ЩЕЛКОВО АГРОХИМ
Эсперо, КС
NEW

УДК 633.63:575.174.015. 3
http://doi.org/10.25802/6345.2022.26.59.001

ОТБОР ГЕНОТИПОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ТОЛЕРАНТНЫХ К ФУЗАРИОЗУ

А.А. Налбандян, кандидат биологических наук
А.С. Фомина, Е.А. Слепокурова
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»
e-mail: arpnal@rambler.ru

Аннотация. *Для изучения гена SE2, ответственного за экспрессию кислой хитиназы при стрессовых ситуациях, и локусов, обеспечивающих устойчивость селекционного материала сахарной свеклы к фузариозной гнили, апробированы специфические праймеры FusA1F/R, 2Ch300F/R и 7Ch310F/R. Материалом для исследования служили гибриды сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции. Для подтверждения связи гена SE2, локализованного на хромосоме 3 и контролирующего стабильный уровень работы кислой хитиназы, с устойчивостью сахарной свеклы к корневой гнили, проведено типирование десяти образцов с использованием молекулярно-генетического маркера FusA1. Выявлены по 2 ДНК-фрагмента длиной 600 п.н. и 400 п.н. во всех исследуемых генотипах, кроме растений дикой свеклы (Beta corolliflora Zoss.). В результате проведенных исследований гена SE2 идентифицированы восемь однонуклеотидных замен (3 T/C, 2 C/G, A/G, G/A, C/T) и 3 однонуклеотидные вставки (нуклеотид A) в растениях гибрида Шаннон по сравнению с устойчивым генотипом. В локусах, кодирующих защитные белки (участки второй и седьмой хромосом) и участвующих в формировании устойчивости к фузариозной гнили, также выявлены SNPs в материалах отечественной и зарубежной селекции. Для анализирования и выравнивания секвенированных последовательностей в работе использовали инструмент Geneious Prime.*

Ключевые слова: *сахарная свекла, фузариоз, ген устойчивости, однонуклеотидный полиморфизм, ПЦР.*

Современные гибриды сахарной свеклы должны отвечать целому ряду требований – обладать полным комплексом хозяйственно-ценных признаков, быть устойчивыми к абиотическим и биотическим стрессорам, которые могут значительно снизить урожайность корнеплодов, уменьшить содержание и выход сахара с гектара посевов. Для создания высокопродуктивных гибридов селекционерам необходим разнообразный исходный материал, отвечающий требованиям сохранности урожая от распространения ряда заболеваний сахарной свеклы, в том числе вызываемых грибами рода *Fusarium*.

Среди исходных форм известны линии, устойчивые к *F. oxysporum*, но генетическая система, которая контролирует развитие болезни, до сих пор неясна. До настоящего времени не сообщалось о генах-кандидатах или локусах количественных признаков (QTL) устойчивости к фитопатогену. Тем не менее, в недавних исследованиях с помощью подхода генов-ортологов было выявлено два аллельных варианта предполагаемых генов устойчивости к *Fusarium oxysporum*. Были идентифицированы две однонуклеотидные замены (SNP), на двух и семи хромосомах, которые позволяют на ранних этапах определять условно устойчивые и чувствительные генотипы [1]. Кроме прямой устойчивости, растения формируют и опосредованный ответ на воздействие неблагоприятных биотических факторов. Известно, что растения для противостояния различным патогенным организмам, продуцирующим хитин, экспрессируют хитиназу – катализатор деградации хитина, что приводит к обезвреживанию патогена [3]. Несмотря на отсутствие генов-кандидатов для этой культуры, опосредованные гены устойчивости, такие как гены кислых хитиназ, могут играть ключевую роль для идентификации истинно генов устойчивости к *Fusarium* у сахарной свеклы. Активность ферментов хитиназы (EC 3.2.1.14) коррелирует с патогенной инфекцией и, следовательно, имеет большое значение в механизмах защиты растений в клетках корня или листьев против *F. oxysporum*.

В листьях сахарной свеклы были идентифицированы две изоформы кислой хитиназы (соответствующие гены: SE1 и SE2), но только одна из них (SE2) проявляет экзохитиназную активность и способна эффективно гидролизовать хитоолигосахариды. Подобно SE2 гликолизированная изоформа хитиназы SP2 также способна участвовать в процессах защиты сахарной свеклы от фитопатогенов [4, 5].

К распространению кагатной гнили, основными возбудителями которой являются грибы рода

Соединяем два различных механизма действия для мощного инсектицидного эффекта
betaren.ru

Fusarium, приводит микробиологическое разрушение свекловичной ткани. Плесневые грибы во время хранения сахарной свеклы могут вызвать фузариоз.

Большую проблему в свекловодстве создают такие заболевания, как фузариозное увядание и фузариозная корневая гниль, вызываемые широко распространенными и вредоносными грибами *F. oxysporum* и *F. solani*. Известно, что у растений ключевую роль в иммунных реакциях 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 [6–8].

В качестве материала для проводимых исследований были взяты растения МС линий сростноплодных опылителей (ОП) гибрида Льговской опытно-селекционной станции и образцов зарубежной селекции: Митика, Шаннон, Кариока (Lion Seeds, Италия). Семена анализируемых образцов *Beta vulgaris L.* выращивали при комнатной температуре. Для эксперимента использовали листовой аппарат пяти растений сахарной свеклы. Когда растения достигали фазы второй пары настоящих листьев, в почву вносили по 5 мкл споровой суспензии *Fusarium oxysporum*, в концентрации 35 тыс. КОЕ/1мл [9]. Геномную ДНК из растительной ткани выделяли модифицированным SDS-методом [10]. Качество выделенной ДНК определяли путем электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК растворялась в 10 мМ трис-HCl-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 праймеров. В работе были использованы следующие специфические праймеры:

FusA1F/R: F:5,AGCTACCTTTGGTAACGGGC3,
R:5,GCAGTGCTTAAGCTGGCATC3,
2Ch300F/R: F: 5,AGTGATTTTTGTGTTATTCCTA3,
R: 5,ATTCCAATCTTCATACTTCTCA3,
7Ch310F/R: F: 5,TGAAAAAGCTACTTGTTGAGGA3,
R: 5,TCTATGGAAGATCTGCATCTAA3,

Праймеры были сконструированы в программе Primer BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Секвенирование полученных ПЦР-ампликонов проведено на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

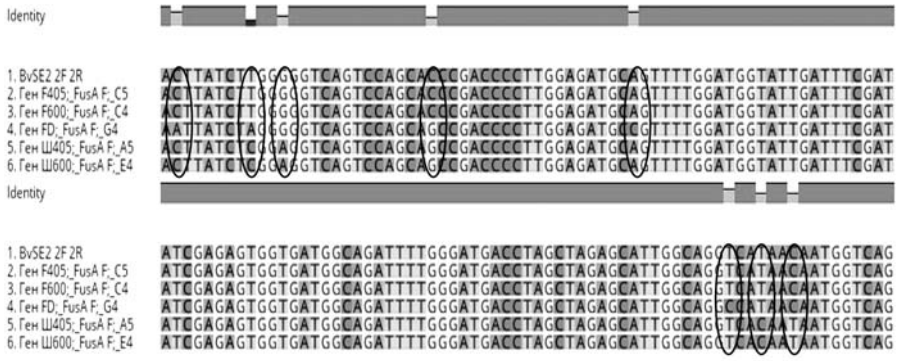

Рисунок 1. Фрагмент локализация SNPs в образцах F119170 (F405), Шаннон (Ш405) и B. corolliflora Zoss. (FD). BvSE2 – контроль

Для подтверждения связи гена SE2, локализованного на третьей хромосоме и контролирующего стабильную экспрессию кислой хитиназы с устойчивостью сахарной свеклы к корневой гнили, проведено генотипирование 10 образцов с использованием молекулярных маркеров FusA1. Для более детального изучения и выявления новых SNPs некоторые ампликоны были просеквенированы.

Результаты прочтения нуклеотидных последовательностей обнаруженных ДНК-фрагментов были проанализированы в программе Geneious Prime. При выравнивании нуклеотидных последовательностей исследуемых генотипов с геном контрольного генотипа (GenBank, Acc. No HQ709091.1, на рис. BvSE2) в гибриде Шаннон (на рис. Ш405) было обнаружено восемь SNPs (3 T/C, 2 C/G, A/G, G/A, C/T) и три однонуклеотидные вставки (нуклеотид A). С ним сравнивали также растения дикой свеклы *B. corolliflora Zoss.* (на рис. FD) и F119170 (на рис. F405), которые позиционируются как селекционные материалы, устойчивые к фузариозной гнили. Примечательно, что растения гибрида Шаннон и в полевых условиях проявляли признаки зараженности. Также в данных генотипах были выявлены новые SNPs в экзоне 10. На рисунке 1 представлен фрагмент генетического анализа по Сэнгеру, где наглядно продемонстрировано положение описанных выше однонуклеотидных замен и вставок.

Можно предположить, что идентифицированные однонуклеотидные замены являются *nonsynonimus* (миссенс-мутации), то есть кодируют другую аминокислоту, что ведет к изменениям в аминокислотном составе белка. Следствием этого может являться экспрессия функционально иного пептида и инактивация исходного.

Группа итальянских ученых [2] определила два локуса, которые играют роль в формировании устойчивости к фузариозной гнили у растений сахарной свеклы. Находятся они на второй и седьмой хромосоме: гены Bv2_043450_zhxk (кодирует белок устойчивости к заболеванию At3g14460, NCBI) и Bv7_171470_ojty (кодирует предполагаемый белок устойчивости к за-

болеванию At4g27190, NCBI) соответственно. К данным локусам нами были сконструированы праймеры: 2Ch300 F/R и 7Ch310 F/R. ДНК десяти генотипов сахарной свеклы была амплифицирована с использованием данных праймеров, полученные ампликоны отсеквенированы по Сэнгеру. В результате прочтения нуклеотидной последовательности шести отсеквенированных фрагментов идентифицированы: одна однонуклеотидная замена (A/C) на участке, амплифицированном с праймером 2Ch300 F/R (рис. 2).

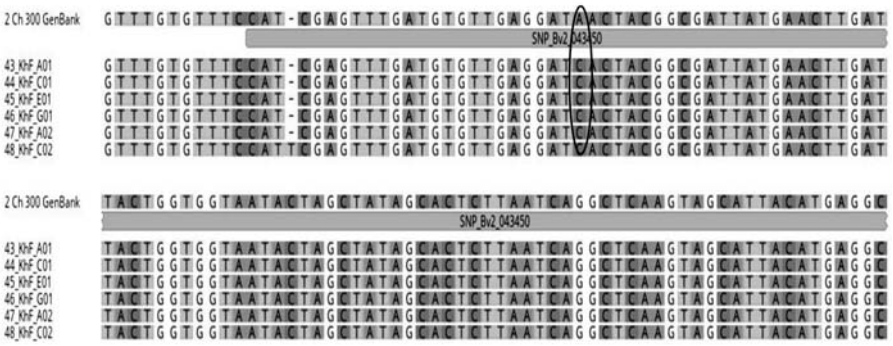

Рисунок 2. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей полученных ДНК-фрагментов

Дорожки: 2Ch 300 – генотип № HQ709091. 1 (GenBank, NCBI), 43 – МС (Льговская ОСС), 44 – Оп 2х (Льговская ОСС), 45 – Оп 4х (Льговская ОСС), 46 – Митика, 47 – Кариока, 48 – гибрид Льговской ОСС.

В результате выравнивания просеквенированных последовательностей идентифицировано 43 SNPs на участке, амплифицированном с праймером 7Ch310 F/R.

Высокополиморфным (изменчивым) оказался тетраплоидный опылитель Льговской селекции, практически все точечные мутации и делеции (хромосомные перестройки) определены в растениях его генотипа (рис. 3). В полевых условиях данные растения также были подвержены поражению фузариозной гнилью.

Дорожки: 7Ch 310 – генотип № HQ709091. 1 (GenBank, NCBI), 49 – МС (Льговская ОСС), 50 – Оп 2х (Льговская ОСС), 51 – Оп 4х (Льговская ОСС), 52 – Митика, 53 – Кариока, 54 – гибрид Льговской селекции.

На данный момент не установлено, являются ли эти однонуклеотидные замены значимыми или silent-мутациями (нейтральными), обнаруживаемыми как вариации в геноме, что требует дальнейшего проведения как молекулярно-генетических, так и полевых исследований.

В результате молекулярно-генетических исследований гена SE2 (контролирует работу кислой хитиназы) идентифицированы восемь однонуклеотидных замен (3 (T/C, 2 C/G, A/G, G/A, C/T) и три вставки (нуклеотид A) в растениях гибрида сахарной свеклы Шаннон (чувствительный генотип). Можно заключить, что данные SNPs могут приводить к преодолению устойчивости (путем замены аминокислотной единицы в полипептиде) и, как следствие, снижению адаптационной способности растений. В локусах (второй и седьмой хромосомы), участвующих в формировании устойчивости к фузариозной гнили, также выявлены SNPs в материалах отечественной селекции и иностранных гибридах. Большим разнообразием характеризовался тетраплоидный опылитель селекции Льговской ОСС (каталожный номер 35). Можно предположить, что данные однонуклеотидные замены могут приводить к преодолению устойчивости (путем замены аминокислотной единицы в полипептиде) и, как следствие, снижению адаптационной способности растений. Таким образом, сконструированные нами праймеры Fus1F/R, 2Ch300 F/R и 7Ch310 F/R можно рекомендовать для предварительной оценки селекционного материала сахарной свеклы на устойчивость к фузариозной гнили. Это имеет важное теоретическое и практическое значение, так как позволяет на ранних этапах селекционного процесса отбирать толерантные к данной болезни генотипы.

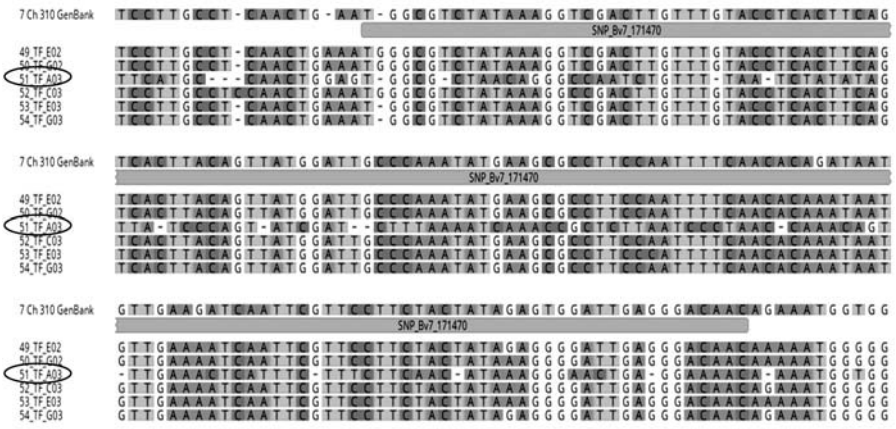

Рисунок 3. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей полученных ДНК-ампликонов

Список литературы

1. Sekhwal, M. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants / M. Sekhwal, Li. Pingchuan, I. Lam, X. Wang, S. Cloutier, F. You // Int. J. Mol. Sci. - 2015. - V.16. - P. 19248-19290.

2. Lucchi, De C. Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* in sugar

ЩЕЛКОВО АГРОХИМ
Эсперо, КС
NEW

beet / De C. Lucchi, P. Stevanato, L. Hanson, J. McGrath, L. Panella, M. De Biaggi, C. Broccanello, M. Bertaggia, L. Sella, G. Concheri // Euphytica. - 2017. - V. 213:71.

3. Larson, R.L. Characterization of protein changes associated with sugar beet (*Beta vulgaris*) resistance and susceptibility to *Fusarium oxysporum* /R.L. Larson, A.L. Hill, A. Nun˜ez // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2007. -V. 55(19). - P. 7905-7915.

4. Nagpure, A. Chitinases: in agriculture and human healthcare /A. Nagpure, B. Choudhary, R. Gupta // Critical Reviews in Biotechnology. - 2014. - V. 34. - Issue 3. - P. 215-232.

5. Yerzhebayeva, 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. Yerzhebayeva, A. Abekova, K. Konysbekov, Sh. Bastaubayeva, A. Kabdrahkmanova, A. Absattrova, Y. Shavrukov // Peer J. - 2018.- V. 6.- P. 2-19.

6. Holmquist, L. Major latex protein-like encoding genes contribute to Rhizoctonia solani defense responses in sugar beet /L. Holmquist, F. Dölfors, J. Fogelqvist, J. Cohn, Th. Kraft, Ch. Dixelius // Molecular Genetics and Genomics.- 2021.- V.296.- P. 155–164.

7. Luterbacher, M.C. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related *Beta* germplasm / M.C. Luterbacher, M.J.C. Asher, W. Beyer, G. Mandolino, O.E. Scholten, L. Frese, E. Biancardi, P. Stevanato, W. Mechelke, O. Slyvchenko // Euphytica. - 2005. - V. 141. - P. 49-63.

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

9. Налбандян, А.А. Изучение гена кислой хитиназы SE2 в генотипах сахарной свеклы / А.А. Налбандян, А.С. Хуссейн, Т.П. Федулова, Т.С. Руденко, Н.Р. Михеева, Г.А. Селиванова // Аграрная наука.- 2021. - Т. 348 (4). - С. 88-90.

10. Xia, Y. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean / Y. Xia, F. Chen, Y. Du, Ch. Liu, G. Bu, Y. Xin, B. Liu // Bioscience Reports.- 2019.- Issue 39. BSR20182271.

Selection of sugar beet genotypes tolerant to fusarium

A.A. Nalbandyan, A.S. Fomina, E.A. Slepokurova

Summary. *Specific primers FusA1F/R, 2Ch300F/R and 7Ch310F/R were tested to study the SE2 gene responsible for the expression of acid chitinase in stressful situations and loci that ensure the resistance of sugar beet breeding material to fusarium rot. The materials for the study were hybrids of sugar beet of domestic and foreign selection. To confirm relationship between the SE2 gene localized to the chromosome 3 and controlling steady level of acid chitinase effect, with sugar beet resistance to the root rot, ten sugar beet samples were genotyped using the FusA1 molecular-genetic marker. DNA-fragments of 600 and 400 b.p. in length were revealed in each of the investigated genotypes except plants of wild beet (Beta corolliflora Zoss.). As a result of the conducted studies of the SE2 gene, eight single nucleotide polymorphism (3 T/C, 2 C/G, A/G, G/A, C/T) and 3 single nucleotide inserts (nucleotide A) were identified in plants of the foreign hybrid of Shannon that was compared to a resistant genotype. In the loci coding protective proteins (sites of the second and seventh chromosomes) and taking part in formation of resistance to the fusariose rot, SNPs were registered in domestic breeding materials and foreign hybrids. In the work, Geneious Prime program was used for analysis and alignment of nucleotide sequences.*

Key words: *sugar beet, fusarium, resistance gene, single nucleotide polymorphism, PCR.*

ИНФОРМАЦИЯ

В России начался сезон переработки сахарной свеклы урожая 2022 года

По данным аналитической службы Союзроссахара на 01 августа, в Краснодарском крае началась переработка сахарной свеклы на четырех сахарных заводах. В ближайшие 10 дней ожидается запуск остальных 11 сахарных заводов в Южном федеральном округе.

Учитывая текущее развитие растений сахарной свеклы, объем ее производства в Южном федеральном округе в сезоне 2022/2023 ожидается на уровне 11,5 млн т, а производство свекловичного сахара в регионе может составить 1,5 млн т.

В текущем году площади посевов сахарной свеклы в России увеличились на 2,8 % и составили 1,034 млн га. Объем производства сахарной свеклы в сезоне 2022/2023 прогнозируется на 5 % выше уровня прошлого года, что позволит произвести свекловичного сахара в объемах, обеспечивающих потребности, как внутреннего рынка России, так и стран ЕАЭС.

Союзроссахар

В Минсельхозе определили, кому будут продавать зерно и сахар из госфонда

В Минсельхозе определили, кому будут продаваться зерно и сахар из интервенционного фонда. Фонд формируется в ходе закупочных интервенций: государство закупает продукцию у аграриев, когда цены на рынке низкие, а в случае сильного роста цен – продает. Ранее государственные интервенции проводились только на рынке зерна, в июне 2021 г. было решено сформировать фонд на рынке сахара. Каким предприятиям реализуется продукция, определяет Минсельхоз.

Согласно приказу, пшеница и рожь из госфонда будут реализовываться среди производителей хлебобулочных изделий, а сахар – среди предприятий торговли. Зерно также планируется продавать мукомолам.

Напомним, ранее возможности резервов госфонда были расширены. Так, Правительство получило право принимать решение о продаже сельхозпродукции из госфонда при росте цен на 10 % и выше по сравнению со средней ценой за аналогичные периоды трех предыдущих лет, скорректированной с учетом инфляции.

Парламентская газета