

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЬТЕРНАРИОЗУ*

Елена Викторовна Дубина^{1,2}, доктор биологических наук, профессор РАН

Юлия Александровна Макуха¹, кандидат биологических наук

Сергей Валентинович Гаркуша¹, член-корреспондент РАН

Дмитрий Сергеевич Симоненко², аспирант

Олеся Леонидовна Горун¹, младший научный сотрудник

Сергей Александрович Лесняк¹, младший научный сотрудник

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр риса», г. Краснодар, Россия

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Россия

E-mail: lenakrug1@rambler.ru

Аннотация. В представленном исследовании изучен полиморфизм SSR-локусов по признаку устойчивости капусты белокочанной к альтернариозу. Цель работы – выявить эффективные и информативные SSR-маркеры для идентификации в генотипах гибридных растений культуры донорных аллелей устойчивости к альтернариозу. Из 20 апробированных маркеров только PBCSSRJU13, PBCSSRJU6, NI-F02a демонстрируют аллельную разницу между контрастными по резистентности к альтернариозу изогенными линиями. Они станут основой для последующих исследований по проведению анализа расщепления в сегрегирующих популяциях и определению информативных ДНК-маркерных систем, сонаследуемых с признаком устойчивости капусты белокочанной к альтернариозу.

Ключевые слова: капуста белокочанная, SSR-маркеры, ПЦР-анализ, альтернариоз, изогенные линии

MOLECULAR MARKING IN A WHITE CABBAGE SELECTION FOR RESISTANCE TO ALTERNARIA BLIGHT

E.V. Dubina^{1,2}, *Grand PhD in Biological Sciences, Professor of the RAS*

Yu.A. Makukha¹, *PhD in Biological Sciences*

S.V. Garkusha¹, *Corresponding member of the RAS*

D.S. Simonenko², *PhD Student*

O.L. Gorun¹, *Junior Researcher*

S.A. Lesnyak¹, *Junior Researcher*

¹Federal Scientific Rice Centre, Krasnodar, Russia

²Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia

E-mail: lenakrug1@rambler.ru

Abstract. In the presented study, the polymorphism of SSR loci was studied on the basis of the resistance of white cabbage to alternariosis. This work was carried out in order to identify effective and informative ISSR markers for the identification of donor alleles of resistance to alternariosis in the genotypes of hybrid plants of culture. Of the 20 tested markers, only 3 (PBCSSRJU13, PBCSSRJU6, NI-F02a) demonstrate an allelic difference between the isogenic lines of white cabbage contrasting in resistance to Alternaria Blight. They will become the basis for subsequent studies on the analysis of cleavage in segregating populations and the determination of informative DNA marker systems co-inherited with the sign of resistance of cabbage to alternariosis.

Keywords: white cabbage, SSR-markers, PCR-analysis, Alternaria Blight, isogenic lines

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L.) – наиболее востребованная овощная культура среди всех представителей рода *Brassica*. Ее пищевая ценность объясняется высоким содержанием биологически активных веществ, в том числе, фенольных соединений, выполняющих важные физиологические функции в живом организме, а также биофлавоноидов, которые регулируют многие реакции метаболизма, участвуют в окислительно-восстановительных процессах, обладают широким спектром биологической активности. [2]

Среди деструктивных болезней данной культуры, значительно снижающих урожайность, особое внимание стоит уделить альтернариозу (черная пятнистость), основные возбудители которого – фитопатогенные грибы видов *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*. [3] Поражение может происходить на любом этапе развития растения. На стадии сеянцев появляются черные некротические полосы и пятна на семядолях и подсемядольных коленах, что приводит к их увяданию. У более взрослых растений на кроющих листьях кочана

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда, ФГБНУ «Федерального научного центра риса» в рамках научного проекта № МФИ-П-20.1/41 / The research was carried out with the financial support of the Kuban Scientific Foundation, the Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Rice Research Center” within the framework of the scientific project No. IFI-P-20.1/41.

есть темные зональные пятна, покрытые рыхлым сажистым налетом спороношения. Пятна часто с желтой окантовкой. Середина их вскоре становится желто-коричневой и впоследствии может выпасть, в результате чего листья приобретают изрешеченный вид. Часто альтернариозом поражаются кочаны капусты, при этом на наружных листьях образуется черный налет, а затем и черные некротические пятна, может возникнуть ранняя дефолиация и гибель растения. [7]

По результатам анализа литературных источников, исследования в области молекулярного маркирования генов (локусы) устойчивости к альтернариозу в основном посвящены представителям масличных культур семейства *Brassicaceae* (*Brassica juncea*, *Brassica carinata*). [4, 5, 8] Работы по определению информативных маркерных систем на данный признак у капусты белокочанной не проводили.

Цель исследования — поиск информативных SSR-маркеров для идентификации в генотипах растений капусты белокочанной донорных аллелей устойчивости к альтернариозу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект изучения — контрастные формы капусты белокочанной (устойчивая изогенная линия 42 и восприимчивая изогенная линия 32), отобранные в отделе овощекартофелеводства ФГБНУ «ФНЦ риса».

ДНК из листьев капусты выделяли по схеме Мюррея и Томпсона [6] с использованием цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ) в качестве лизирующего буфера растительных клеток.

В молекулярно-генетических исследованиях по идентификации аллелей устойчивости к альтернариозу у капусты белокочанной применяли SSR-маркеры. [4, 5, 8] Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице.

Копирование участков ДНК проводили в амплификаторах Терцик и Bio Rad с оптимизацией условий ПЦР. При апробации маркеров использовали протокол: первичная денатурация — 15 мин., следующие 35 циклов: денатурация при 95°C — 60 сек., отжиг праймеров (54°C) — 60 сек., элонгация (72°C) — 60 сек., финальная элонгация (72°C) — 10 мин.

Разделяли продукты амплификации методом электрофореза в 8%-ом полиакриламидном геле (180 мин.) при напряжении 220 В. [1] Визуализировали результаты электрофореза в УФ-свете с помощью геля-документирующей системы GelDocXR+.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В молекулярно-генетических исследованиях по выявлению информативных ДНК-маркерных систем для идентификации аллелей устойчивости к альтернариозу апробировали 20 SSR-маркеров на контрастных по резистентности к альтернариозу изогенных линиях капусты белокочанной, три из которых оказались наиболее полиморфными (рис. 1–3, 4-я стр. обл.).

На рисунке 1 видно, что маркер PBCESSRJU13 выявляет полиморфизм между контрастными по

Нуклеотидная последовательность использованных в исследовании праймеров

Маркер	Последовательность праймеров
PBCESSRJU1	F: GGTGAAAGAGGAAGATTGGT R: AGGAGATACAGTTGAAGGGTC
PBCESSRJU2	F: TTCACATCTTCTCATCTTCC R: TTGCTATTCTCAGTCTC
PBCESSRJU3	F: CCTCTTTAATCAACAAGAAATCA R: TTCGGACAATGGCAGTGATA
PBCESSRJU4	F: CACCTTATCATCTCTATCCC R: CCTCTGTTCTCTCTTGTG
PBCESSRJU5	F: GGCACGTACATGGAGGATTC R: TGTGGTCGAGCTGTTTCAG
PBCESSRJU6	F: TCTCTCACCTGCCTGTCT R: ACTCCTCGGTAATGCCTC
PBCESSRJU7	F: TACCACTCCCTAACCGCA R: ATCACCTTGAGAGCGAAG
PBCESSRJU8	F: CGCTCTTCTTCTTAGTCTCT R: ACTTCATCTTCCACGGCT
PBCESSRJU9	F: CCCTACCGCTGGTAGACTT R: GCATCATGACCAACTATCAACC
PBCESSRJU10	F: GCGCGTAGGTAAGGAG R: AGCCATCGAGCCATTCAG
PBCESSRJU11	F: CGGTGTTAAAAGGTTATTTTC R: ATCTCCAATCAAAAAGCAAAC
PBCESSRJU12	F: AAGCTCAGATCGTTGCG R: AGATGAATGTGAAATAGGGGT
PBCESSRJU13	F: TTGCTTTGACTGAGCCTG R: CCATTCATGGAGCCTGTAG
PBCESSRJU14	F: GCGAAGCAGTCTGAAACC R: GCGAATCCGGTGAGAAAC
PBCESSRJU15	F: GGATCTCATGTTCACTGCTG R: TGATTACATCAAAATATGAG
PBCESSRJU16	F: TCCTCACTTCTTGGCATC R: ACTGAAAAGACCACTACCACCA
NI2D10	F: GATGCCCCAATCTGTTACG R: CAATTCGTGAAAAATAGCCG
NI3C05	F: TTTCTGCTTTGTTGTAAG R: TCCCAATCGAACCATAAAG
BRMS-011	F: GAACGCGCAACAACAATAGTG R: CGCGTCACAATCGTAGAGAATC
NI-F02a	F: TGCAACGAAAAAGGATCAGC R: TGCTAATTGAGCAATAGTATTCC

устойчивости к альтернариозу формами капусты белокочанной. С помощью маркера молекулярной массы определен размер ПЦР-продуктов: устойчивые аллели — 408 и 1000 п.н., неустойчивые — 354 и 948 п.н.

На электрофореграммах видна аллельная разница между изучаемыми контрастными формами капусты белокочанной (рис. 2, 3, 4-я стр. обл.). Размер аллелей устойчивости по локусу PBCESSRJU6 — 142, 191, 370 и 432 п.н., аллеля восприимчивости — 318 п.н., по локусу NI-F02a размер обнаруженных ПЦР-продуктов составляет 400, 650 и 975 п.н. (устойчивые), 700 п.н. (неустойчивые).

При апробации остальных 17 маркеров полиморфизма между контрастными изогенными линиями обнаружено не было.

Таким образом, только PBCESSRJU13, PBCESSRJU6, NI-F02a демонстрируют аллельную

разницу между контрастными по резистентности к альтернариозу изогенными линиями капусты белокочанной. В последующих исследованиях отобранные маркеры будут взяты для анализа расщепления и изучения их сонаследования с признаком устойчивости к альтернариозу на растениях сегрегирующих популяций.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений. Екатеринбург, 2017. 142 с.
2. Макуха Ю.А., Дубина Е.В. Разработка методологии оценки устойчивости капусты белокочанной к *Xanthomonas campestris* с применением SSR-маркеров // Рисоводство. 2019. № 3 (44). С. 27–32.
3. Doullah M.A.U., Meah M.B., Okazaki K. Development of an effective screening method for partial resistance to *Alternaria brassicicola* (dark leaf spot) in *Brassica rapa*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2006; 116 (1): 33–43. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9035-2>
4. Ghosh S., Mazumder M., Mondal B. et al. Morphological and SSR marker-based genetic diversity analysis of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) differing in *Alternaria brassicicola* tolerance. *Euphytica*. 2019. V. 215. P. 206–224. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2523-1>
5. Hopkins C.J., Cogan N.O.I., Hand M. et al. Sixteen new simple sequence repeat markers from *Brassica juncea* expressed sequences and their cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7 (4). P. 697–700. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01681.x>
6. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980. V. 10. P. 4321–4325.
7. Nowicki M., Nowakowska M., Niezgoda A., Kozik E. *Alternaria* black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Veg. Crops Res. Bull.* 2012. V. 76 (1). P. 5–19. <https://doi.org/10.2478/v10032-012-0001-6>
8. Pratap P., Thakur A.K., Meena P.D. et al. Genetic diversity assessment in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) for *Alternaria* black leaf spot tolerance using SSR markers. *J. Oilseed Brassica*. 2015. V. 6 (1). P. 175–182.

REFERENCES

1. Kutlunina N.A., Ermoshin A.A. *Molekulyarno-geneticheskie metody v issledovanii rasteniy*. Ekaterinburg, 2017. 142 s.
2. Makukha Yu.A., Dubina E.V. *Razrabotka metodologii otsenki ustoichivosti kapusty belokochanoy k Xanthomonas campestris s primeneniem SSR-markerov*. *Risovodstvo*. 2019. № 3 (44). С. 27–32.
3. Doullah M.A.U., Meah M.B., Okazaki K. Development of an effective screening method for partial resistance to *Alternaria brassicicola* (dark leaf spot) in *Brassica rapa*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2006; 116 (1): 33–43. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9035-2>
4. Ghosh S., Mazumder M., Mondal B. et al. Morphological and SSR marker-based genetic diversity analysis of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) differing in *Alternaria brassicicola* tolerance. *Euphytica*. 2019. V. 215. P. 206–224. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2523-1>
5. Hopkins C.J., Cogan N.O.I., Hand M. et al. Sixteen new simple sequence repeat markers from *Brassica juncea* expressed sequences and their cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7 (4). P. 697–700. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01681.x>
6. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980. V. 10. P. 4321–4325.
7. Nowicki M., Nowakowska M., Niezgoda A., Kozik E. *Alternaria* black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Veg. Crops Res. Bull.* 2012. V. 76 (1). P. 5–19. <https://doi.org/10.2478/v10032-012-0001-6>
8. Pratap P., Thakur A.K., Meena P.D. et al. Genetic diversity assessment in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) for *Alternaria* black leaf spot tolerance using SSR markers. *J. Oilseed Brassica*. 2015. V. 6 (1). P. 175–182.

*Поступила в редакцию 16.10.2023
Принята к публикации 30.10.2023*

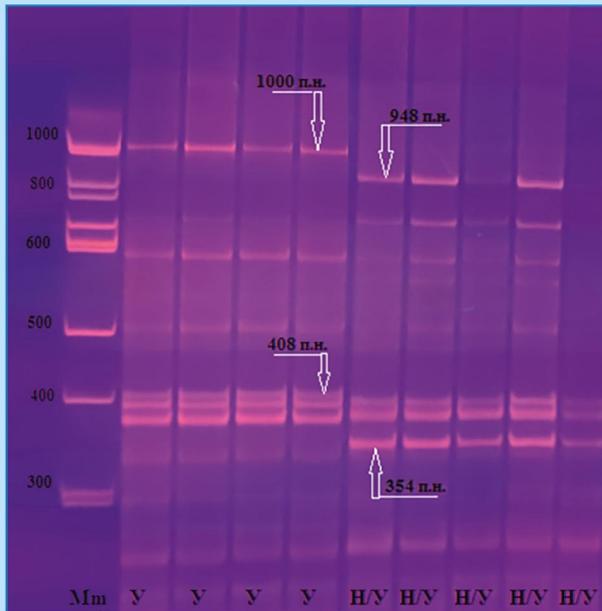


Рис. 1. Визуализация продуктов ПЦР по локусу RBCESSRJU13 в 8%-ом ПААГ. Mm – маркер молекулярной массы; Y – изогенная устойчивая линия 42; H/Y – изогенная неустойчивая линия 32 (то же на рис. 2,3).

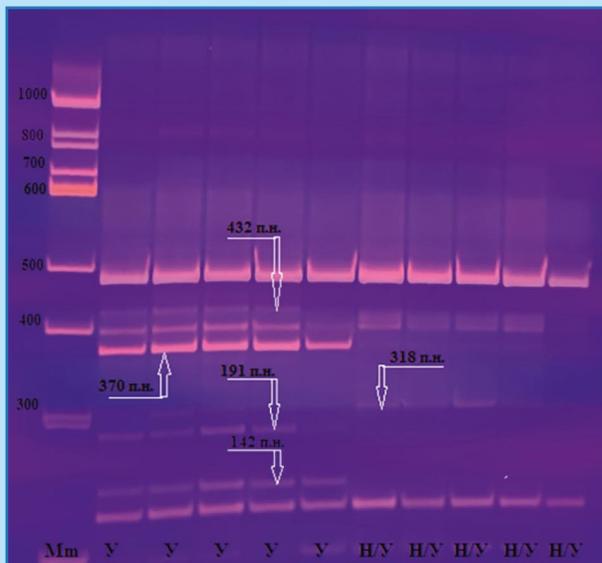


Рис. 2. Визуализация продуктов ПЦР по локусу RBCESSRJU6 в 8%-ом ПААГ.

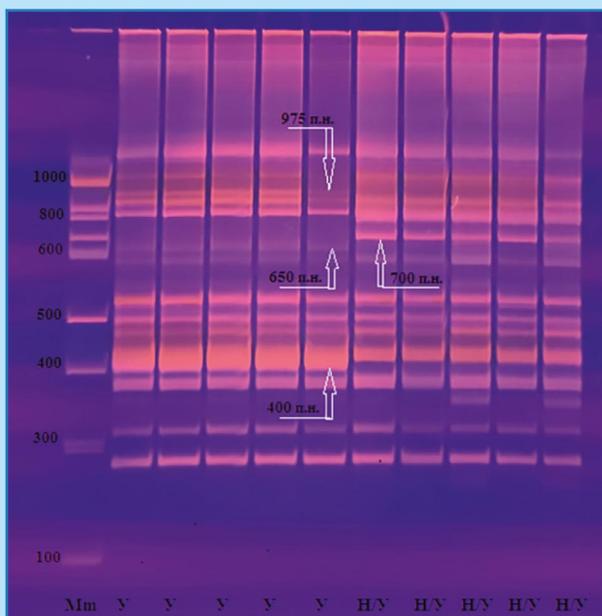


Рис. 3. Визуализация продуктов ПЦР по локусу NI-F02a в 8%-ом ПААГ.