном агарозном геле

Примечание: 1-16 – анализируемые растения селекционного образца №2; У – устойчивая линия Тен 133-3, имеющая в генотипе донорную аллель; Н/У – неустойчивая линия 279-488.

Результаты, представленные на рисунке 3, отражают различие между донорной и рецессивной аллелями у анализируемых образцов. Кроме того, результаты амплификации по локусам BC46 и AF 458409 имеют сходство. По локусу AF 458409 анализируемые растения под №№6, 10, 11, 13, 15 и 16 также несут в генотипе донорную аллель устойчивости к сосудистому бактериозу и рекомендуются к дальнейшему использованию по программе создания резистентных гибридов и линий к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Dows.

Обнаруженные SSR-маркеры могут использоваться в селекционных программах по созданию гибридов и линий капусты белокочанной, устойчивые к сосудистому бактериозу.

Таким образом, в результате исследований из 26 изученных кодоминантных молекулярных SSR маркеров, взятых из базы данных [VegMarks](#), для выявления полиморфизма между устойчивой и восприимчивой формами капусты белокочанной к сосудистому бактериозу отобрано 7, показавших полиморфизм (аллельную разницу) между контрастными формами. При анализе селекционных образцов с использованием этих маркеров высокая степень полиморфизма микросателлитных последовательностей была выявлена в двух: BC46 и AF 458409. Данные SSR праймеры рекомендуются для анализа селекционного материала, отличающегося по проявлению признака резистентности к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Dows. Это позволит четко проводить генетическое маркирование анализируемых селекционных ресурсов капусты белокочанной и значительно сокращать селекционный процесс.

Литература

1. Leyns F., De Cleene M., Swings J., De Ley J. The host range of the genus *Xanthomonas* // Bot. Rev. 1984. Vol. 50. P. 308-356.
2. Vauterin L., Hoste B., Kesters K. and Swings, J. Reclassification of *Xanthomonas* // International Journal of Systematic Bacteriology. 1995. Vol. 45. P. 472-489.

3. Игнатов А.Н. Бактериозы в России: угроза реальна // Агро XXI века. 2012. Cited from <http://www.agroxxi.ru/>.
4. Лазарев А.М. Сосудистый бактериоз – вредоносная болезнь капусты // Овощеводство и тепличное хозяйство. 2006. № 11. С. 15-16.
5. Louarn S., Torp A.M., Holme I.B. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* // Genet. Res. Crop Evol. 2007. Vol. 54. P. 1717-1725.
6. Самохвалов А.Н., Рогачев Ю.Б., Игнатов А.Н. Методические рекомендации по ускоренной оценке и отбору исходного селекционного материала капусты на групповую устойчивость к киле и бактериозам. М., 1995. С. 57.
7. Ситников С.В., Дякунчак С.А., Селекция гибридов F1 среднеспелой белокочанной капусты на устойчивость к *Xanthomonas campestris* // Проблемы научного обеспечения овощеводства юга России. Сб. научных трудов. Краснодар, 2009. С. 160-164.
8. Студенцов О.В., Петровская Н.Н. Устойчивость коллекционных сортов капусты к сосудистому бактериозу в предгорной зоне Северного Кавказа // Бюлл. ВНИИ растениеводства. 1981. С. 45-48.
9. Сухорокова Н.С. Метод отбора в селекции капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу. Фитонциды, бактериальные болезни растений // Материалы конференции. Львов, 1990. Ч.2. С. 79-80.
10. Minamiyama Y., Tsuro M., Hirai M. An SSR based linkage map of *Capsicum annuum* // Molecular Breeding. 2006. Vol. 18. P. 157-169.
11. Hanacek P., Vyhnánek T., Rohrer M., Cieslarova J., Stavelíková H. DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers // Hort. Sci. (Prague). 2009. Vol. 36 (4). P. 127-132.
12. Suwabe et. al. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The genetic origin of clubroot resistance // Genetics. 2006. Vol. 173. P. 309-319.
13. Lowe A. J., Moule C., Trick M., Edwards K. J. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 108. P. 1103-1112.
14. Szewc-McFadden AK; Kresovich S; Bliet SM; Mitchell SE; McFerson JR Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species // Theoretical and Applied Genetics. 1996. Vol. 93. P. 534-538.
15. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research Journal. 1980. Vol. 10. P. 4321-4325.