

Использование молекулярных маркеров для отбора генотипов сахарной свёклы, устойчивых к гетеродерозу

Т.П. ФЕДУЛОВА, д-р биол. наук

Е.А. СЛЕПОКУРОВА, мл. научн. сотрудник

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

Причиной огромных потерь урожая и ухудшения его качества могут стать вредители, болезни и абиотические факторы среды, поэтому изучение генетики устойчивости к ним генотипов сахарной свёклы имеет исключительное значение.

Корневая (галловая) нематода *Meloidogyne* ssp. вызывает в основном корневое угнетение. Галловые нематоды провоцируют гниение головок корнеплодов и образование корневых галлов на главных и придаточных корнях. Поскольку применение химических средств, убивающих растительных нематод, нематоцидов ограничено по соображениям, касающихся охраны окружающей среды, современные методы контроля над нематодами включают в себя ротацию культур с использованием, например, *Raphanus Sativus* var. *oleiformis*. Однако наиболее верная стратегия — это селекция устойчивых гибридов на генетической основе [1–3].

Установлено, что гены, обеспечивающие устойчивость к нематоду, отсутствуют у возделываемых гибридов сахарной свёклы. Устойчивость к галловой нематоду впервые была выявлена у морской свёклы (*B. vulgaris* ssp. *maritima* L.) и далее интрогрессирована в культурную сахарную свёклу (*Beta vulgaris* L.). Моновалентную устойчивость к нематоду у сахарной свёклы удалось получить путём введения в сахарную свёклу генов от трёх диплоидных диких видов (*B. procumbens*, *B. patellaris* и *B. webbiana*). Сорта, несущие транслокацию, характеризовались потерями урожая и ухудшением его качества, поэтому предпринимались попытки изолировать гены устойчивости для переноса их в линии сахарной свёклы с высокой селекционной ценностью. Некоторые молекулярные маркеры, отобранные в транслокациях дикого вида *B. procumbens*,

являлись повторами, гибридизующимися исключительно с ДНК дикой свёклы, что делало их идеальными пробами для фингерпринтинга различных селекционных линий и отбора транслокационно-специфических клонов из геномных библиотек [4–7]. В связи с этим значительный интерес и актуальность представляет изучение гена устойчивости к гетеродерозу, его генетические вариации в различных генотипах сахарной свёклы.

Материалы и методы

Для проведения молекулярно-генетических экспериментов использовали зелёную массу двухнедельных проростков растений сахарной свёклы (МС-формы, сростноплодные опылители ОП, гибриды отечественной и иностранной селекции). Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 20 % SDS и 3,5 М ацетата аммония, а также наборами для выделения ДНК (ООО «Синтол») [8]. Качество выделенной ДНК было определено путём электрофореза в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Полученная ДНК растворялась в 10 мМ трис-НСl-буфера, pH 7,8, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, и использовалась для проведения ПЦР-анализа. Классическая полимеразно-цепная реакция была поставлена на амплификаторе «Genius» (Великобритания).

В работе был применён специфический маркер ModNemF/R для выявления гена устойчивости к нематодам [6]:

ModNemF 5' CGAGCTGCTTGACGGGTTGTC 3/
ModNemR 5' TCCTCAGAATTGCTGAAG 3'.

Секвенирование осуществляли методом Сэнгера на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (ООО «Евроген»).

Результаты и обсуждение

Для профилактики инфицирования нематодами при посеве сахарной свёклы необходимо использовать генотипы, устойчивые к болезни, вызываемой данными возбудителями. Известно, что эффективные источники устойчивости к болезням у культурных растений, как правило, представлены популяциями из геноцентров эволюции культуры. И для понимания генетических основ формирования толерантности представляет интерес изучение дикой формы свёклы *B. corolliflora* Zoss., обладающей полигенной устойчивостью к болезням [9].

Амплификацию ДНК растений сахарной свёклы на наличие гена устойчивости к галловым нематодам проводили с использованием пары специфических праймеров к гену *R6m-1* ModNemF/R. В результате проведения полимеразно-цепной реакции установлено, что не у всех изучаемых генотипов сахарной свёклы обнаружен искомый участок гена устойчивости к галловой нематоды. Так, у образцов № 6 (ОП 19179) и № 8 (Митика) не было выявлено ДНК-ампликонов. У остальных изученных материалов был обнаружен ПЦР-продукт размером ~500 п. н., что соответствует размеру искомого участка гена (рис. 1).

Среди образцов, в которых обнаружен ожидаемый ПЦР-продукт, присутствуют как устойчивые, так и чувствительные растения. Объясняется это наличием в генотипах определённых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене *R6m-1*. Для выявления молекулярно-генетических вариаций некоторые образцы были отсекументированы и выравнены по нуклеотидным последовательностям в программе Geneious Prime (рис. 2).

В результате генетического анализа описаны несколько SNPs (C/T, G/T, G/C, G/A), вставки

(—/G, —/C) и делеции (A/—) как в геноме отечественных генотипов (позиционируемые как устойчивые), так и в иностранных селекционных материалах. Если сравнить последовательности участков ДНК геномов из базы данных NCBI (на фото — Nem06 F) и растения *B. corolliflora* Zoss. (устойчивый генотип по данному признаку) с растениями № 9 (Хамбер), то можно предположить, что именно SNPs C/T и G/T приводят к сбою в работе гена устойчивости. То есть данные однонуклеотидные замены, возможно, инициируют замещение аминокислоты в полипептиде; это приводит к синтезу иного белка или вообще прекращению синтеза (stop codon DNA), что, в свою очередь, вызывает сбой в работе сигнальных, а следовательно, и защитных белков. Игруют ли остальные однонуклеотидные замены, делеции и вставки ключевую роль в формировании устойчивости к данной болезни, будет выявлено при дальнейшем генетическом анализе.

Заключение

Молекулярно-генетическое исследование гена устойчивости к нематодам *R6m-1* (ПЦР-анализ, секвенирование) позволило выявить делеции, инсерции и однонуклеотидные замены (C/T, G/T, G/C), которые, возможно, и приводят к модификации гена, замещая исходную аминокислоту. Исходя из результатов биоинформационного анализа, можно предположить, что по наличию определённых полиморфизмов (SNPs) в исследуемом гене сахарной свёклы с большой долей вероятности можно судить об устойчивости изучаемых селекционных материалов к воздействию нематод.

Генетический контроль устойчивости сахарной свёклы ко всем вредителям и болезням изучить пока не удалось, однако селекция на устойчивость к ним продолжается. Она основывается на молекулярном анализе коллекции образцов дикой и культурной свёклы, оценке их устойчивости, выделении и использовании устойчивых форм для гибридизации с целью повышения устойчивости гибридов сахарной свёклы. Представленные экспериментальные исследования имеют значительный теоретический и практический интерес для селекции устойчивых к гетерозису гибридов данной культуры.

Список литературы

1. Reuther, M. Nematode-tolerant sugar beet varieties — resistant or susceptible to the Beet Cyst Nematode *Heterodera schachtii*? / M. Reuther, Ch. Lang, M.W. Grundler // Sugar Industry. — 2017. — No. 5. — 142. — P. 277–284. DOI: 10.36961/si18397.
2. Ghaemir, R. Molecular insights into the compatible and incompatible interactions between sugar beet and the beet cyst nematode / R. Ghaemir, E. Pourjam, N. Safaie //

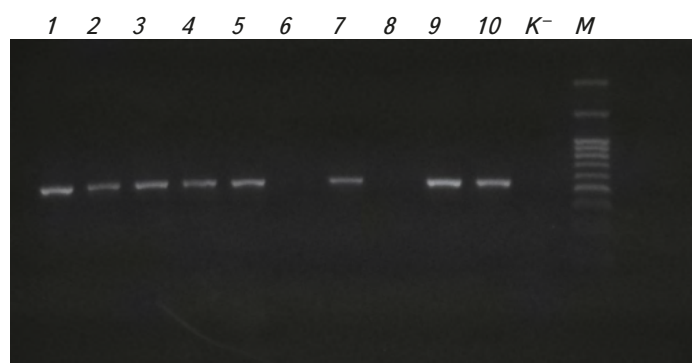


Рис. 1. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с применением праймера ModNemF/R. Обозначения образцов: 1 — F119170; 2 — F119176; 3 — MC10039; 4 — MC11018; 5 — ОП19172; 6 — ОП19179; 7 — Шаннон; 8 — Митика; 9 — Хамбер; 10 — *B. corolliflora* Zoss. M — маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США), K⁻ — ПЦР-смесь без ДНК

Рис. 2. Результат выравнивания нуклеотидных последовательностей образцов № 1, 2, 3, 4, 9, 10

Мы знаем о сахаре всё!

А вы?



BMC Plant Biology. — 2020. — No. 20. — 483. — P. 3–16. doi. 10.1186/s12870-020-02706-8.

3. Weiland, J. A Cleaved Amplified Polimorphic Sequence (CAPS) Marker Associated with Root-Knot Nematode Resistance in Sugar beet / J. Weiland, M. Yu // Crop Sci. — 2003. — № 43. P. 1814–1818.

4. Klein, M. Evaluation of nematode-resistance sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis / M. Klein, H. Voss, D. Cai, C. Jung // Theor. Appl. Genet. — 1998. — № 97. — P. 896–904.

5. Yu, M.H. The Sea Beet Source of Resistance to Multiple Species of Root-Knot Nematode / M.H. Yu, W. Heijbroek, L.M. Pakish / Euphytica. — 1999. — 108. — P. 151–155.

6. Bakooie, M. Development of an SNP Marker for Sugar Beet Resistance/Susceptible Genotyping to Root-Knot Nematode / M. Bakooie, E. Pourjam, S. Mahmoudi, Safaie, Naderpour M. // J. Agr. Sci. Tech. — 2015. — 17. — P. 443–454.

7. Mahuku, G.S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA / G.S. Mahuku // Plant Mol. Biol. Rep. — 2004. — № 22. — P. 71–81. doi.org/10.1007/BF02773351.

8. Luterbacher, M.C. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm / M.C. Luterbacher

[et al.] // Euphytica. — 2005. — № 141. — P. 49–63. DOI: 10.1007/s10681-005-5231-y.

9. Monteiro, F. Genetic and Genomic Tools to Assist Sugar Beet Improvement: The Value of the Crop Wild Relatives / F. Monteiro [et al.] // Front Plant Sci. — 2018. — № 9. — P. 74. doi.org/10.3389/fpls.2018.00074.

Аннотация. Молекулярно-генетическими методами исследован ген *R6m-1*, локализованный на 1 хромосоме сахарной свёклы и контролирующий устойчивость растений к нематодам. Для проведения ПЦР-анализа использована специфическая пара праймеров: ModNemF/R. У образцов, толерантных к воздействию галловых нематод, в гене обнаружены нуклеотидные замены, которые предположительно и формируют устойчивость растений, кодируя «другую» аминокислоту в полипептидной цепи.
Ключевые слова: сахарная свёкла, нематоды, ген устойчивости, ПЦР-анализ, молекулярно-генетические маркеры.

Summary. The *R6m-1* gene, localized on chromosome 1 of sugar beet and controlling plant resistance to nematodes by molecular genetics methods was studied. A specific primer ModNemF/R for PCR analysis was used. In accessions tolerant to root-knot nematodes, single nucleotide polymorphism were found in the gene, which, presumably, form plant resistance, coding for a «different» amino acid in the polypeptide chain.

Keywords: sugar beet, nematoda, resistance gene, PCR, molecular-genetics marker.