

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 3, Number 39 (2017), 193 – 197

S. E. Suleimenova¹, T. K. Egizbaeva¹, R. K. Daminova¹, V. F. Krasavin², B. A. Yertaeva²¹Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan,²LP "Kazakh Research Institute of Potato and Vegetable", Almaty, Kazakhstan**ASSESSMENT OF POTATO RESISTANT
TO RING WITH THE USE OF SCAR-MARKERS**

Abstract. With SCAR use – a marker grades of the Kazakhstan selection, with genes on stability to ring rot of potato are revealed. The obtained data can be used for increase in efficiency of selection researches on creation of steady and productive grades of potatoes.

Keywords: potato, pathogen, ring rot, molecular markers, DNA markers, polymerase chain reaction method, resistance.

УДК 635.21 (06)

С. Е. Сулейменова¹, Т. К. Егизбаева¹, Р. К. Даминова¹,
В. Ф. Красавин², Б. А. Ертаева²¹Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,²ТОО «Казахский научно-исследовательский институт картофелеводства и овощеводства»,
п. Кайнар, Карасайский район, Алматинская область, Казахстан**ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SCAR-МАРКЕРОВ**

Аннотация. С использованием SCAR-маркера выявлены сорта казахстанской селекции, с генами на устойчивость к кольцевой гнили картофеля. Полученные данные могут быть использованы для повышения эффективности селекционных исследований по созданию устойчивых и продуктивных сортов картофеля.

Ключевые слова: картофель, патоген, кольцевая гниль, молекулярные маркеры, ДНК-маркеры, метод полимеразной цепной реакции, устойчивость.

Введение. Картофель – одна из основных продовольственных культур во всем мире. Получение высоких и устойчивых урожаев картофеля, его сохранение в настоящее время приобретает все большую актуальность. Однако, несмотря на то, что генетический потенциал районированных в республике сортов картофеля достигает 50-55 т/га, о чем свидетельствуют результаты госсортоиспытаний [1], в реальных условиях сельскохозяйственных организаций средняя урожайность ниже 15,0 т/га, т.е. реализация потенциала сортов в целом не превышает 20-30 % [2].

Одной из основных причин снижения эффективности картофелеводства является сильное развитие болезней на растениях и клубнях, так как вегетативный способ размножения этой культуры способствует накоплению и сохранению патогенов в клубнях. Инфекционные заболевания сельскохозяйственных растений, в том числе и кольцевая гниль картофеля, которую вызывает грамположительная бактерия *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), приводят к значительным потерям урожая. Возбудителем болезни является бактерия, поражающая все органы картофельного растения [3]. Чрезвычайная вредоносность бактериозов связана с отсутствием устойчивости к ним у большинства возделываемых сортов картофеля. Выведение устойчивых сортов

картофеля – основной экономически выгодный и экологически безопасный способ борьбы с патогенами [4].

Учитывая опасность кольцевой гнили для картофеля, во многих регионах мира проводятся интенсивные исследования в области генетики и селекции на устойчивость к данной болезни [5-9].

В настоящее время полимеразная цепная реакция является наиболее точным и чувствительным диагностическим методом, позволяющим быстро выявлять латентную инфекцию различных фитопатогенов, в том числе бактерий *Cms*, вызывающих кольцевую гниль картофеля [10, 11]. Для диагностики возбудителя кольцевой гнили разработаны праймеры, технологический регламент пробоподготовки и проведения анализа на основе полимеразной цепной реакции [12].

Поэтому, выявления устойчивых к бактериальным заболеваниям сортов картофеля отечественной селекции является актуальным. Ранее нами методом ПЦР анализа были выявлены устойчивые к жаре-, засухе и фитофторозу сорта картофеля казахстанской селекции [13-15].

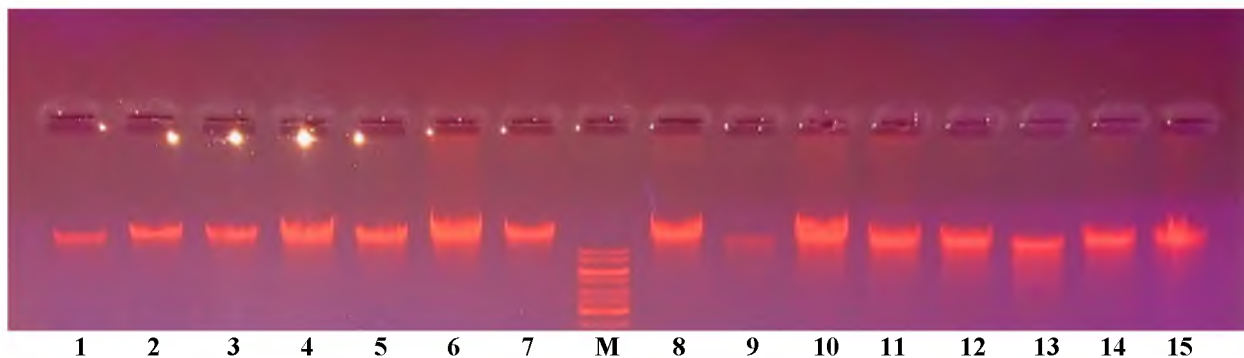
Цель исследований: Поиск генов устойчивости к бактериальным заболеваниям (кольцевой гнили) у 17 сортов картофеля отечественной селекции.

Материал и методы исследования. Выделение геномной ДНК растений. Изолирование ДНК проводили из проростков клубней 17 сортов картофеля (1 – Беркут, 2 – Эдем, 3 – Тянь-шаньская, 4 – Сеним, 5 – Тамыз, 6 – Урал-1, 7 – Нур-Алем, 8 – Федор, 9 – Памяти Кунаева, 10 – Памяти Боброва, М – ДНК маркеры молекулярного веса, 11 – Аксор, 12 – Тохтар, 13 – Бирлик, 14 – Тамаша, 15 – Удовидский, 16 – Никитка, 17 – Памяти Лигай).

В целях оптимизации метода выделения ДНК растений использован коммерческий набор (Qiagen DNesy Mini kit), а также модифицированный нами метод, описанный Suman P.S. Khanuja [16].

Молодые листья растирали в ступке в ТЕ буфере. Пробы центрифугировали при 13000 об/мин в течение 3 минут, удаляли надосадочную жидкость, а осадок суспендировали в 500 мкл ТЕ буфера. Для лизирования клеток к суспензии добавляли 10 мкл лизоцима (10 мг/мл), тщательно смешивали и инкубировали при 37° С в течение 2 часов. После чего добавляли 30 мкл 10% SDS и 3 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Далее инкубировали 3 часа при 37°С. Для удаления фрагментов клеточной стенки, остаточных белков и полисахаридов, добавляли 100 мкл 5М NaCl. Затем, тщательно перемешивали и добавляли 80 мкл раствора СТАВ (10% СТАВ в 07 М NaCl). Перемешав на вортексе, инкубировали 10 минут, при 65°С. Заключительную очистку, выполняли хлороформным методом, с этой целью добавили 750 мкл хлороформ/изоамилового спирта (24/1), тщательно встряхнули и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут. Водную фазу переносили в новую пробирку. Повторяли процедуру очистки с хлороформ/изоамиловым спиртом (24/1). Центрифугировали и водную фазу переносили в новые пробирки. ДНК преципитировали 0,6 объемами изопропилового спирта. Осадили ДНК центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 минут. Промыли осадок ДНК однократно 70% этиловым спиртом. Очищенные образцы ДНК растворяли в 100 мкл однократного ТЕ буфера и хранили при минус 20°С. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре NanoDrop при длине волны 260 нм.

Результаты исследования. Результаты изолирования геномной ДНК сортов и линий представлены на рисунке 1.



1 – Беркут, 2 – Эдем, 3 – Тянь-шаньская, 4 – Сеним, 5 – Тамыз, 6 – Урал-1, 7 – Нур-Алем, 8 – Федор, 9 – Памяти Кунаева, 10 – Памяти Боброва, 11 – Памяти Лигай, 12 – Бирлик, 13 – Никитка, 14 – Удовидский, 15 – Карасайский

Рисунок 1 – Электрофореграмма изолированной ДНК сортов картофеля 1,2 % агарозном геле

Данные электрофореграммы показывают, что у всех исследуемых сортов картофеля несмотря на различия в концентрациях выделены чистые ДНК, которые будут способствовать качественному проведению ПЦР анализа.

Концентрация ДНК исследуемых сортов и линии картофеля были высокими колебалась в пределах от 677,15 до 3031,72 ng/µl (таблица).

Концентрация ДНК разных сортов картофеля

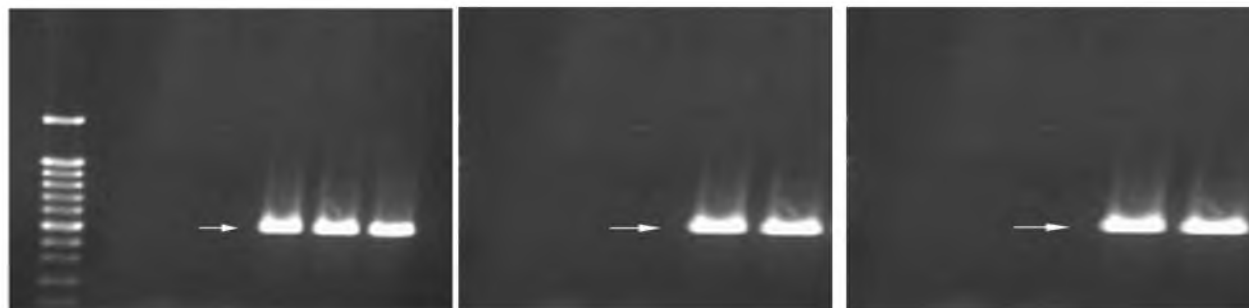
Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor obs.	340 row
14.13	1032.30	20.646	10.375	1.99	2.30	50.00	230	0.957	0.188
14.15	1090.30	20.006	10.062	1.99	2.20	50.00	230	9.086	0.393
14.15	677.15	13.543	6.566	2.06	2.27	50.00	230	5.974	0.321
14.18	1493.61	28.272	14.204	1.99	2.11	50.00	230	13.424	1.175
14.18	1671.20	33.424	16.434	2.03	2.31	50.00	230	14.490	0.265
14.19	1990.39	39.808	19.483	2.04	2.22	50.00	230	17.913	0.895
14.22	1154.69	23.094	11.093	2.08	2.33	50.00	230	9.897	0.215
14.23	2026.98	40.540	20.150	2.01	1.99	50.00	230	20.382	2.332
14.24	685.04	13.701	6.678	2.05	2.31	50.00	230	5.933	0.580
14.25	1721.63	34.433	16.862	2.04	2.21	50.00	230	15.579	1.563
14.26	1400.29	28.006	13.751	2.04	2.29	50.00	230	12.215	0.359
14.27	966.91	19.338	9.473	2.04	2.26	50.00	230	8.564	1.744
14.28	1260.62	25.212	12.104	2.08	2.31	50.00	230	10.895	0.506
14.30	682.88	13.658	6.994	1.95	1.91	50.00	230	7.166	1.724
14.30	1414.47	28.289	13.692	2.07	2.27	50.00	230	12.460	0.384
14.32	897.27	17.945	9.165	1.96	2.04	50.00	230	8.779	1.495
14.32	3031.72	60.634	29.392	2.06	2.24	50.00	230	27.123	0.587

Для проведения амплификации использовали праймеры к нуклеотидной последовательности межгенного спейсера 16S-23S рРНК: PSA-F (5'-ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa-3') и PSA-R (5'-tac tga gat gtt tca cttccc c-3'), синтезированные в НЦБ, в лаборатории органического синтеза Ахметоллаева И.А.

Реакционную смесь объемом 50 мкл, состоящую из 2 фаз и воска (15 мкл) для их разделения, готовили в микропробирках для ПЦР, поочередно добавляя реактивы. Нижняя фаза содержала 3 мкл H₂O, 5 мкл НТП и по 1 мкл каждого праймера; верхняя – 10 мкл ПЦР-буфера (5'), 7 мкл H₂O, 2,5 мкл MgSO₄, 0,5 мкл Taq- полимеразы. На поверхность ПЦР-смеси наносили 15 мкл H₂O и 5 мкл исследуемой ДНК, после чего пробирки помещали в амплификатор (Eppendorf). Протокол амплификации включал: 1 цикл продолжительностью 3 мин при температуре 95°C; 10 циклов при 95°C в течение 1 мин, 64°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; 25 циклов при 95°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 1 мин. После последнего цикла реакционную смесь выдерживали при 72°C в течение 5 мин и в последующем хранили при температуре 4°C.

Для разделения ПЦР-продуктов проводили электрофорез в 1,5 % агарозном геле. Для визуализации ДНК гель в течение 25 мин инкубировали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и просматривали в ультрафиолете на приборе GelDoc XR ("BioRad").

Электрофореграмма продуктов ПЦР сортов картофеля с праймерами, перспективными для определения устойчивости к вредителю *Clavibactermichiganensis* sp. *sepedonicus*:



1 – Беркут, 2 – Эдем, 3 – Тянь-шаньская, 4 – Сеним, 5 – Тамыз, 6 – Урал-1, 7 – Нур-Алем, 8 – Федор,
9 – Памяти Кунаева, 10 – Памяти Боброва, 11 – Памяти Лигай, 12 – Бирлик, 13 – Никитка,
14 – Удовицкий, 15 – Карасайский, 16 – Тамаша, 17 – Аксор

Рисунок 2 – Результаты ПЦР анализа ДНК из листьев картофеля сорта (стрелкой отмечены фрагменты ДНК размером 502 п.о. 1 – маркер молекулярного веса ДНК)

В результате исследования с использованием молекулярных маркеров определены сорта устойчивые к кольцевой гнили: Эдем, Тянь-шаньская, Сеним, Федор, Памяти Кунаева, Памяти Боброва, Никитка, Удовицкий, Карасайский.

Выводы. В результате выполненной работы идентифицировано 9 устойчивых к кольцевой гнили сорта картофеля казахстанской селекции. Полученные результаты могут быть широко использованы в селекционных программах, направленных на создание устойчивых и продуктивных сортов картофеля.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Красавин В.Ф. и др. Каталог генофонда картофеля республики Казахстан (сорта картофеля казахстанской селекции). Алматы. 2016 г. 98 с.
- [2] forbes.kz/process/businessmen/kak_obespechit_kazahstan_kartofelem.
- [3] Омеличкина Ю.В. Ответные реакции растений на действие фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов // автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н. Иркутск. 2015 г. 24 с.
- [4] Шафикова Т. Н., Омеличкина Ю. В. Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам // Журнал «Физиология растений» Т. 62. 2015. № 5. с. 611-627.
- [5] Shafikova T.N., Boyarkina S.V., Omelichkina Y.V., Tauson E.L., Fedoseeva I.V. Диагностика возбудителя кольцевой гнили в клубнях картофеля методом полимеразной цепной реакции. // Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 4, No. 3, 2008, pp. 4-8. ISSN 1997-0838 Original Text Copyright © 2008 by
- [6] Baysal O. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2011. 75: 113–119.
- [7] Eichenlaub R., Garteman K. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011. 49: 445–464.
- [8] Van Vaerenbergh J, De Paepe B, Hoedekie A, Van Malderghem C, Zaluga J, De Vos P, Maes M. 2016. Natural infection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Disease Reports* 33, 7.
- [9] EPPO, 2014. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* found on tomato in Belgium. EPPO Reporting Service 10, 2014/190.
- [10] Белов Г.Л. Разработка методов диагностики возбудителей черной ножки (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) и кольцевой гнили (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skartassonet Burk.) картофеля // автореф. на соиск. к.б.н. М. 2011 г.
- [11] Виноградова С.В. и др. Полногеномное секвенирование фитопатогенных бактерий // Защита картофеля. № 2, 2014. С. 15-17.
- [12] Варицев Ю. А. И др. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. и кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck et Kotth.) Skartassonet Burk.) методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции // ВНИИ картофельного хозяйства, М.: 2003. 33
- [13] Егизбаева Т.К., Даминова Р.К., Сулейменова С.Е., Сарсенбаев Т.К., Алушев А.К. Получение жаростойких линий картофеля методом клеточной селекции // Ж-л Исследования и Результаты Каз НАУ. 2013. № 4. с. 97-101.
- [14] Алушев А.К., Сулейменова С.Е., Егизбаева Т.К., Даминова Р.К., Сарсенбаев Т.К. Клеточная селекция картофеля на засухоустойчивость // Ж-л Известия НАН РК. 2014. №1. С. 32-34.
- [15] Сулейменова С.Е., Егизбаева Т.К., Даминова Р.К., Красавин В.Ф., Каирова М.Ж. Маркирование генов картофеля устойчивости к фитофторозу // Сборник материалов международной научно-практической конференции. 2016 г., Кайнар. с. 459-462.
- [16] Suman P.S. Khanuja, A.K. Shasany, M.P. Darokar and Sushil Kumar. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils // *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1–7, 1999.

REFERENCES

- [1] Krasavin V.F. And other catalog of the gene pool of potatoes of the Republic of Kazakhstan (varieties of potato of Kazakhstan breeding). Almaty. 2016 98 p. (in Russ.).
- [2] forbes.kz/process/businessmen/kak_obespechit_kazahstan_kartofelem. (in Russ.).
- [3] Yu. V. Omelichkina Response of plants to the action of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* with compatible and incompatible relationships of organisms // autoref. diss. na sois. uch. Art. Ph.D. Irkutsk. 2015g. 24 s. (in Russ.).
- [4] Shafikova TN, Omelichkina Yu. V. Molecular-genetic aspects of plant immunity to phytopathogenic bacteria and fungi // The journal "Plant Physiology" Т. 62. № 5, г. 2015, с. 611-627. (in Russ.).
- [5] Shafikova T.N., Boyarkina S.V., Omelichkina Y.V., Tauson E.L., Fedoseeva I.V. Diagnosis of the causative agent of annular rot in potato tubers by the method of polymer-different chain reaction // Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 4, No. 3, 2008, pp. 4-8. ISSN 1997-0838 Original Text Copyright © 2008 by. (in Eng.).
- [6] Baysal O. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2011. 75: 113–119. (in Eng.).

- [7] Eichenlaub R., Garteman K. The *Clavibactermichiganensis* subspecies: molecular investigation of gram positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011. 49:445–464. (in Eng.).
- [8] Van Vaerenbergh J, De Paepe B, Hoedekie A, Van Malderghem C, Zaluga J, De Vos P, Maes M. 2016. Natural infection of *Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Disease Reports* 33, 7. (in Eng.).
- [9] EPPO, 2014. *Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* found on tomato in Belgium. EPPO Reporting Service 10, 2014/190. (in Eng.).
- [10] Belov G.L. Development of diagnostic methods for black leg pathogens (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) and ring rot (*Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. EtKotth.) Skaptassonet Burk.) Potatoes. On sos. Ph.D. M. 2011. (in Russ.).
- [11] Vinogradova S.V. Full genome sequencing of phytopathogenic bacteria. Protection of potatoes. No. 2, 2014. P.15-17. (in Russ.).
- [12] Varitssev, Yu.A., et al. Methodological guidelines for the diagnosis of the causative agents of the black leg of *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al) and the annular rot of *Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck et Kotth) Skaptassonet Burk) Enzyme immunoassay, immunofluorescence microscopy and onlimerase chain reaction // All-Union Research Institute of Potato Management, Moscow: 2003. 33 (in Russ.).
- [13] T. Egizbaeva, R. Daminova, S. Suleimenova, T. Sarsenbaev, A. Apushev. Obtain heat-resistant potato lines by cell selection // Zh-I Research and Results Kaz NAU. 2013. № 4. p. 97-101. (in Russ.).
- [14] Apushev A.K., Suleimenova S.E., Egizbaeva T.K., Daminova R.K., Sarsenbaev T.K. Cellular selection of potatoes on drought tolerance // Zh-I Izvestiya of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. 2014. №1. Pp. 32-34. (in Russ.).
- [15] Suleimenova S.E., Egizbaeva T.K., Daminova R.K., Krasavin V.F., Kairova M.Zh. Marking of potato genes resistance to late blight // The proceeding of international scientific practical conference. 2016, Kainar. Pp. 459-462. (in Russ.).
- [16] Suman P.S. Khanuja, A.K. Shasany, M.P. Darokar and Sushil Kumar. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils // Plant Molecular Biology Reporter 17: 1-7, 1999. (in Eng.).

С. Е. Сүлейменова¹, Т.К.Егізбаева¹, Р.К.Даминова¹, В. Ф. Красавин², Б. А. Ертаева²

¹ Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан,

² Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ҒЗИ, Алматы, Қазақстан

КАРТОПТЫҢ САҚИНАЛЫ ШІРІГІНЕ ТӨЗІМДІЛІГІН SCAR-МАРКЕРЛЕРДІ ПАЙДАЛАНЫП БАҒАЛАУ

Аннотация. SCAR-маркерлерді пайдаланып картоптың сақиналы шірігіне төзімді гендері бар қазақстандық селекциясының сорттары айқындалды. Алынған мәліметтерді картоптың төзімді және өнімді сорттарын шығаруда селекциялық зерттеулердің тиімділігін арттыру үшін пайдалануға болады.

Түйін сөздер: картоп, сақиналы шірік, молекулалық маркер, ДНҚ- маркері, полимераздық тізбектік реакция әдісі, төзімділік.

Сведения об авторах:

Сүлейменова С.Е. – доктор биологических наук, профессор, Казахский национальный аграрный университет, info@kaznau.kz, suleimenova.s.e@mail.ru

Егізбаева Т.К.–магистр технических наук, PhD докторант Казахского национального аграрного университета, togjan26@yandex.ru

Даминова Р.К.–магистр технических наук, Зав. лаб., Казахский национальный аграрный университет, daminova.rabiga@yandex.ru

Красавин В.Ф. – Заведующий отделом селекция картофеля, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик АСХН РК, Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства, kazniiko@mail.ru, Krasavin@mail.ru

Ертаева Б.А. – Младший научный сотрудник лаборатории селекции картофеля, Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства, kazniiko@mail.ru, Bibigul.ertaeva@mail.ru, Bibigul.ertaeva@mail.ru