

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ Hs1 К ГЕТЕРОДЕРОЗУ

Ахмад Садун Хуссейн¹
Арpine Артаваздовна Налбандян¹
Михаил Алексеевич Богомолов¹
Татьяна Петровна Федулова¹
Галина Геннадьевна Голева²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова
²Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Проведены исследования с целью апробирования и отбора молекулярно-генетических маркеров, позволяющих идентифицировать ген устойчивости к гетеродерозу (нематоде). В качестве материала для тестирования образцов сахарной свеклы на наличие гена устойчивости к данной болезни использованы растения гибридов сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции. Нематода – представитель типа первичноротых червей, имеющая 4 ювенильные и одну взрослую фазу развития. Для профилактики инфицирования нематодой посевов сахарной свеклы целесообразно использовать формы, устойчивые к данной болезни. В связи с этим тестирование селекционных материалов сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к гетеродерозу является актуальным. Установлено, что устойчивость к нематоде носит моногенный характер. Иностранными авторами на основе RAPD – анализа сконструированы специфические праймеры к фрагментам данного доминантного гена, которые позволяют отбирать устойчивые растения сахарной свеклы. Ген обеспечивает высокий уровень экспрессии белков – ингибиторов протеиназ, с помощью которых вредитель разрушает плотную клеточную оболочку растений. Представлены результаты тестирования селекционного материала сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции на наличие доминантного гена устойчивости к гетеродерозу Hs1, локализованного на третьей хромосоме. Была экстрагирована суммарная ДНК из здорового листового аппарата растений сахарной свеклы, далее проведена полимеразно – цепная реакция. При помощи амплификации, проведенной со специфическим праймером Nem06 F/R, был выявлен данный ген у двух тестируемых номеров с амплифицированным ДНК-фрагментом, длиной 600 п.н., характерным для гена Hs1, контролирующим устойчивость к нематоде. Выделены 2 образца растений сахарной свеклы (Россия, Швеция), несущие ген устойчивости к нематоде. Данные растения можно рекомендовать для использования как исходный материал в селекционном процессе на устойчивость к вредителю – свекловичной нематоде.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: устойчивость, ПЦР, праймер, нематода, сахарная свекла.

IDENTIFICATION OF THE Hs1 HETERODEROSIS RESISTANCE GENE

Ahmad S. Hussein¹
Arpine A. Nalbandyan¹
Mikhail A. Bogomolov¹
Tatiana P. Fedulova¹
Galina G. Goleva²

¹A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar
²Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

The objective of the research was to test and select the molecular genetic markers that allow identifying the heteroderosis (nematode) resistance gene. The material for testing the sugar beet samples for the presence of the gene responsible for the resistance to the disease under discussion included the hybrid plants of sugar beet of domestic and foreign selection. The nematode is a representative of the protostome type of worms, which has 4 juvenile and one adult development stages. In order to prevent the contamination of sugar beet plantings with nematode it is advisable to use resistant forms. Therefore it is crucial to test the breeding material of sugar beet for the presence of heteroderosis resistance genes. It has been determined that the resistance to nematodes is of monogenic character. Based on the RAPD-analysis foreign authors have constructed specific primers to the fragments of this dominant gene that allow selecting the resistant sugar beet plants. The gene provides a high level of expression of

proteinase-inhibiting proteins that help the pest to destroy the thick cell membrane in plants. The authors present the results of testing the breeding material of sugar beet of domestic and foreign selection for the presence of the dominant Hs1 heteroderosis-resistance gene localized on the third chromosome. The total DNA was extracted from the healthy leaf apparatus of sugar beet plants and the polymerase chain reaction was carried out. By amplification with the specific Nem06 F/R primer the gene of interest was identified in two tested accessions with the amplified 600 bp DNA fragment characteristic for the Hs1 gene that controls the resistance to nematodes. The authors have identified two samples of sugar beet plants (of the Russian and Swedish origin) bearing the gene of resistance to nematodes. It can be recommended to use these plants as the source material in the process of selection for the resistance to the sugar beet nematode.

KEY WORDS: resistance, PCR, primer, nematode, sugar beet.

Bведение

В последнее время в связи с широким использованием в производстве иностранных гибридов сахарной свеклы, изменением климата в сторону повышения температуры и влажности, несоблюдением севооборотов, нарушением системы обработки почвы посевы свеклы стали сильно поражаться различными болезнями. Реальную угрозу представляет собой гетеродероз, вызываемый фитопаразитом – свекловичной цистообразующей нематодой *Heterodera schachtii* Schmidt.

Типичными симптомами болезни, вызванной нематодой, являются увядшие листья и метельчатый вид корней. Севооборот малоэффективен, посев таких провокационных культур, как горчица, подсолнечник, тоже не дает достаточной защиты. Внешние симптомы поражения сахарной свеклы нематодой отчетливо проявляются на фоне высокого уровня заражения почвы (более 300 личинок (л) + яиц (я) / 100 см³ почвы), когда подавляющее большинство растений отстает в росте и развитии, листья становятся бледно-зелеными, а в дальнейшем крайние листья желтеют и отмирают.

Сильнейшим проявлением заболевания является полное выпадение растений. Одновременно происходит уменьшение общего количества и площади листьев на растении, содержания в них зеленых пигментов, каротиноидов, фосфорных, азотистых соединений и калия, а также снижение интенсивности фотосинтеза, нарушается регуляция роста и значительно замедляется процесс дыхания.

Целесообразны применение различных профилактических агрономических мер и реальный постоянный мониторинг свекловичных полей. В последнее время крупные агрохолдинги практически не соблюдают севооборот, увеличивают количество полей под сахарную свеклу, занося с посадочным материалом и инфицированные семена [1, 2, 4, 5].

Однако наиболее верная стратегия – это селекция устойчивых сортов на генетической основе. Установлено, что гены, которые обеспечивают устойчивость к гетеродерозу, отсутствуют у возделываемых гибридов сахарной свеклы. Источниками устойчивости являются дикие виды свеклы. В сахарную свеклу ген устойчивости переносится путем гибридизации с устойчивыми видами *Beta procumbens* и *Beta patellaris* и обратными скрещиваниями [3, 7, 8].

Некоторые доминантные гены устойчивости, или R-гены, носят моногенный характер, т.е. наследуются независимо, и их идентификация является относительно более легкой задачей, чем поиск полигенных локусов, наследуемых сцепленно [1].

Для профилактики инфицирования нематодой посевов сахарной свеклы целесообразно использовать формы, устойчивые к данной болезни. В связи с этим тестирование селекционных материалов сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к гетеродерозу является актуальным.

Материалы и методы

В качестве материала для тестирования образцов сахарной свеклы на наличие гена устойчивости к болезни использованы растения гибридов сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции.

Для проведения экспериментов осуществлялась экстракция суммарной ДНК из растительной ткани, с применением 7,5М ацетата аммония [6, 9].

Качество выделенной ДНК определялось электрофорезом в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Далее ДНК, растворенная в 10 мМ трис-HCl-буфере, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, использовалась для ПЦР-анализа. Полимеразно-цепная реакция проводилась на амплификаторе «Genius» (Великобритания).

Идентификация гена устойчивости к гетеродерозу (нематоде) осуществлялась при помощи следующего праймера [5, 10]:

Nem 06 F - 5'-TGCCGAGCTGCTTGACGGGTTGTC-3'

Nem 06 R - 5'-GTTTCGCTCCTCAGAATTGCTGAAG-3'.

Для проведения ПЦР-анализа были выбраны следующие параметры амплификации:

- предварительная денатурация: 94°C в течение 3 минут;
- 30 циклов: 94°C – 30 с; температура отжига 59°C – 30 с; 72°C – 60 с;
- финальный этап элонгации цепи: 72°C – 3 мин.

Визуализация ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле проводилась под воздействием УФ-лучей в трансиллюминаторе.

Результаты и их обсуждение

Для идентификации гена устойчивости был оптимизирован процесс экстракции ДНК, в частности исключено использование высокотоксичных агентов – фенол/хлороформной смеси. Известно, что фенол является высокотоксичным аллергеном. Мы исключили его применение и инактивировали белки 20% додецил сульфатом натрия (SDS). Было увеличено количество промывки супернатанта, затем осуществляли осаждение 7,5М ацетатом аммония. Качество выделенной суммарной ДНК было высоким, достаточным для проведения ПЦР-анализа (рис. 1).

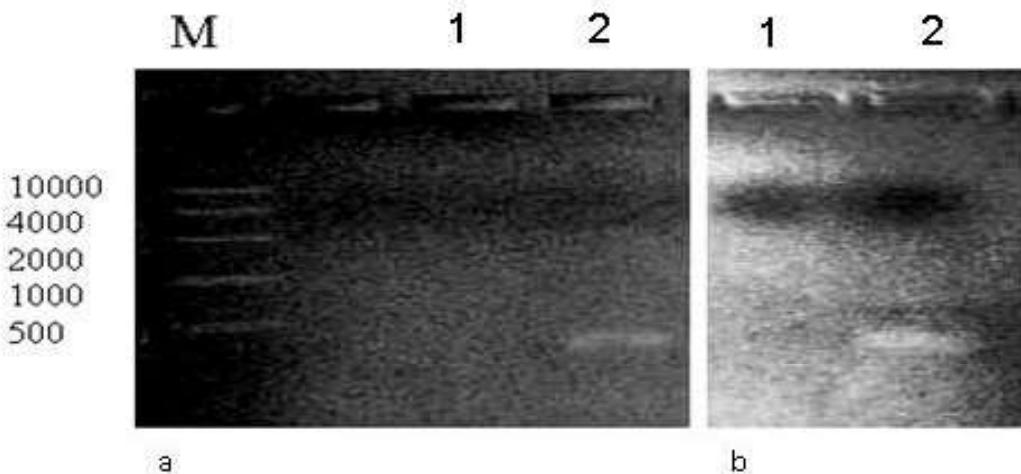


Рис. 1. ПЦР-анализ с праймером Bvv 43:
1, 2 – образцы сахарной свеклы (TK84-ЦМС и TK84-О-тип, Япония),
характеризующиеся соответственно отсутствием/наличием ампликона;
а – ДНК, выделенная фенол/хлороформным методом;
б – ДНК, выделенная по описанному методу;
М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим) 500-10 000 п.н.

Тестирование растений сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к гетеродерозу (нематоде) проводилось с использованием специфического праймера Nem 06 F/R. Применение полимеразно-цепной реакции позволило установить, что не у всех тестируемых гибридов сахарной свеклы выявлены гены устойчивости к нематоде (рис. 2).

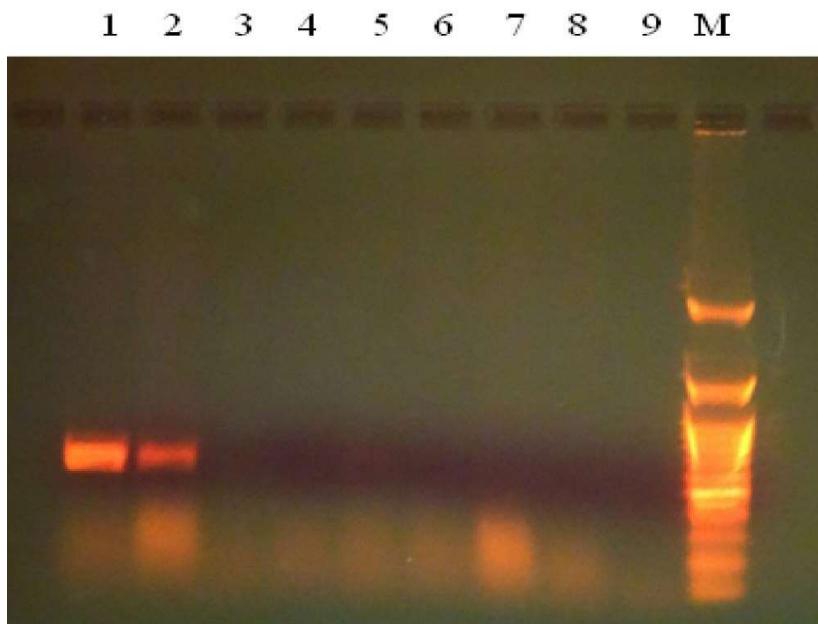


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймера Nem F/R.
Дорожки (образцы сахарной свеклы): 1 – H7581, Швеция; 2 – БО32 4Х, Россия;
3 – Ну А-3, США; 4 – 4 НН25, США; 5 – Z67-2-тип, Германия; 6 – 10502-Fertil, Германия;
7 – ТК84-ЦМС, Япония; 8 – ТК84-О-тип, Япония; К – контроль (-ДНК), (+праймер);
М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим) 100-3000 п.н.

Только у двух образцов растений идентифицирован ампликон, длиной 600 п.н., характерный для гена Hs1 (первый образец – Швеция, H7581 и второй – Россия, Белоцерковская односемянная 32, тетрапloid).

Отобранные селекционные образцы сахарной свеклы, обладающие геном устойчивости к нематоде, могут быть использованы в качестве исходного материала в селекции на устойчивость к данному заболеванию.

Заключение

Проведенные исследования по изучению эффективности специфического праймера Nem06 F/R и тестированию сортообразцов свеклы позволили выявить номера с амплифицированным ДНК-фрагментом, длиной 600 п.н., характерным для гена Hs1, контролирующим устойчивость к нематоде.

Представленные исследования являются поисковыми и будут продолжены в плане увеличения количества изучаемого материала и используемых праймеров. Эти работы имеют как теоретическое, так и практическое значение, так как способствуют расширению молекулярно-генетических знаний об устойчивости селекционного материала сахарной свеклы и позволяют отбирать для селекции новые источники устойчивости к гетеродерозу.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

Библиографический список

1. Тестирование гибридов сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к ризомании / А. Налбандян, А. Хуссейн, А. Корниенко, В. Козловская // Сахарная свекла. – 2016. – № 2. – С. 16-18.
2. Шестеперов А. Свекловичная чистообразующая нематода и ее опасность для сахарной свеклы / А. Шестеперов, К. Перевертин, М. Приданников // Сахарная свекла. – 2017. – № 2. – С. 18-22.
3. A complete physical map of a wild beet (*Beta procumbens*) translocation in sugar beet / D. Schulte, D. Cai, M. Kleine, L. Fan, Sh. Wang, C. Jung // Mol Gen Genomics. – 2006. – DOI 10.1007/s00438-006-0108-x.
4. Chunming B. Gene cloning and gene expression of Hsp90 from *Meloidogyne incognita* under the temperature and heavy metal stress / B. Chunming, C. Yuxi, L. Yifei // International Journal of Agriculture and Biology. – 2014. – Vol. 16. – P. 451-460.
5. Development of an SNP Marker for Sugar Beet Resistance/Susceptible Genotyping to Root-Knot Nematode / M. Bakooie, E. Pourjam, S. Mahmoudi, N. Safaie, M. Naderpour // J. Agr. Sci. Tech. – 2015. – Vol. 17. – P. 443-454.
6. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A. Hussein, A. Nalbandyan, T. Fedulova, N. Bogacheva // Russian Agricultural Sciences. – 2014. – Vol. 40, Issue 3, May. – P. 177-178.
7. Evaluation of nematode-resistance sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis / M. Klein, H. Voss, D. Gai, C. Jung // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 896-904.
8. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet / D. Gai, M. Kleine, S. Kifle, H. Harloff, N. Sandal // Science. – 1997. – Vol. 275. – P. 832-834.
9. Rogers S. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues / S. Rogers, A. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5. – P. 67-69.
10. Weiland J. A Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) Marker Associated with Root-Knot Nematode Resistance in Sugar Beet / J. Weiland, M. Yu // Crop Sci. – 2003. – Vol. 43. – P. 1814-1818.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Ахмад Садун Хуссейн – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российской Федерации, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Арpine Артаваздовна Налбандян – кандидат биологических наук, научный сотрудник, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российской Федерации, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Михаил Алексеевич Богомолов – доктор сельскохозяйственных наук, зав. лабораторией исходного материала, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российской Федерации, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Татьяна Петровна Федулова – доктор биологических наук, зав. лабораторией биохимии и молекулярной биологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российской Федерации, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Галина Геннадьевна Голева – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры селекции и семеноводства, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российской Федерации, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-76-93 (доб. 1269), E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Дата поступления в редакцию 26.05.2017

Дата принятия к печати 08.06.2017

AUTHOR CREDENTIALS

Affiliations

Ahmad S. Hussein – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Scientist, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, VNIIS pos., E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Arpine A. Nalbandyan – Candidate of Biological Sciences, Research Scientist, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, VNIIS pos., E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Mikhail A. Bogomolov – Doctor of Agricultural Sciences, Head of Parent Material Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, VNIIS pos., E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Tatiana P. Fedulova – Doctor of Biological Sciences, Head of Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, VNIIS pos., E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Galina G. Goleva – Candidate of Agricultural Sciences, Docent, the Dept. of Plant and Seed Selection Breeding, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-71-81, E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Date of receipt 26.05.2017

Date of admittance 08.06.2017