

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПЕРЦА К ЧЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ

MOLECULAR MECHANISMS OF PEPPER RESISTANCE TO BACTERIAL BLACK SPOT

**E. Dubina
I. Yevtushenko**

Summary. The article is devoted to the study of molecular mechanisms of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance to bacterial black spot, the causative agent of which is bacteria of the genus *Xanthomonas*. The paper considers the features of plant defense reactions at the molecular level, including the participation of specific genes and signaling cascades, activation of the immune response and possible accumulation of antimicrobial compounds. The experimental part of the study includes the analysis of 15 pepper varieties using PCR and primers of the 25-1 series aimed at identifying potential resistance loci. The obtained amplification profiles were analyzed using gel electrophoresis methods and bioinformatics resources (KEGG, NCBI), which made it possible to preliminarily differentiate the varieties by the degree of possible resistance. The efficiency of using molecular marker approaches in breeding aimed at creating forms resistant to bacterial pathogens is substantiated. The presented results expand the understanding of the genetic basis of resistance in cultivated plants and can be used in applied genetics and plant growing.

Keywords: molecular mechanisms, resistance, *Capsicum annuum* L., bacterial black spot, *Xanthomonas* spp., PCR analysis, primers 25-1, amplification profile, marker-assisted selection, bioinformatics, plant breeding.

Дубина Елена Викторовна

доктор биологических наук, профессор РАН,
ФГБНУ «Федеральный научный центр риса», г. Краснодар
Lenakrug1@rambler.ru

Евтушенко Илья Дмитриевич

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный
университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар
klon2200@bk.ru

Аннотация. Статья посвящена исследованию молекулярных механизмов устойчивости перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) к черной бактериальной пятнистости, возбудителем которой являются бактерии рода *Xanthomonas*. В работе рассмотрены особенности защитных реакций растения на молекулярном уровне, включая участие специфических генов и сигнальных каскадов, активацию иммунного ответа и возможное накопление антимикробных соединений. Экспериментальная часть исследования включает анализ 15 сортов перца с применением ПЦР и праймеров серии 25-1, направленных на выявление потенциальных локусов устойчивости. Полученные амплификационные профили проанализированы с использованием методов гелелектрофореза и биоинформатических ресурсов (KEGG, NCBI), что позволило предварительно дифференцировать сорта по степени возможной устойчивости. Обоснована эффективность применения молекулярно-маркерных подходов в селекции, направленной на создание устойчивых к бактериальным патогенам форм. Представленные результаты расширяют представление о генетических основах устойчивости культурных растений и могут быть использованы в прикладной генетике и растениеводстве.

Ключевые слова: молекулярные механизмы, устойчивость, *Capsicum annuum* L., черная бактериальная пятнистость, *Xanthomonas* spp., ПЦР-анализ, праймеры 25-1, амплификационный профиль, маркерная селекция, биоинформатика, селекция растений.

Введение

Черная бактериальная пятнистость, вызываемая бактериями рода *Xanthomonas* spp., является одной из самых разрушительных болезней, поражающих перец (*Capsicum annuum* L.). Патоген вызывает появление водянистых пятен на листьях, стеблях и плодах, что снижает товарную ценность урожая и может приводить к значительным экономическим потерям. Особенно остро эта проблема стоит в странах с развивающимся сельским хозяйством, где перец занимает важное место в структуре потребления и экспорта [1].

Борьба с бактериальной пятнистостью требует комплексного подхода, включая профилактические агротехнические мероприятия, применение биологических препаратов и, прежде всего, селекцию устойчивых со-

ртов. В этой связи особое значение приобретают исследования, направленные на выявление и использование молекулярных механизмов устойчивости растений к патогенам.

Одним из ключевых компонентов первичного иммунного ответа растения является клеточная стенка, которая служит как физическим, так и биохимическим барьером на пути патогена [2]. Она участвует в запуске сигнальных каскадов, активирующих экспрессию генов, связанных с устойчивостью. Помимо структурных элементов, важную роль играют молекулярные взаимодействия на уровне «растение — патоген», в которых задействованы белки, сигнальные молекулы, вторичные метаболиты и специфические рецепторы, распознающие бактериальные эффекторные белки [3].

Современные исследования показывают, что устойчивость перца к бактериальной пятнистости может быть связана с наличием специфических генов, таких как Bs2 и Bs3, активирующих гиперчувствительный ответ и синтез антимикробных соединений [4, 5]. Кроме того, рецессивные формы устойчивости обеспечивают широкий спектр защиты без выраженной гиперчувствительности, что также представляет интерес для селекции [6].

С внедрением молекулярно-маркерной селекции (MAS) появилась возможность точечной идентификации устойчивых генотипов уже на ранних стадиях развития растений [7]. Это позволяет значительно сократить сроки выведения новых сортов, устойчивых к бактериальным патогенам. Дополнительный импульс в этом направлении дали биоинформатические методы, позволяющие выявлять кандидаты в гены устойчивости на основе анализа аннотированных геномов и баз данных, таких как KEGG [8].

Таким образом, понимание молекулярных основ устойчивости перца к *Xanthomonas* spp. и применение современных геномных подходов открывают новые перспективы в селекции и создании устойчивых сортов, способных эффективно противостоять черной бактериальной пятнистости.

Цель и задачи исследования

Цель исследования — изучить молекулярные механизмы устойчивости *Capsicum annuum* L. к возбудителю черной бактериальной пятнистости (*Xanthomonas* spp.), с акцентом на выявление и характеристику генов устойчивости, а также на применение молекулярных маркеров и биоинформатических подходов для селекции устойчивых форм.

Задачи исследования:

Провести анализ литературных данных, касающихся структуры и функций генов, обеспечивающих устойчивость к бактериальной пятнистости у перца.

Оценить роль клеточной стенки и связанных с ней сигнальных каскадов в формировании защитного ответа у растений.

Выявить ключевые доминантные и рецессивные гены устойчивости (Bs2, Bs3 и др.), участвующие в формировании иммунного ответа.

Рассмотреть возможности применения молекулярных маркеров и технологий MAS (Marker-Assisted Selection) для ускорения селекционного процесса.

Использовать биоинформатические инструменты для поиска и аннотации генов устойчивости в геномах перца с опорой на базы данных (например, KEGG).

Обосновать перспективные направления по созданию новых устойчивых сортов на основе полученных данных.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в 2024 году, на базе лаборатории цифровых, информационных и биотехнологий ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» (г. Краснодар).

Объектом исследования являлись 15 образцов сладкого перца (*Capsicum annuum* L.), отобранных из коллекции 2022 года, зарегистрированной в г. Пущин. Все сорта имели российское происхождение. Перечень исследуемых сортов представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Сорта перца, использованные в исследовании

№	Название	№ ВИР	Происхождение	Место регистрации / Год
1	Факел	3847	Россия	Пущин / 2022
2	Горицвет	3851	Россия	Пущин / 2022
3	Зарево	3901	Россия	Пущин / 2022
4	Зорька	3920	Россия	Пущин / 2022
5	Светлана	3921	Россия	Пущин / 2022
6	Луч	3953	Россия	Пущин / 2022
7	Рассвет	4010	Россия	Пущин / 2022
8	Восход	4047	Россия	Пущин / 2022
9	Аврора	4085	Россия	Пущин / 2022
10	Рассвет 2	4110	Россия	Пущин / 2022
11	Заря	4122	Россия	Пущин / 2022
12	Утренняя звезда	4155	Россия	Пущин / 2022
13	Полярная	4190	Россия	Пущин / 2022
14	Арктика	4210	Россия	Пущин / 2022
15	Полярный свет	4215	Россия	Пущин / 2022

Методы исследования

Молекулярно-генетический анализ. Проводилась экстракция ДНК из молодых листьев исследуемых растений. Для амплификации использовались специализированные праймеры серии 25-1 и 25-2, разработанные для идентификации участков генома, потенциально связанных с устойчивостью к возбудителю черной бактериальной пятнистости (*Xanthomonas* spp.).

ПЦР и гель-электрофорез. ПЦР-продукты разделялись в 2 % агарозном геле, окрашивались бромистым

этидием и визуализировались в УФ-свете. Результаты анализировались на наличие специфических ампликонов, которые могут служить молекулярными маркерами устойчивости.

Биоинформатический анализ. Использовались базы данных KEGG и EnsemblPlants для аннотации предполагаемых локусов и их участия в сигнальных путях иммунного ответа.

Статистическая обработка. Анализ амплификационных данных проводился с использованием R. Для оценки различий между сортами использовались методы кластерного анализа и анализа главных компонент (PCA).

Результаты исследования

Молекулярный анализ 15 образцов сладкого перца (*Capsicum annuum* L.) с использованием праймеров серии **25-1** продемонстрировал наличие различий в амплификационных профилях между исследуемыми линиями. Проведённая ПЦР-амплификация позволила оценить присутствие специфических фрагментов ДНК, потенциально ассоциированных с устойчивостью к возбудителю черной бактериальной пятнистости (*Xanthomonas spp.*), что представляет особую ценность в контексте молекулярно-маркерной селекции.

Обнаруженные ампликоны, преимущественно в диапазоне 300–500 п.н., свидетельствуют о наличии консер-

вативных участков в геномах отдельных сортов, предположительно вовлечённых в формирование защитных реакций. Эти результаты коррелируют с данными, представленными в литературе, согласно которым устойчивость к патогенам рода *Xanthomonas* может быть обусловлена действием как доминантных, так и рецессивных генов, обеспечивающих локальный или системный иммунный ответ [4, 6, 16].

На рисунке представлены типичные результаты электрофореза ПЦР-продуктов, полученных при амплификации с использованием праймеров серии 25-1. У ряда образцов (в частности, «Арктика», «Полярный свет», «Рассвет 2») визуализируются чёткие полосы соответствующей длины, что может указывать на наличие целевых локусов. В то же время, у других образцов («Аврора», «Светлана») амплификация либо отсутствовала, либо давала неспецифический профиль, что может быть связано как с отсутствием нужного локуса, так и с мутациями в зонах праймерного связывания.

Полученные данные позволяют выделить два кластера: образцы с положительной амплификацией (предположительно устойчивые) и образцы с отрицательной или слабой амплификацией (предположительно восприимчивые). Эта предварительная классификация нуждается в дальнейшем подтверждении с использованием методов фенотипической оценки и секвенирования ПЦР-продуктов для верификации специфичности полученных фрагментов.

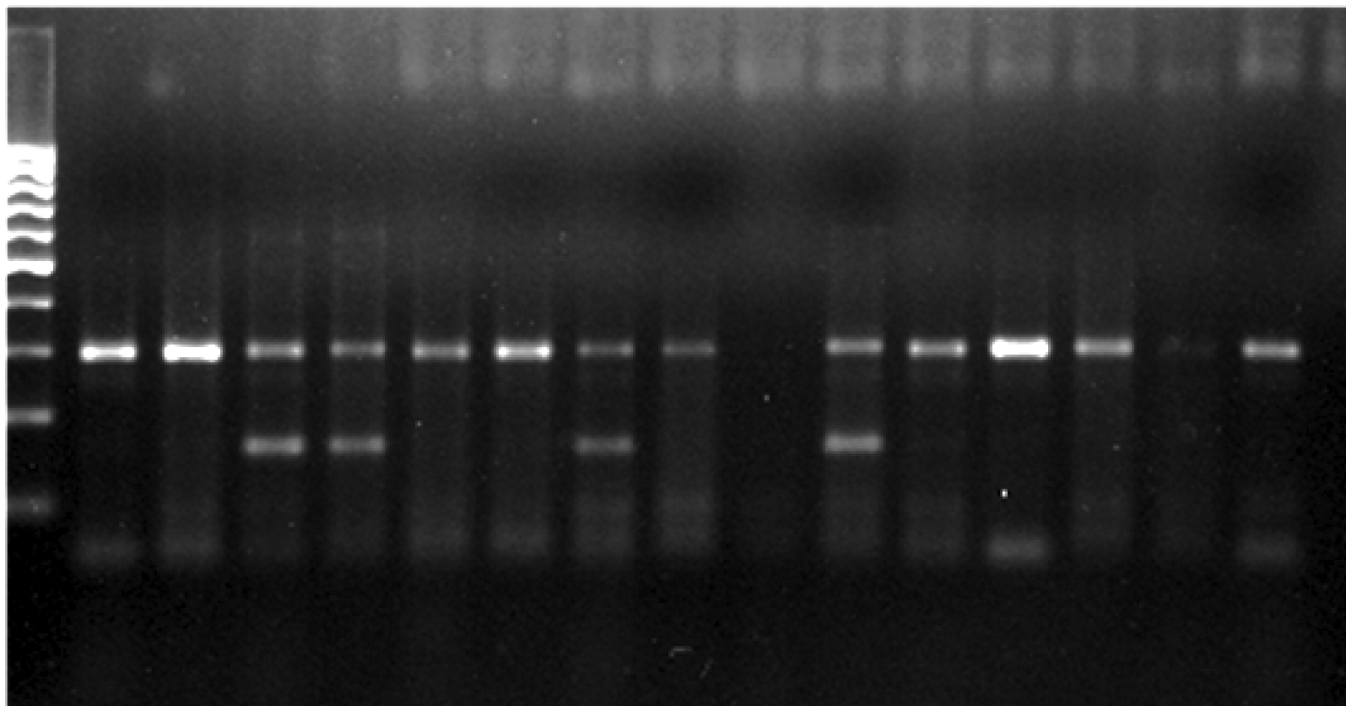


Рис. 1. Результаты ПЦР-амплификации с использованием праймеров серии 25-1 на 15 сортах *Capsicum annuum* L. Маркер — стандарт молекулярной массы 100–1000 п.н.

Таким образом, молекулярные данные, полученные в рамках настоящего исследования, не только демонстрируют эффективность применения праймеров 25-1 в дифференциации образцов, но и закладывают основу для последующего внедрения методик MAS в программы селекции устойчивых сортов перца.

Выводы

В ходе молекулярного анализа 15 сортов *Capsicum annuum* L. с использованием праймеров серии 25-1 были выявлены различия в амплификационных профилях, позволяющие предположить наличие потенциальных локусов устойчивости к возбудителю черной бактериальной пятнистости (*Xanthomonas spp.*). Обнаружение чётких ампликонов у части образцов (в частности, «Арктика», «Полярный свет», «Рассвет 2») позволяет отнести их к потенциально устойчивым формам, что требует

дальнейшего подтверждения фенотипическими методами и секвенированием полученных фрагментов.

Использованная праймерная система показала эффективность для предварительной молекулярной дифференциации исследуемого материала и может быть рекомендована для применения в программах молекулярно-маркерной селекции. Полученные данные формируют основу для разработки набора маркеров, применимых на ранних стадиях отбора, и могут быть использованы для ускорения селекции сортов перца с повышенной устойчивостью к бактериальным патогенам.

Результаты подчёркивают значимость применения комплексного подхода, включающего молекулярно-биологические, биоинформатические и селекционные методы, при изучении механизмов устойчивости культурных растений к фитопатогенам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубина Е.В. ДНК-технологии (молекулярное маркирование) в селекции риса и семеноводстве овощных культур: дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.05. — Краснодар, 2019.
2. Дубина Е.В. и др. Создание новых резистентных форм *Oryza sativa* L. к *Magnaporthe grisea* с использованием методов молекулярного маркирования // Молодой учёный. — 2015. — №9.2 (89.2). — С. 15–19.
3. Мухина Ж.М., Дубина Е.В. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях // В сб.: ДНК-маркеры в растениеводстве. — 2011.
4. Тоцкий И.В., Гордеева Е.И., Кукоева Т.В. и др. Генетическое разнообразие и антиоксидантный потенциал сортов перца сладкого сибирской селекции // Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2021.
5. Тютёрев В.А., Кузнецова Т.В. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням // Вестник защиты растений. — 2015. — №1.
6. Шестакова А.А., Кузнецов А.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Агрохимия. — 2015.
7. Alcantara и др. Ethyl methanesulfonate-induced seed mutagenesis of *Capsicum annuum* // Journal of Heredity. — 1996.
8. Ashrafuzzaman M. et al. Micropropagation of Two Varieties of Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.) // International Journal of Agriculture and Biology. — 2009.
9. Bello L.L. et al. Correlation and Path Coefficient Analysis of Yield and Agronomic Characters among Open Pollinated Maize Varieties and Their F1 Hybrids in a Diallel Cross // Plant. — 2010.
10. Bustos R. et al. Somaclonal Variation in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as Assessed by ISSR Molecular Markers // HortScience. — 2009.
11. Buyukalaca S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media // Plant Cell Reports. — 1996.
12. Buzzy M. et al. Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper by Inhibition of Ethylene Effects // HortScience. — 2006.
13. Buzzy M. et al. In vitro germplasm conservation of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) // HortScience. — 2005.
14. Candole B. et al. Resistance of Chili Pepper Cultivars to Isolates of *Phytophthora capsici* // Plant Disease. — 2010.
15. Castillo F. et al. Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. — 2007.
16. Chandra A. Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania // HortScience. — 1983.
17. Ezura H. Micropropagation of *Capsicum annuum* L. through in vitro culture of hypocotyls // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1997.
18. Fari M. Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of pepper (*Capsicum annuum* L.) // Scientia Horticulturae. — 1986.

© Дубина Елена Викторовна (lenakrug1@rambler.ru); Евтушенко Илья Дмитриевич (klon2200@bk.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»