

Вариации гена *SE2 Beta vulgaris* L.^s

Т.П. ФЕДУЛОВА, д-р биол. наук, вед. научн. сотрудник (e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

А.С. ФОМИНА, мл. научн. сотрудник

А.А. НАЛБАНДЯН, канд. биол. наук, ст. научн. сотрудник

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

Введение

Сахарная свёкла подвергается различным болезням. Загнивание корнеплодов в кагатах происходит под действием не одного какого-либо возбудителя, в этом процессе принимают участие многие виды грибов и бактерий. Преобладание того или иного вида зависит от многих факторов [1]. Микробиологическое разрушение свекловичной ткани приводит к кагатной гнили, основными возбудителями которой являются плесневые грибы рода *Fusarium*. Фузариоз — заболевание, вызываемое представителями этого рода, проявляется образованием на поверхности корня (главным образом в верхней его части) мицелия розового или жёлтого цвета.

Fusarium oxysporum является одним из разрушительных патогенных микроорганизмов, вызывающих значительные потери урожая сахарной свёклы, и поэтому выявление устойчивых форм культуры имеет решающее значение для селекции. Большую проблему для сахарной свёклы представляют такие заболевания, как фузариозное увядание и фузариозная корневая гниль, вызываемые широко распространёнными и вредоносными грибами *F. oxysporum* и *F. solani* [2]. Известно, что ключевую роль в иммунных реакциях растений играют гены устойчивости (*R*-гены). Подбор молекулярно-генетических маркеров к *R*-генам для выявления устойчивых генотипов достаточно сложен, так как устойчивость к данному заболеванию характеризуется полигенным наследованием (QTL) и находится под контролем многих генов, расположенных в разных группах сцепления [3–5]. У растений формируется и опосредованный ответ на воздействие неблагоприятных биотических факторов. Так, для противостояния различным патогенным организмам, продуцирующим хитин, растения экспрессируют хитиназу, являющуюся катализатором деградации хитина, что приводит к обезвреживанию патогена. Несмотря на отсутствие генов-кандидатов для этой культуры, опосредованные гены устойчивости, например отвечающие за работу хитиназ, могут быть ключевыми для идентификации генов устойчивости к фузариозу сахарной свёклы [6]. Активность изоферментов хитиназы (ЕС 3.2.1.14) коррелирует с патоген-

ной инфекцией и, следовательно, может играть важную роль в механизмах защиты растений в клетках корня или листьев против различных фитопатогенов, включая *F. oxysporum*. Так, в листьях сахарной свёклы были идентифицированы две изоформы кислой хитиназы — *SE1* и *SE2*, но только одна из них, *SE2*, проявляет экзохитиназную активность и способна эффективно гидролизовать хитоолигосахариды. Подобно *SE2* гликозилированная изоформа хитиназы *SP2* также способна участвовать в процессах защиты сахарной свёклы от фитопатогенов [7]. Кислые хитиназы заслужили пристальное внимание в связи с их эффективностью в широком диапазоне применения, в том числе в качестве биоконтролирующего средства против растительных патогенных грибов [8, 9].

Методика

Материалом для выявления генов устойчивости к биотическим стрессорам служили растения сахарной свёклы отечественной и зарубежной селекции. Семена анализируемых образцов *Beta vulgaris* L. выращивали в горшках диаметром 15 см, заполненных грунтом, при комнатной температуре. Для эксперимента использовали листовой аппарат. Выделение ядерной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 20 % SDS и 3,5 М ацетата аммония, а также наборов для выделения ДНК (ООО «Синтол») [10]. Качество выделенной ДНК было определено путём электрофореза в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК растворялась в 10 мМ трис-НСl-буфера, pH 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, и использовалась для ПЦР-анализа. Классическая полимеразно-цепная реакция была проведена на амплификаторе «Genius» (Великобритания). Условия проведения ПЦР-реакции оптимизировали в соответствии с характеристиками используемых праймеров. В работе был применён специфический праймер FusA1 F/R на ген, контролирующий работу кислой хитиназы (F: AGCTACCTTTGGTAACGGGC3' / R: 5'GCAGTGCTTAAGCTGGCATC3') [11]. Праймер сконструирован в программе Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Секвенирование полученных ПЦР-ампликонов проведено

на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Результаты

Для подтверждения связи гена *SE2*, локализованного на хромосоме 3 и контролирующего стабильную экспрессию кислой хитиназы, с устойчивостью сахарной свёклы к корневой гнили проведено генотипирование 10 образцов сахарной свёклы с использованием молекулярного маркера *FusA1 F/R*. Выявлено по 2 ДНК-фрагмента длиной 600 и 400 п. н. во всех исследуемых генотипах, кроме растений дикой свёклы *Beta corolliflora* Zoss. (рис. 1). Это свидетельствует о гетерозиготности образцов по данному локусу, растения же дикой свёклы являются устойчивыми гомозиготами. Дикие формы культурных растений традиционно вызывают интерес у селекционеров при отборе на устойчивость к болезням, так как являются носителями аутосомной доминанты и при расщеплении будут сохранять её. Гетерозиготы же образуют гаметы, из которых часть будет носителем рецессивных аллелей, часть — доминантных.

Для более детального изучения и выявления новых однонуклеотидных замен (SNPs) некоторые ампликоны (№ 1, 9, 10) были просеквенированы по методу Сэнгера.

Результаты прочтения нуклеотидных последовательностей обнаруженных ДНК-фрагментов были

проанализированы в программе SnapGene. При выравнивании нуклеотидных последовательностей исследуемых генотипов с геном контрольного устойчивого генотипа (GenBank № HQ709091.1 NCBI) в селекционном № 9 (гибрид иностранной селекции, Sh.1) было обнаружено 8 SNPs (3 (Т/С, 2 С/Г, А/Г, Г/А, С/Т) и 3 однонуклеотидные вставки (нуклеотид А) в сравнении с растениями дикого вида *B. corolliflora* Zoss. и образцом № 1 (F₁19170), которые позиционируются как селекционные материалы, устойчивые к фузариозной гнили. Примечательно, что данный генотип (Sh.1) и в полевых, и в лабораторных условиях проявлял признаки заражённости. На рис. 2 представлен фрагмент генетического анализа по Сэнгеру, где наглядно продемонстрировано положение вышеописанных однонуклеотидных замен и вставок.

Таким образом, основываясь на результатах молекулярно-генетических исследований, можно предположить, что идентифицированные нами однонуклеотидные замены являются nonsynonimus, т. е. кодируют другую аминокислоту, что ведёт к изменениям в аминокислотном составе пептида. Следствием этого является экспрессия функционально иного белка и инактивация исходного.

Выводы

В результате молекулярно-генетических исследований гена *SE2* (контролирующего работу кислой хитиназы) идентифицированы 8 однонуклеотидных замен (3 Т/С, 2 С/Г, А/Г, Г/А, С/Т) и 3 однонуклеотидные вставки (нуклеотид А) в селекционном № 9 (Sh.1). Можно заключить, что данные однонуклеотидные замены могут приводить к преодолению устойчивости (путём замены аминокислотной единицы в полипептиде) и, как следствие, снижению адаптационной способности растений. Таким образом, созданный нами праймер *Fus1F/R* можно рекомендовать для оценки селекционного материала сахарной свёклы на устойчивость к фузариозной гнили.

Список литературы

1. Kagami, H. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / H. Kagami, M. Kurata, H. Matsuhira // *Methods Mol. Biol.* — 2015. — V. 1223. — P. 335–347.
2. Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* in sugar beet / De C. Lucchi, P. Stevanato, L. Hanson [et al.] // *Euphytica*. — 2017. — V. 213:71.
3. Francis, S. Exploitation of novel sources of disease resistance in Beta germplasm using molecular markers / S. Francis, M. Asher // *J Sugar Beet*. — 2000. — V. 37. — P. 89–95.
4. Fank, A. Nucleotide-binding resistance gene signatures in sugar beet, insights from a new reference genome /

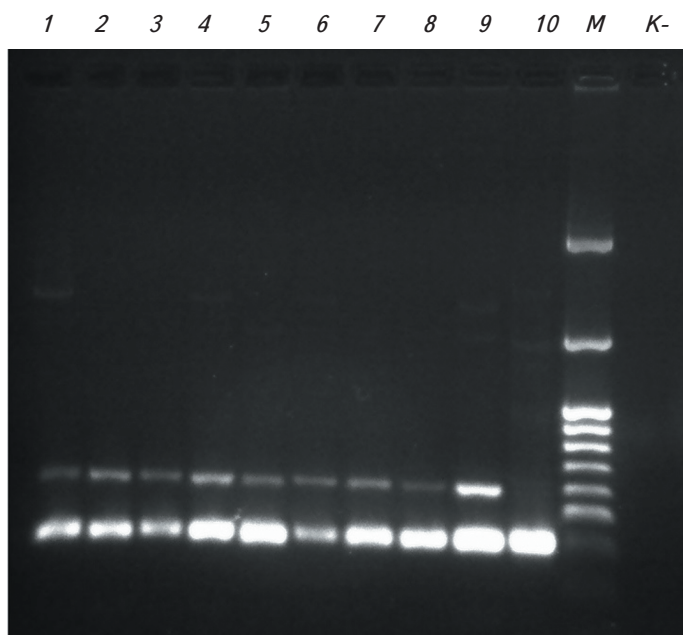


Рис. 1. ПЦР-фрагменты, полученные с праймером *FusA1 F/R*. Обозначения образцов: 1 – F₁19170, 2 – F₁19176, 3 – MC10039, 4 – MC11018, 5 – ОП19172, 6 – ОП19179, 7 – H.1, 8 – M.1, 9 – Sh.1, 10 – дикая свёкла *B. corolliflora* Zoss., M – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США), K – (ПЦР-смесь без ДНК)

Identity

1. BvSE2 2F 2R
2. Ген F405;_FusA F;_C5
3. Ген F600;_FusA F;_C4
4. Ген FD;_FusA F;_G4
5. Ген Ш405;_FusA F;_A5
6. Ген Ш600;_FusA F;_E4

Identity

1. BvSE2 2F 2R
2. Ген F405;_FusA F;_C5
3. Ген F600;_FusA F;_C4
4. Ген FD;_FusA F;_G4
5. Ген Ш405;_FusA F;_A5
6. Ген Ш600;_FusA F;_E4

Identity

1. BvSE2 2F 2R
2. Ген F405;_FusA F;_C5
3. Ген F600;_FusA F;_C4
4. Ген FD;_FusA F;_G4
5. Ген Ш405;_FusA F;_A5
6. Ген Ш600;_FusA F;_E4

Identity

1. BvSE2 2F 2R
2. Ген F405;_FusA F;_C5
3. Ген F600;_FusA F;_C4
4. Ген FD;_FusA F;_G4
5. Ген Ш405;_FusA F;_A5
6. Ген Ш600;_FusA F;_E4

Рис. 2. Фрагмент локализации SNPs в генотипах: F119170 (на фото № 2, 3), Sh.1 (на фото № 5, 6) и *B. corolliflora* Zoss. (на фото № 4)

A. Fank, P. Galewski, M. McGrath // The Plant Journal. — 2018. — V. 95. — P. 659–671.

5. Urbach, J. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events / J. Urbach, F. Ausubel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2017. — V. 114. — P. 1063–1068.

6. Sekhwal, M. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants / M. Sekhwal, L.P. Pingchuan, I. Lam [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2015. — V. 16. — P. 19248–19290.

7. Yezhebayeva, R. Two sugar beet chitinase genes, BvSP2 and BvSE2, analysed with SNP Amplifluor-like markers, are highly expressed after Fusarium root rot inoculation and field susceptibility trial / R. Yezhebayeva, A. Abekova, K. Konyzbekov [et al.] // Peer J. — 2018. — V. 6. — P. 2–19.

8. Nagpure, A. Chitinases: in agriculture and human healthcare / A. Nagpure, B. Choudhary, R. Gupta // Critical Reviews in Biotechnology. — 2014. — V. 34. — Is. 3. — P. 215–232.

9. Walker, J.C. Plant Pathology. Third Edition / J.C. Walker. — NY: McGraw-Hill Book, 1969.

10. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, N.N. Bogacheva // Russian Agricultural Sciences. — 2014. — V. 40. — Is. 3. — P. 177–178.

11. Basic local alignment search tool / S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. Myers // J. Mol. Biol. — 1990. — V. 215(3). — P. 403–410.

Аннотация. Цель работы – конструирование и апробация специфического праймера FusA1F/R для изучения гена SE2, контролирующего экспрессию кислой хитиназы. Материалом для исследования служили растения сахарной свёклы отечественной и зарубежной селекции. Ген SE2 локализован на хромосоме 3, контролирует стабильный уровень работы кислой хитиназы. Генотипировано 10 образцов сахарной свёклы с использованием молекулярно-генетического маркера FusA1F/R. Были выявлены по 2 ДНК-фрагмента длиной 600 и 400 п. н. во всех исследуемых генотипах, кроме растений дикой свёклы (*Beta corolliflora* Zoss.). Идентифицированы 8 однонуклеотидных замен (3 Т/С, 2 С/Г, А/Г, Г/А, С/Т) и 3 однонуклеотидные вставки (нуклеотид А) в растениях селекционного № 9 (Sh.1).

Ключевые слова: сахарная свёкла, фузариоз, ген устойчивости, однонуклеотидные замены, специфические праймеры.

Summary. The aim of this work is designing and testing a specific primer FusA1F/R for studying the SE2 gene, which controls the expression of acidic chitinase. The material for the study were sugar beet plants of domestic and foreign breeding. The SE2 gene is localized on chromosome 3 and controls a stable level of acidic chitinase activity. 10 sugar beet samples were genotyped using the molecular-genetic marker FusA1F/R. Identified 2 DNA fragments 600 bp and 400 bp in all studied genotypes, except for wild beet plants (*Beta corolliflora* Zoss.). 8 single nucleotide polymorphism (3 T/C, 2 C/G, A/G, G/A, C/T) and 3 single nucleotide insertions (nucleotide A) were identified in plants of breeding № 9 (Sh.1).

Keywords: sugar beet, fusariosis, resistance gene, single nucleotide substitutes, specific primers.