

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ОТБОР СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССОРАМ

А.А. Налбандян, кандидат биологических наук, Т.П. Федулова, доктор биологических наук,
А.С. Хуссейн, кандидат биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова,
396030, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 84
E-mail: arpnal@rambler.ru

Представлены результаты молекулярно-генетических исследований селекционного материала гибридов сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции на наличие генов устойчивости к галловой нематоде, ризомании и мучнистой росе. Тестирование растений проведено с применением метода полимеразной цепной реакции. Гены R6m-1, Rz1 и Rz2, Pm были идентифицированы с помощью 5 одноцепочечных RAPD и 4 аллель-специфичных праймеров. В результате молекулярного скрининга сортообразцов культуры выявлено наличие данных генов устойчивости.

MOLECULAR SELECTION OF *Beta vulgaris* L. BREEDING MATERIALS WITH GENES OF RESISTANCE TO ABIOTIC STRESSES

Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Hussein A.S.

The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Voronezhskaya oblast, Ramonskiy rayon, p. VNIISS, 84
E-mail: arpnal@rambler.ru

In the work, the results of sugar beet breeding materials' molecular-genetic studying for presence of genes of resistance to root-knot nematode, rhizomania and powdery mildew are presented. Testing of plants was conducted using polymerase chain reaction method. The genes R6m-1, Rz1 and Rz2, Pm were identified with the help of 5 one-chain RAPD and 4 allele-specific primers. Aim of the studies is to screen sugar beet varieties for presence of the abovementioned genes of resistance. Domestic and foreign sugar beet hybrids were an object of the studies.

Ключевые слова: нематода, ризомания, мучнистая роса, гены устойчивости, ПЦР, сахарная свекла

Сахарная свекла, как и другие культуры, подвержена воздействию биотических и абиотических факторов среды. Данную культуру поражают преимущественно свекловичная нематода, представитель вида *Heterodera schachtii* Schmidt, а также около 6 видов галловых нематод рода *Meloidogyne* ssp., которые вызывают в основном корневое угнетение [1]. Для выявления локусов, связанных с устойчивостью/чувствительностью к галловой и свекловичной нематодам, были применены методы картирования генома с использованием RFLP, RAPD, SSR и SNP маркеров [2-4]. Основными источниками устойчивости служат дикие виды свеклы. Ранее устойчивость к нематодам идентифицирована у приморской свеклы, затем она была интродуцирована в сахарную свеклу (*Beta vulgaris* L.), в которую ген устойчивости перенесен путем гибридизации с устойчивыми видами *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, *Beta procumbens* и *Beta patellaris* и возвратными скрещиваниями [5]. В потомство F₁ устойчивость передается согласно законам расщепления классической теории наследования, так как обеспечивается деятельностью однокопийного доминантного гена, названного R6m-1. Установлена эффективность действия этого моногена против патогенного влияния 6 различных представителей рода *Meloidogyne* spp. [6]. При наличии данного гена обеспечивается высокий

Key words: nematode, rhizomania, powdery mildew, genes of resistance, PCR, sugar beet

уровень экспрессии защитных белков – ингибиторов протеиназы, с помощью которых вредитель разрушает клеточную оболочку растений. Исследования группы иранских ученых [2] по поиску локализации гена устойчивости привели к конструированию аллель-специфичных праймеров Nem06, NEM06 и nem06, соответствующих локусам, сцепленным с геном устойчивости к корневым нематодам (R6m-1).

Достаточно вредоносная болезнь сахарной свеклы – мучнистая роса. Впервые ген устойчивости к мучнистой росе был выявлен у диких видов *Beta v. ssp. maritima* WB 97 и WB 242 и обозначен как Pm. Устойчивость носила моногенный характер и успешно передавалась культурным видам при скрещивании [7]. Устойчивость, обусловленная экспрессией одного гена, установлена и у других видов растений, в частности, у культурных сортов пшеницы. И в этом случае доминантный ген был привнесен из диких форм злака [8, 9]. Однако при более детальном изучении процессов расщепления селекционного материала сахарной свеклы выявлен также и полигенный (QTL) характер устойчивости к мучнистой росе [10]. Пять основных доминантных генов устойчивости были идентифицированы и обозначены как Pm2, Pm3, Pm4, Pm5 и Pm6. Экспрессия одних генов обозначала полную устойчивость к мучнистой росе; проявление других генов обеспечивало частичную

устойчивость. При помощи SNP-картирования у сахарной свеклы определены доминантные гены, локализованные на 2 и 4 хромосомах и к ним подобраны специфические SNP маркеры [11]. Метод классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет выявить доминантный R-ген *Pm* у сахарной свеклы.

Сахарная свекла поражается и вирусами. Наиболее известная и экономически ощутимая болезнь – ризомания, возбудителем которой служит вирус некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС). Это многокомпонентный вирус с разделенным геномом в виде 4-5 РНК, каждой из которой отведена роль в репродуцировании и трансляции наследственной информации [12]. Переносчик вируса – почвенный гриб *Polymyxa betae*. В США в 1983 г. был идентифицирован доминантный ген устойчивости *Holly* [13]. Было показано, что резистентность / чувствительность генотипов определяется наличием/отсутствием одного или двух из пяти генов с варьирующей экспрессивностью в гетерозиготном состоянии. Гены *Rz1*, *Rz2*, *Rz3*, *Rz4* и *Rz5* локализованы на хромосоме III; *Rz1*, *Rz4* и *Rz5* – аллели одного и того же гена. Гены устойчивости *Rz2* и *Rz3* отдельно или в комбинации могут предотвратить инфекцию ВНПЖС полностью, что позволяет отнести их к самостоятельным единицам. Выделены и секвенированы участки генома растений, локализованные и наследуемые вместе с генами устойчивости к вирусу НПЖС [14-16]. В связи с этим выявление генов устойчивости к биотическим стрессорам в селекционных образцах сахарной свеклы актуально и стало целью нашей работы.

Методика. В качестве материала для исследований на наличие генов устойчивости к описанным болезням использовали растения 6 гибридов сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции: Н7581 – гибрид, Швеция; БО32 4Х (Белоцерковская односемянная 32, тетраплоид), Украина; Р1537 (Рамонский, сахаристый сортотип), Россия; Z67-Z тип (сахаристый сортотип), Германия; Poli (церкоспороустойчивый сортотип), Болгария; 4НН25 – гибрид, США.

Для проведения экспериментов осуществляли экстракцию тотальной ДНК из растительной ткани с применением 8 М ацетата аммония, протеиназы К и 20% SDS [17, 18]. Качество выделенной ДНК определяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученную ДНК, растворенную в 10 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, использовали для ПЦР-анализа. ПЦР осуществляли на амплификаторе «Genius» (Великобритания).

Для проведения амплификации были подобраны следующие параметры: предварительная денатурация: 94°C в течение 5 мин, 33-40 циклов: 94°C – 30 с, отжиг – 30 с; 72°C – 60 с; финальный этап элонгации цепи: 72°C – 5 мин. Визуализация ПЦР-фрагментов проходила под УФ-лучами в трансиллюминаторе Vilber.

Тестирование растений на наличие генов устойчи-

вости к ризомании проводили с помощью следующих одноцепочечных RAPD-праймеров [19]: 1 – OP-AN9:5'-GGGGGAGATG-3', 2 – AB2:2:5'-TGCCGGCTTC-3', 3 – AB3:3:5'-TCTCCGCTTG-3', 4-AB6:15:5'-AGTCGCCCTT-3', 5 – B9:3: 5'-AGCCAGGCTG-3'.

Идентификацию гена устойчивости к корневым нематодам осуществляли при помощи следующего аллель-специфичного праймера [2]: Nem06 F - 5' - TGCCGAGCTGCTTGACGGGTTGTC-3', Nem06 R - 5' - GTTTCGCTCCTCAGAATTGCTGAAG - 3'. Гомо- и гетерозиготность исследуемых образцов также устанавливали аллель-специфичными праймерами [2]: nem06 F - 5' - TGACGGGTTGTCAATATGC-3', nem06 R - 5' - TCCATTTCTGACCTACAATTATT-3', NEM06 F - 5' - AAAGAAAGGGAACTCAAATGTTAG - 3', NEM06 R - 5' - TCAGAATTGCTGAAGGTCATT-3'.

Идентификацию гена устойчивости к мучнистой росе осуществляли при помощи следующего праймера: Pm36 F:5'-GGCACTTACAAGATACCGAACT-3'/ Pm36R:5'-ACTTAGCAGGCATTACCGCA-3'.

Результаты и обсуждение. Для профилактики инфицирования нематодами при посеве сахарной свеклы целесообразно использовать формы, устойчивые к этой болезни. Амплификацию ДНК растений на наличие генов устойчивости к нематодам проводили с использованием аллель-специфичного праймера Nem 06 F/R. Применение ПЦР позволило установить, что не у всех тестируемых гибридов сахарной свеклы выявлены гены устойчивости к галловой нематоде (рис. 1).

1 2 3 4 5 6 M K-

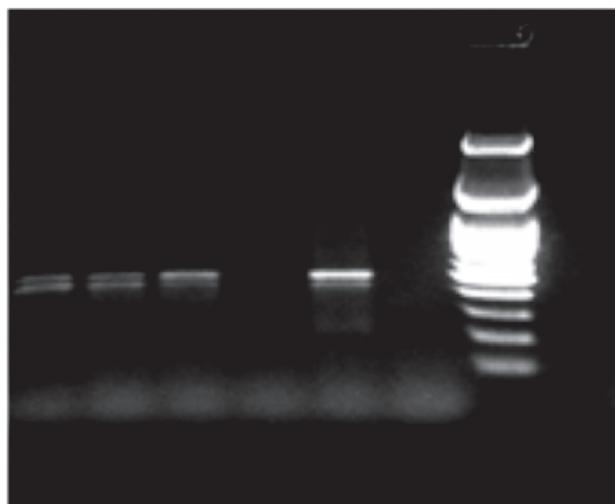


Рис. 1. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с использованием праймера Nem06 F/R. Дорожки (образцы сахарной свеклы): 1 – Н7581, Швеция; 2 – БО32 4Х, Украина; 3 – Р1537, Россия; 4 – Z67-Z-тип, Германия; 5 – Poli, Болгария; 6 – 4НН25, США. М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим), 100-3000 п.н., К – отрицательный контроль (ПЦР – смесь без ДНК).

Только у четырех образцов растений идентифицирован ампликон длиной 600 п.н. (пар нуклеотидов), характерный для гена *Rbt-1* (первый образец – Швеция, Н7581; второй – Украина, Белоцерковская односемянная 32, тетраплоид; третий – Россия, Р1537; четвертый – Болгария, Poli).

Далее с использованием четырех образцов был проведен эксперимент по установлению в них гомозиготных аллелей по этому гену. ПЦР-амплификация не выявила ампликонов длиной 555 и 478 п.н., характерных для устойчивых гомозигот. Это свидетельствует о том, что все генотипы оказались гетерозиготами. Следовательно, при дальнейшем расщеплении селекционный материал образует гаметы с доминантными и рецессивными аллелями в соотношении 4:1 [6].

Тестирование растений на наличие гена устойчивости к мучнистой росе проводили с использованием праймера Pm36 F/R. В связи с этим для первичного отбора относительно устойчивого к мучнистой росе селекционного материала мы использовали специфический праймер к локусу *Pm36*, разработанный нами в системе BLAST, на основе информации международной базы данных биологических публикаций PubMed (NCBI). Этот ген находится на хромосоме 2 и кодирует один из рецепторных бифункциональных TENA-E белков, участвующих в распознавании патогена и активации нисходящих путей защиты в ответ на био- и абиотические стрессы.

Проведение ПЦР с данным молекулярным маркером позволило четко выявить локусы с характерными для них ДНК-фрагментами молекулярной массой 1000 п.н. у 3 образцов сахарной свеклы (Н7581, Швеция; 2 – БО32 4Х, Украина; 3 – Р1537, Россия) (рис. 2).

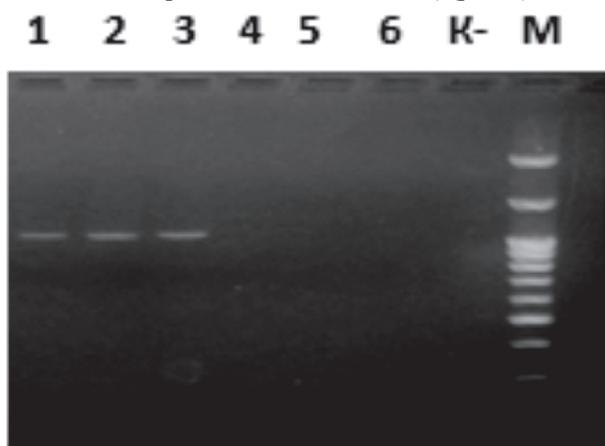


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с использованием праймера Pm36 F/R. Дорожки (образцы сахарной свеклы):
 1 – Н7581, Швеция;
 2 – БО32 4Х, Украина; 3 – Р1537, Россия;
 4 – Z67-Z-тип, Германия; 5 – Poli, Болгария;
 6 – 4НН25, США.
 М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим), 100-3000 п.н. К – отрицательный контроль (ПЦР – смесь без ДНК).

Селекционный материал сахарной свеклы, исследуемый на наличие локусов, связанных с устойчивостью к ризомании, тестировали RAPD-маркерами. Использовали 5 одноцепочечных дека-праймеров: АВ 6-15, ОР-АН9, сцепленные с геном *Rz1* и АВ 2-2, АВ 3-3, АВ 9-3, сцепленные с геном *Rz2*. Наиболее насыщенными по количеству идентифицированных аллелей оказались локусы, обнаруженные при помощи праймеров АВ 6-15 и АВ 2-2.

Так, амплификация с праймером АВ 6-15 позволила выявить по 3 ампликона у всех образцов размером 100, 400 и 2000 п.н. Номера 2 и 3 (БО32 4Х, Украина; Р1537, Россия) характеризовались наличием 4 ПЦР-продуктов (100, 300, 400 и 2000 п.н.). Образец 4 (Z67-Z-тип, Германия) содержал 5 ампликонов (100, 300, 400, 1500 и 2000 п.н.) на локус (рис. 3).

Амплификация с праймером АВ 2-2 позволила выявить 3 ПЦР-фрагмента у номеров 1, 2 и 4 (300, 500 и 1000 п.н.), по 2 ампликона – у образцов 3, 5 и 6 размером 300 и 1000 п.н. на локус. Применение ПЦР с RAPD-праймером ОР-АН9 позволило установить у всех тестируемых гибридов локусы, находящиеся в зоне локализации гена устойчивости *Rz1* (рис. 4). У 3 образцов растений идентифицированы по 3 ампликона длиной 100, 200 и 700 п.н. Номера 4, 5 и 6 имели один ПЦР-продукт длиной 200 п.н.

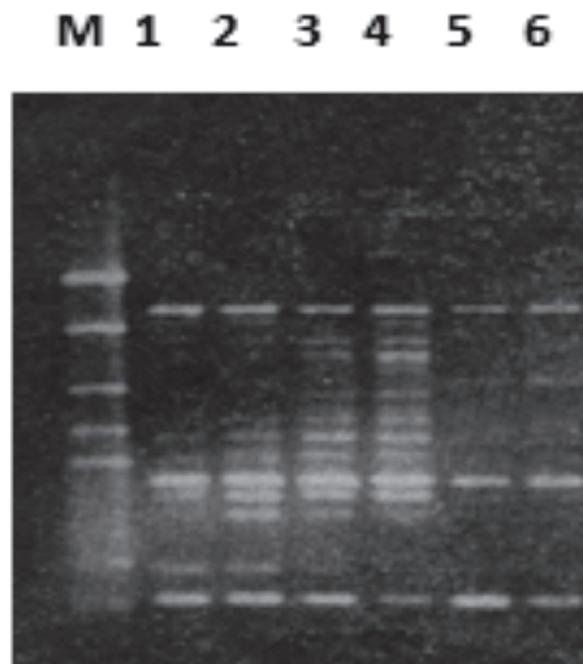


Рис. 3. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с использованием праймера АВ 6-15. Дорожки (образцы сахарной свеклы):
 1 – Н7581, Швеция;
 2 – БО32 4Х, Украина; 3 – Р1537, Россия;
 4 – Z67-Z-тип, Германия; 5 – Poli, Болгария;
 6 – 4НН25, США.
 М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим), 100-3000 п.н.

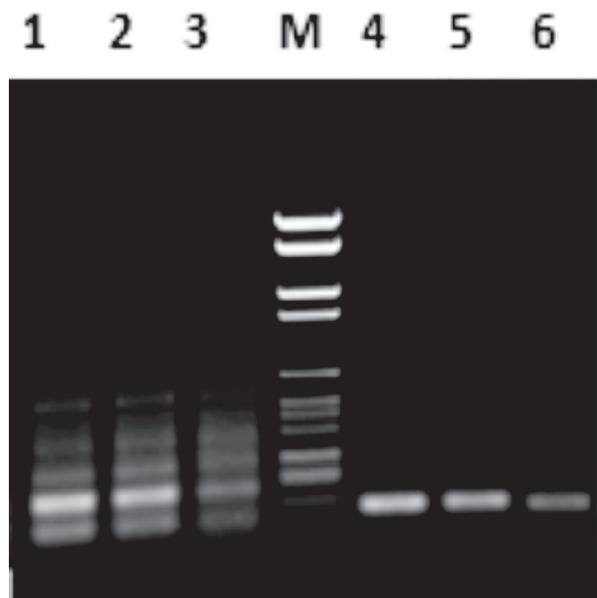


Рис. 4. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с использованием праймера O3-AN9. Дорожки (образцы сахарной свеклы):

1 – Н7581, Швеция;
2 – БО32 4Х, Украина; 3 – Р1537, Россия;
4 – Z67-Z-тип, Германия; 5 – Poli, Болгария;
6 – 4НН25, США.
М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим),
100-3000 п.н.

Амплификация с праймером АВ 9-3 позволила выявить по 3 ПЦР-фрагмента у номеров 1, 2, 3, 4 и 5 (100, 300 и 500 п.н.) и по 2 ампликона – у образцов 3, 5 и 6 (300 и 1000 п.н.). Исключением был образец под номером 6 (4НН25, США), у которого ампликоны, соответствующие спектру праймера АВ 9-3, не обнаружены. У образца под номером 6 при проведении ПЦР-анализа с праймером АВ 3-3 также не выявлено ДНК-фрагментов, соответствующих искомому локусу. Все другие номера характеризовались наличием одного ампликона длиной 700 п.н.

Таким образом, применяемый нами подход при скрининге гибридов сахарной свеклы на устойчивость к нематоду, ризомании и мучнистой росе с использованием специфических и одноцепочечных RAPD-праймеров можно успешно использовать в селекционной практике. Выделены 4 образца растений сахарной свеклы (Украина, Россия, Швеция, Болгария), несущие гены устойчивости к галловой нематоду (*R6m-1*), 6 – к ризомании (*Rz1* и *Rz2*), 3 (Украина, Россия, Швеция) – к мучнистой росе (*Pm36*). Эти растения можно рекомендовать для использования как исходный материал при селекции на устойчивость к болезням.

Результаты проведенных ПЦР-анализов свидетельствуют о необходимости дальнейших молекулярно-генетических исследований для отбора форм сахарной свеклы с повышенной устойчивостью к болезням с целью оптимизации селекционного процесса в целом.

Для более точной классификации генотипов сахарной свеклы (устойчивые/чувствительные) будет проведено дальнейшее изучение селекционного материала этой культуры на экспрессию данных генов с использованием ДНК-маркеров нового поколения (SNP) и с применением генетического секвенирования.

Литература.

1. Yu M.H. Root-Knot Nematode Development and Root-Gall Formation in Sugar Beet // *Journal of Sugar Beet Research*. – 1995. – V. 32. – №1. – P. 47-58.
2. Bakooie M., Pourjam E., Mahmoudi S., Safaie N., Naderpour M. Development of an SNP Marker for Sugar Beet Resistance/Susceptible Genotyping to Root-Knot Nematode // *J. Agr. Sci. Tech.* – 2015. – Vol. 17. – P. 443-454.
3. Gai D., Kleine M., Kifle S., Harloff H. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet // *Science*. – 1997. – V. 275. – P. 832-834.
4. Stevanato P., Trebbi D., Panella L., Richardson K., Broccanello C. Identification and Validation of a SNP Marker Linked to the Gene *HsBvm-1* for Nematode Resistance in Sugar Beet // *Plant Mol Biol Rep.* – 2015. – V. 33. – P. 474-479.
5. Klein M., Voss H., Gai D., Jung C. Evaluation of nematode-resistance sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – V. 97. – P. 896-904.
6. Weiland J., Yu M. A Cleaved Amplified Polimorphic Sequence (CAPS) Marker Associated with Root-Knot Nematode Resistance in Sugarbeet // *Crop Sci.* – 2003. – V. 43. – P. 1814-1818.
7. Lewellen R., Schrandt J. Inheritance of Powdery Mildew Resistance in Sugar Beet Derived from *Beta vulgaris* subsp. *maritima* // *Plant Disease*. – 2001. – V. 85. – № 6. – P. 627-631.
8. Blanco A., Gadaleta A., Cenci A., Carluccio A., Abdelbacki A., Simeone R. Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat // *Theor Appl Genet.* – 2008. – V. 117. – P. 135-142.
9. Petersen S., Lyerly J., Worthihgton M., Parks W., Cowger C., Marshall D., Brown-Guedira G., Murphy J. Mapping of powdery mildew resistance gene *Pm53* introgressed from *Aegilops speltoides* into soft red winter wheat // *Theor Appl Genet.* – 2015. – V. 128 (2). – P. 303-312.
10. Janssen J., Nihlgard M., Kraft Th. Mapping of Resistance Genes to Powdery Mildew (*Erysiphe betae*) in Sugar beet // *1 joint IIRB-ASSBT Congress.* – 2003. – USA. – P. 175-180.
11. Grimmer M. K., Bean M. R., Asher M. J. C. Mapping of five resistance genes to sugar-beet powdery mildew using AFLP and anchored SNP markers // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – V. 115. – P. 67-75.
12. Tamada T. Susceptibility and resistance of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* to foliar rub-inoculation with Beet necrotic yellow vein virus. // *J. Gen Plant Pathology*. – 2007. – V. 73. – P. 76-80.
13. Lewellen R., Skoyen I., Erichsen A. Breeding sugar beet

- for resistance to rhizomania: evaluation of host-plant reaction and selections for and inheritance of resistance. // Proc. Of the 50th Winter Congress of the IIRB. – 1987. – P. 139-156.*
14. Capistano-Gossmann G., Ries D., Holtgrawe D., Minoche A., Kraft T., Frerichmann S., Soerensen T. Crop wild relative populations of *Beta vulgaris* allow direct mapping of agronomically important genes. // *Nature Communication*. – 2017. – V. 8. – P. 1-8.
15. Nouhi A., Amiri R., Hagh N., Saba Jalal, Mesbah M. Use of Molecular Marker for Assay Gene Dosage Resistant Gene to Rhizomania Disease (Rz1) in Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). // *Asian Journal of Biotechnology*. – 2009. – V. 1. – P. 37-41.
15. Litwinec A., Goska M., Kuzdowicz K., Lukanowski A., Skibowska B. Evaluation of rhizomania-resistance segregating sequences and overall genetic diversity pattern among selected accessions of *Beta* and *Patellifolia*. Potential implications of breeding for genetic bottlenecks in terms of rhizomania resistance // *Euphytica*. – 2016. – V. 207. – P. 685-706.
16. Hussein Fedulova Bogacheva A.S., Nalbandyan A.A., T.P., N.N. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis // *Russian Agricultural Sciences*. – 2014. – V. 40. – Issue 3. – P. 177-178.
17. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biologi*. – 1985. – V. 5. – P. 67-69.
17. Amiri R., Mesbah M., Moghaddam M. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. // *Biologia Plantarum*. – 2009. – V. 53 (1). – P. 112-119.

Поступила в редакцию 25.04.18

После доработки 03.09.18

Принята к публикации 24.10.18