

ОЦЕНКА ВНУТРИРОДОВОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РОДА BRASSICA С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ К ГЕНАМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С МОРОЗОСТОЙКОСТЬЮ

Г.В. Мозгова, В.Н. Кипень, А.А. Буракова, М.С. Парфенчик, В.А. Лемеш, Л.В. Хотылева
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, g.mozgova@igc.by

Согласно исследованиям экспертов Всемирного банка развития оценочное распределение ущерба, наносимого отраслям экономики от опасных природных явлений, составляет порядка 100 млн долларов ежегодно. Самая большая доля потерь приходится на сельское хозяйство (42%), поскольку снижается урожайность сельскохозяйственных культур в результате перепада температур, вымокания и ослабления закалки растений. Холодовой стресс негативно влияет на продуктивность растений семейства *Brassicaceae*, ограничивая их рост и развитие [1, 2]. В этой связи возделывание важных сельскохозяйственных видов семейства в регионах рискованного земледелия требует получения и использования сортов и форм, устойчивых к низким температурам, что является одним из определяющих факторов их успешного роста, развития и высокой продуктивности.

Создание сортов семейства *Brassicaceae* (рапс, сурепица, репа, капуста, брюква, турнепс и др.), толерантных к пониженным отрицательным температурам, является трудно выполнимой многоплановой задачей, на решение которой влияют различные факторы, такие как время цветения, мощность корневой системы и ее биомасса, длина корней и их заглубление, соотношение корней к побегам, эффективность транспирации и др. [3, 4].

Учитывая тот факт, что устойчивость к пониженным температурам, является количественным признаком [5], предпочтительный научно обоснованный подход для создания новых устойчивых сортов растений семейства *Brassicaceae* состоит в том, чтобы идентифицировать полиморфные аллели генов, ассоциированные с устойчивостью к пониженным температурам, разработать эффективные молекулярные маркеры к выявленным аллелям и использовать их для отбора устойчивых форм.

Настоящее исследование направлено на оценку внутриродовой изменчивости форм коллекции семейства *Brassicaceae* с помощью ДНК-маркеров к генам А- и С-геномов, ассоциированных с морозостойкостью. Коллекция включает 91 форму семейства *Brassicaceae* (сорта и гибриды) из разных мест произрастания: рапса *B. napus* L., капусты полевой *B. rapa* ssp. *oliefera* (DC) Metzg., капусты белокочанной *Brassica oleracea* var. *capitata* L., турнепса *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* Metzg., репы листовой, репы кормовой, а также брюквы *Brassica napus* var. *napobrassica* (L.). Сорты и гибриды получены из НПЦ по земледелию НАН Беларуси (Республика Беларусь), ВИР имени Н.И. Вавилова и Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса (Российская Федерация).

В исследовании Huang и соавторов (2017) идентифицированы 10 SSR-маркеров, которые достоверно коррелировали с относительной электропроводностью тканей (Na10-CO3, BRAS011, BrGMS102, O113-G05, BrGMS4511, BrGMS397, BrGMS3120, BrGMS171, BnGMS164, BrGMS579). С содержанием малонового диальдегида (MDA) у *B. rapa* достоверно коррелировали все вышеперечисленные ДНК-маркеры и SSR-маркер BnGMS67 [6, 7, 8]. Четыре SSR-маркера (Na10-CO3, BrGMS4511, BrGMS397, BnGMS164) показали высокую достоверную позитивную корреляцию с относительной электропроводностью тканей и пять SSR-маркеров (Na10-CO3, BrGMS4511, BrGMS397, BRAS011 и BnGMS67) – с содержанием MDA у *B. rapa*. Установлено также, что три ДНК-маркера (Na10-CO3, BrGMS4511, BrGMS397) имеют высокую достоверную позитивную корреляцию с обоими физиологическими индексами (относительная электропроводность тканей и содержание MDA). На основании этого было выдвинуто предположение, что эти два признака контролирует один QTL-локус на одной хромосоме: маркер Na10-CO3 - на хромосоме A01; маркер BrGMS397 - на хромосоме A02; маркер BrGMS4511 - на хромосоме A03). Показано, что SSR-маркер BrGMS397 (A02: 8.97 Mb) расположен рядом с геном, кодирующим индуцируемый холодом РНК-связывающий белок (A02: 4.97 Mb), а маркер BrGMS4511 (A03: 16.17 Mb) близко расположен к двум холодоиндуцибельным генам (A03: 20.56 Mb и 21.74 Mb, соответственно). Результаты исследования установили, что относительная электропроводность тканей и содержание MDA наследуются как количественные признаки, поэтому сделано заключение о том, что гены-кандидаты, регулируемые холодом (COR, cold-regulated), расположены в этих трех областях. Было показано, что другие SSR-маркеры, выявленные в исследовании, располагаются на нескольких хромосомах *B. rapa*, указывая на то, что несколько QTL отвечают за формирование данных признаков.

Исследования выявленных SSR-маркеров были продолжены на поколениях F2 и линиях F2:3 *B. napus* [9]. При оценке устойчивости к холоду *B. napus* по SSR-маркерам выявлено три QTL (qSPADYL-6, qSPADYS-6 и qMADYS-6), ассоциированные с содержанием MDA и расположенные в одной области группы сцепления LG6. BLAST-анализ показал, что последовательности маркеров, сцепленных с этими QTL, коллинеарны с последовательностями ДНК хромосомы A08 у *B. rapa* [10]. Также, у *B. napus* выявлены два гена BnaA08g05330D и BnaA08g15470D, кодирующие COR-белки, связанные с формированием холодостойких генотипов. Кроме того, было установлено высокое сходство последовательностей генов COR *B. napus* с генами Bra039858 и Bra01579 *B. rapa*, которые кодируют белки холодового стресса и расположены на хромосоме A08 *B. rapa* (6.27 М и 14.53 М, соответственно) [10].

Настоящее исследование показало, что формы рапса в основном не проявляли полиморфизм при использовании SSR-маркера Bn O110 (выявлялись фрагмент размером 180 п.н.). Полиморфные фрагменты были определены только у трех сортов рапса - Sutton's Favourite (Великобритания), Васэ Абурана и Каванагаре (Япония), у которых выявлялись фрагменты 180 п.н. и 274 п.н., а для сорта Asragagus (Великобритания) – 180 п.н. и 308 п.н. Также два фрагмента размером 180 п.н. и 274 п.н. определялись у сорта капусты полевой Rapido (Финляндия), брюквы Местная (Россия), репы листовой Okute Oosaka Shirona (Япония). У всех сортов капусты огородной выявлялся фрагмент размером 274 п.н.

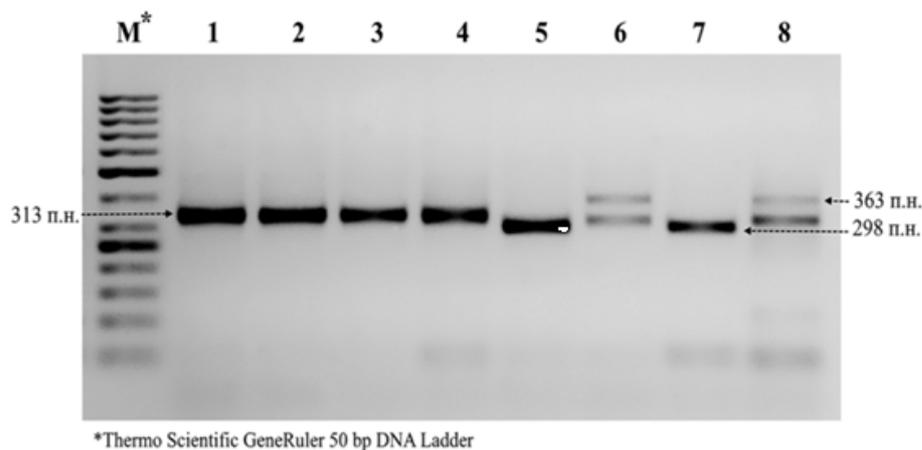
SSR-маркер BrGMS180-1 позволял выявлять 2 фрагмента размером 383 п.н. (ассоциирован с морозостойкостью) и 361 п.н. (ассоциирован с чувствительностью к отрицательным температурам). У сортов рапса *B. napus* выявлялся только фрагмент 383 п.н., либо два фрагмента – 383 п.н. и 361 п.н., у сортов капусты полевой выявлялся либо фрагмент размером 383 п.н., либо – 361 п.н., у сортов репы кормовой выявлялся только фрагмент размером 361 п.н. У сортов репы листовой и брюквы выявлялся фрагмент размером 383 п.н. У всех сортов капусты огородной выявлялся фрагмент размером 383 п.н.

Использование SSR-маркера CB10578-1 позволяло детектировать у сортов *B. napus* фрагменты размером 200 п.н. (ассоциирован с чувствительностью к отрицательным температурам), 232 п.н. (ассоциирован с морозостойкостью) или оба фрагмента. Единственный фрагмент размером 232 п.н. детектировался только у сортов рапса Васэ Абурана и Каванагаре (Япония). Аналогично, только фрагмент 232 п.н. выявлялся у всех проанализированных сортов изученных подвидов *B. rapa*.

SSR-маркер BrGMS372-2 выявлял фрагменты размером 386 п.н. (ассоциирован с чувствительностью к отрицательным температурам), 401 п.н. (ассоциирован с морозостойкостью) или оба фрагмента, при этом у большинства сортов *B. napus* выявлялся единичный фрагмент размером 401 п.н. У капусты полевой выявлялся фрагмент 386 п.н., 401 п.н. либо оба фрагмента, при этом у сор-

та Rapido (Финляндия) выявлялся фрагмент размером 401 п.н., а у сорта Латвийская (Латвия) и Gruber (Финляндия) – оба фрагмента. У всех исследованных сортов капусты огородной выявлялся фрагмент размером 401 п.н. У сортов брюквы выявлялся фрагмент размером 401 п.н., либо оба фрагмента – 401 п.н. и 386 п.н. У репы кормовой детектировался фрагмент размером 386 п.н. либо оба фрагмента – 401 п.н. и 386 п.н. У репы листовой выявлялся либо фрагмент размером 386 п.н. (сорт Okute Oosaka Shirona, Япония), либо фрагмент размером 401 п.н. (сорт Goseki Late, Япония)

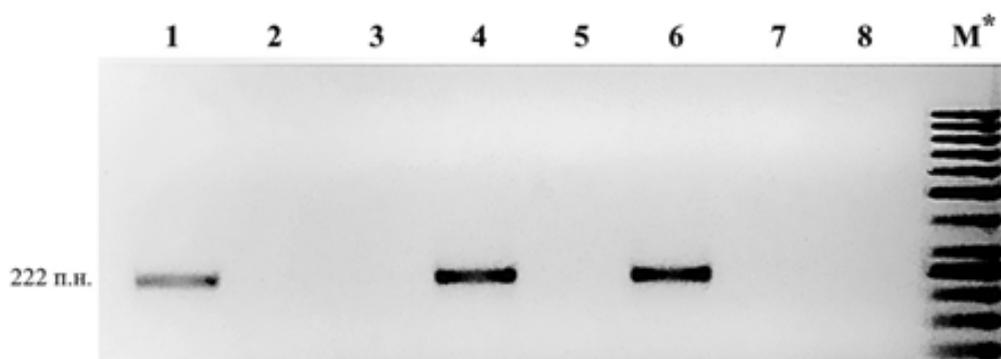
Для SSR-маркера BrgMS5339-1, фланкирующего области qSPADYS-6 и qMDAYS-6, также были определены полиморфные фрагменты (рисунок 1). У большинства сортов рапса детектировалось 2 фрагмента размером 299 (ассоциирован с чувствительностью к отрицательным температурам) и 363 п.н. (ассоциирован с морозостойкостью). У сортов Tall Scotch Cured (Канада), Каванагаре (Япония), Гедемин х Крис и Гранит х Крис (Казахстан), Sutton's Favorite (Великобритания), Rabularia (Новая Зеландия), Schnitt gruner, Тайфун (Германия), Jet Neuf (Франция), Orig Sengaps (Швеция), Fogageго (Перу) детектировался фрагмент размером 363 п.н. Данный фрагмент также детектировался у сортов *Brassica napus* var. *napobrassica* Местная (Россия) и Svalof Victoria (Швеция). Обращает внимание, что и у всех исследованных сортов капусты полевой *B. rapa* L. ssp. *oleifera* детектировалась последовательность размером 313 п.н. При этом, фрагмент размером 313 п.н. детектировался и у сорта рапса Schnitt brauner (Германия), у которого также был выявлен фрагмент размером 363 п.н. У разновидностей *B. rapa* - репы кормовой и репы листовой идентифицировался либо единичный фрагмент 299 п.н., либо два фрагмента размером 313 п.н. и 363 п.н. У всех исследованных сортов капусты огородной детектировался фрагмент размером 363 п.н.



Генотипы: 1 – Rapido, 2 – Gruber, 3 – Латвийская, 4 – Злата, 5 – Okute Oosaka Shirona, 6 – Goseki Late, 7 – Ova Daehnfelddt, 8 – Brunstadnepe

Рисунок 1. – Электрофоретическое разделение ампликонов для SSR-маркера BrgMS5339-1

С помощью SSR-маркера Na10-CO3, который, как ранее было показано, коррелирует с содержанием малонового диальдегида и относительной проводимостью тканей при уровне значимости 0,01 [11], фрагмент 222 п.н., ассоциированный с морозостойкостью, был выявлен у следующих сортов *B. napus*: Зенит, Зорный, Август, Лидер, Империял, Арсенал, Прогресс (Беларусь), Столичный, Горизонт (Россия), Jet Neuf (Франция), Dunne, Schnitt Grunner, ДК Импрессион КЛ, Ментор, Ореолус, Сафер, Тайфун, Триумф, Трой, Туре, Фенцер, Инспирацион, Делфи, Эйнштейн, Гару, Мемфис, Ситро, Кларус, Куга, Атора (Германия), ЦВХ 242 и ЦВХ 249Д (США), Си Медал, Си Мартен, Си Савео (Швейцария), Адмирал, Артога, Бонанза, Бонзай, Аризона (Франция), Синтетик (Украина), Hungry Gar, Aspagagus (Великобритания), Каванагаре, Васэ Абурана (Япония). У капусты полевой фрагмент выявлен у сортов Rapido (Финляндия) и Злата (Россия), у репы листовой *B. rapa* ssp. *rapa* var. *komatsuna* – у сорта Goseki Late (Япония) (рисунок 2). Последовательность не детектировалась ни у одного исследованного сорта *B. napobrassica*, репы кормовой (турнепс) и у капусты огородной.



Генотипы: 1 – Rapido, 2 – Gruber, 3 – Латвийская, 4 – Злата, 5 – Okute Oosaka Shirona, 6 – Goseki Late, 7 – Ova Daehnfeldt, 8 – Brunstadnepe

Рисунок 2. – Электрофоретическое разделение ампликонов для SSR-маркера Na10-CO3

Фрагмент размером 127 п.н., ассоциированный с устойчивостью, детектируемый с помощью SSR-маркера O1113-G05 (коррелирует с относительной электропроводностью тканей при уровне значимости 0,05), выявлялся у всех сортов рапса, кроме Васэ Абурана (Япония), Dunne (Германия), Orig Senraps (Швеция), Fograjero (Перу), Ветразь (Беларусь). У всех исследованных сортов капусты полевой, репы листовой, репы кормовой и брюквы фрагмент не выявлен. При этом, фрагмент выявлялся у всех сортов капусты огородной, что дает возможность предполагать, что данный фрагмент у *B. napus* принадлежит геному *C*.

Коллекция растений семейства *Brassicaceae* была исследована с помощью геномных маркеров, позволяющих выявлять инсерции и делеции в гене *BoCCA1*, который кодирует ассоциированный с циркадными ритмами транскрипционный фактор *BoCCA1* семейства MYB. Ген *BoCCA1* – один из ключевых генов, ассоциированный с морозостойкостью у *B. oleracea* [12], и как показано нами у *B. rapa* и *B. napus* [13, 14]. Установлено, что 4 SCAR-маркера, фланкирующие аллель *BoCCA1-1*, позволяют амплифицировать последовательности различных размеров и выявлять делеции либо инсерции в данных последовательностях. Пара праймеров *BoCCA1-F/ BoCCA1-1R1* позволяет дифференцировать устойчивые (фрагмент размером 987 п.н.) и восприимчивые к холоду формы рапса (фрагмент размером 752 п.н.). Так, фрагмент размером 987 п.н. выявлялся у сортов рапса Tall Scotch Curled (Канада) и Каванагаре (Япония); ряд генотипов несли как фрагмент размером 987 п.н., так и 752 п.н. Среди них сорта белорусской селекции – Зенит, Днепр, Мартын и Добродей, и российской селекции – Лауреат, Sutton's Favorite (Великобритания), Rabularia (Новая Зеландия), Васэ Абурана (Япония), Чорний Велетень, Синтетик (Украина), Менгер, Мерседес, Минерва, Ореолус, Триумф (Германия), ЦВХ 249Д (США). Все исследованные сорта капусты полевой, брюквы, репы листовой и капусты огородной несли последовательность размером 987 п.н.

SCAR-маркер *BoCCA1-2R1* сцеплен с аллелем *BoCCA1-2* гена *CCA1*, который вносит вклад в общую устойчивость рапса к низким температурам. Праймеры, фланкирующие последовательность маркера, позволяют амплифицировать фрагмент размером 792 п.н. для восприимчивых образцов. Использование нами ДНК-маркера *BoCCA1-2R1* позволило детектировать последовательность, определяющую чувствительность к пониженным отрицательным температурам, у всех сортов рапса, кроме сортов рапса Гранит х Крис, Гедемин х Крис и М401 (Казахстан), Гордон (Беларусь) При этом, у сортов капусты полевой Gruber (Финляндия), Злата (Россия), Латвийская (Латвия), репы листовой Goseki Late и Okute Oosaka Shirona и сорта рапса Васэ Абурана (Япония), детектировались фрагменты размером 552 п.н. и 700 п.н. Предполагается, что эти сорта не несут аллель *BoCCA1-2*. У капусты полевой Rapido (Финляндия) выявлялись фрагменты размером 552 п.н. и 792 п.н. У исследованных сортов брюквы детектировалось три фрагмента размером 552 п.н., 700 п.н. и 792 п.н. У всех сортов капусты огородной детектировалась аллель размером 792 п.н.

SCAR-маркер *BoCCA1-1R2* выявлял полиморфизм фрагментов с меньшей точностью, чем два предыдущих ДНК-маркера *BoCCA1-1R1* и *BoCCA1-2R1*. Тем не менее, он повторял результаты исследований коллекции по маркеру *BoCCA1-1R1* и позволил дифференцировать сорта белорусской селекции Добродей, Мартын и дополнить анализ новым сортом – Днепр. Сорт Зенит с использованием данного маркера не дифференцировался. Также повторены результаты эксперимента для сортов Лауреат (Россия), Черный велетень, Синтетик (Украина), Sutton's Favorite (Великобритания), ЦВХ 249Д (США), Rabularia (Новая Зеландия), Менгер, Минерва, Ориолус, Триумф (Германия), а для сорта Мерседес (Германия) результаты не совпали. Использование SCAR-

маркера *BoCCA1-1R2* также позволило дополнительно дифференцировать сорта рапса Гару, Мемфис и Ситро (Германия), Адмирал, Артога, Бонзай, Бонанза, Альбатрос, ЕС Одис (Франция), Си Мартен (Швейцария).

SCAR-маркер *BoCCA1-2R2* выявлял практически у всех сортов рапса два аллеля 531 и 504 п.о. Вместе с тем, получены обращающие на себя внимание результаты о том, что у двух наиболее морозоустойчивых сортов рапса Каванагаре (Япония) и Tall Scotch Curled (Канада) детектировался только фрагмент размером 504 п.о. с помощью SCAR-маркера *BoCCA1-2R2*. Необходимо подчеркнуть, что у данных сортов с помощью SCAR-маркера *BoCCA1-1R1* была установлена гомозиготность по аллелю гена *BoCCA1-1*, наличие которой определяет устойчивость к отрицательным температурам. Это свидетельствует о делеции в гене *BoCCA1-1*, которая, возможно, определяет наибольшую морозостойкость данных сортов. Следует отметить, что у сортов Васэ Абурана (Япония), Satton`s Favorite (Великобритания), ЕС Нептун (Франция), Мемфис (Германия), Добродей, Днепр (Беларусь), Синтетик (Украина), а также у исследованных сортов капусты полевой, репы листовой и репы кормовой выявлялся единичный фрагмент размером 531 п.о., что свидетельствует о наличии инсерции в исследуемом гене. При этом у сортов капусты огородной выявлялся только фрагмент размером 504 п.н.

В дополнение к вышеперечисленным маркерам мы провели анализ 51 формы коллекции с помощью SNP-маркера, который содержит несовпадающие нуклеотиды для оптимизации специфичности, что позволяет определить полиморфизм аллелей у морозостойких и восприимчивых форм [12]. Данный ДНК-маркер был разработан на основании различий C/G по нуклеотиду 2262 гена *CCA1*, где аллель С ассоциирован с формированием морозостойких фенотипов, а G – чувствительных к отрицательным температурам. Нами был использован SSR-маркер, разработанный на *B. oleracea*, для анализа его применимости и эффективности для детекции SNP у *B. napus*, *B. rapa* и их разновидностей. Определение генотипа для полиморфизма *BoCCA1_2262C/G* осуществляли с использованием оценки представленности аллеля на основании значения *Ct* (threshold cycle). Были выявлены три вида генотипов - CC, GC и GG. При этом устойчивые к холоду генотипы рапса Tall Scotch curled (Канада) и Hungry gar (Великобритания) являлись гомозиготами по аллелю С. Выявлены также 14 сортов рапса (Беларусь), 2 гибрида и 1 сорт рапса (Казахстан), 2 сорта рапса (Украина), 2 сорта рапса (Германия), 1 сорт рапса (Франция) и 2 сорта брюквы (Россия), которые являются гетерозиготами по локусу *BoCCA1_2262C/G*.

Таким образом, 7 SSR-маркеров (Na10-CO3, O1113-G05, SSR Bn O110, BrgMS180-1, BrgMS 5339-1, CB 10578-1, BrgMS 372-2), тесно сцепленных с QTL морозостойкости, 4 SCAR-маркера и 1 SNP-маркер, выявляющие полиморфизм ассоциированного с циркадными ритмами транскрипционного фактора семейства MYB - *CCA1*, позволили установить полиморфизм коллекции. SSR-маркеры Na10-CO3, O1113-G05 и BrgMS 5339-1, а также SCAR-маркер *BoCCA1-2R1* показали свою эффективность и применимость для дифференциации разновидностей семейства *Brassicaceae* и могут быть использованы для определения таксономического статуса видов или подвидов семейства.

Исследование выполнено в рамках задания «Изучение экспрессии генов А- и С- геномов семейства *Brassicaceae*, ассоциированных с морозостойкостью» подпрограммы «Геномика, эпигеномика, биоинформатика» ГПНИ «Биотехнологии-2» на 2021 – 2025 годы.

Список использованных источников

1. Jha U. C., Bohra A., Jha R. Breeding approaches and genomics technologies to increase crop yield under low-temperature stress / Plant Cell Rep. – 2017. Vol. 36. – P. 1–35. - 10.1007/s00299-016-2073-0.
2. Engineering Multiple Abiotic Stress Tolerance in Canola, *Brassica napus* / N. Lohani [et al.] / Front. Plant Sci. – 2020. – Vol. 11:3. - doi: 10.3389/fpls.2020.00003.
3. CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants / M. Q. Zhou [et al.] // Crit. Rev. Biotechnol. – 2011. – Vol. – P. 186–192. – doi: 10.3109/07388551.2010.505910.
4. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants / Ding Y. [et al.] // New Phytol. – 2019. – <https://doi.org/10.1111/nph.15696>.
5. Genetic analysis and mapping of genes controlling freezing tolerance in oilseed *Brassica* / R.A. Teutonico [et al.] // Molecular Breeding – 1995. Vol. 1. – P. 329-339.
6. Mapping of quantitative trait loci related to cold resistance in *Brassica napus* L. / Zh. Huang [et al.] // J. of Plant Physiology. – 2018. – Vol. 231. – P. 147-154.

7. Genetic variability between several *Brassicaceae* populations of different winter survival ability / B. Rakić [et al.] // In. 12th IRC: Sustainable Development in Cruciferous Oilseed Crops Production. Vol. 2. – Wuhan, China. - 2007. – P. 78-80.

8. Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* / Z. Huang [et al.] // Breed Sci. – 2017. Vol. 67, № 3. – P. 213–220.

9. Mapping of quantitative trait loci related to cold resistance in *Brassica napus* L. / Zh. Huang [et al.] // J. of Plant Physiology. – 2018. – Vol. 231. – P. 147-154.

10. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon / F. Novillo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 104. – P. 21002–21007.

11. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities / S.J. Gilmour [et al.] // Plant Mol Biol. – 2004. Vol. 54, № 5. – P. 767–781.

12. Allelic variation in *Brassica oleracea* CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (BoCCA1) is associated with freezing tolerance / H. Song [et al.] // Hortic. Environ. Biotechnol. – 2018. – Vol. 59, № 3 – P. 423–434.

13. Геномные маркеры, ассоциированные с устойчивостью к низким температурам у *Brassica rapa* L. / Амосова А.В., Саматадзе Т.Е., Мозгова Г.В., Кипень В.Н., Дубовская А.Г., Артемьева А.М., Юркевич О.Ю., Зошук С.А., Лемеш В.А., Муравенко О.В. // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54, № 4. – С. 603-615.

14. Генетический полиморфизм рапса (*Brassica napus*) в связи с морозостойкостью/ Г.В. Мозгова, Н.Е. Хоружий, А.В. Амосова, Я.Э. Пилюк, В.М. Белявский, С.Ю. Храмченко, О.В. Муравенко, В.А. Лемеш // Молекулярная и прикладная генетика. – 2019. – Т. 26. – С. 34-43.