

ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ *R6m-1* К КОРНЕВЫМ НЕМАТОДАМ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Арпине Артаваздовна Налбандян¹
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

Одним из серьезных заболеваний, снижающим урожайность корнеплодов сахарной свеклы, является нематодоз, вызываемый разными вредителями – представителями типа первичноротых червей нематод (*Nematoda*). Сахарную свеклу поражает преимущественно свекловичная нематода, представитель вида *Heterodera schachtii* Schmidt, а также около шести видов галловых нематод рода *Meloidogyne* spp., которые вызывают в основном корневое угнетение. Галловые нематоды (*Meloidogyne* spp.) являются одними из тех патогенов сахарной свеклы, которые как прямо, так и косвенно провоцируют гнили головок корнеплодов и образование корневых галлов, приводя к значительным потерям урожая. Отбор и использование культурных генетически устойчивых форм сахарной свеклы в скрещиваниях может привести к сокращению применения химических препаратов против нематод, что, в свою очередь, снизит издержки производства и нагрузку на окружающую среду. Наиболее верная стратегия – это селекция устойчивых сортов и гибридов сахарной свеклы на генетической основе. Представлены результаты молекулярно-генетического тестирования селекционного материала сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции на наличие/отсутствие доминантного гена устойчивости к корневым нематодам *R6m-1*, локализованного на первой хромосоме. Результаты исследований показали, что применяемый подход при скрининге гибридов сахарной свеклы на устойчивость к корневым нематодам может успешно использоваться на практике. Выделены 4 образца растений сахарной свеклы (Украина, Россия, Швеция, Болгария), несущие ген устойчивости к галловой нематоде. Данные растения можно рекомендовать для использования как исходный материал при селекции на устойчивость к болезням. Таким образом, результаты проведенных ПЦР-анализов свидетельствуют о необходимости дальнейшего расширения и углубления молекулярно-генетических исследований для отбора форм сахарной свеклы с повышенной устойчивостью к биотическим стрессам для оптимизации селекционного процесса в целом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полимеразно-цепная реакция (ПЦР), праймеры, сахарная свекла, нематоды, ген устойчивости, гетерозиготы, селекционные материалы.

PCR IDENTIFICATION OF THE *R6m-1* GENE OF SUGAR BEET RESISTANCE TO ROOT-KNOT NEMATODE

Arpine A. Nalbandyan¹
Tatiana P. Fedulova¹
Galina G. Goleva²

¹A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

²Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

One of the serious diseases reducing the sugar beet root yield is nematodosis, which is caused by various pests belonging to the type of protostome nematode worms (*Nematoda*). Sugar beet is mainly affected by the sugar beet nematode (a representative of *Heterodera schachtii* Schmidt species) and about six species of gall nematodes of *Meloidogyne* spp. that cause mainly the root depression. Gall nematodes (*Meloidogyne* spp.) are one of those pathogens of sugar beet that are both a direct and indirect causative agent of crown rot and formation of root galls and lead to significant crop losses. The selection and use of cultivated genetically-resistant forms of sugar beet in crosses can lead to a reduction in the use of chemicals against nematodes, which in turn will reduce the production costs and environmental stress. The most reliable strategy is the selection of resistant varieties and hybrids of sugar beet on a genetic basis. The results of molecular genetic testing of domestic and foreign sugar beet breeding material for the presence/absence of the *R6m-1* dominant gene of resistance to root-knot nematodes, which is localized on the first chromosome are presented. The results of research showed that the approach used for screening the sugar beet hybrids for resistance to root-knot nematodes can be successfully used in practice. Four samples of sugar beet plants (Ukraine, Russia, Sweden, and Bulgaria) bearing the gene of resistance to gall nematode were identified. These plants can be recommended for use as parent material in breeding for disease resistance. Thus, the results of PCR assays indicate the need for further advanced molecular genetic studies for the selection of sugar beet with increased resistance to biotic stresses in order to optimize the breeding process in general.

KEY WORDS: polymerase chain reaction (PCR), primers, sugar beet, nematodes, resistance gene, heterozygotes, breeding materials.

Введение

Серьезным заболеванием, снижающим урожайность корнеплодов сахарной свеклы, является нематодоз, вызываемый разными вредителями – представителями типа первичноротых червей нематод (*Nematoda*). Сахарную свеклу поражает преимущественно свекловичная нематода, представитель вида *Heterodera schachtii* Schmidt, а также около шести видов галловых нематод рода *Meloidogyne* spp., которые вызывают в основном корневое угнетение. Галловые нематоды (*Meloidogyne* spp.) являются одними из тех патогенов сахарной свеклы, которые как прямо, так и косвенно провоцируют гнили головок корнеплодов и образование корневых галлов, приводя к значительным потерям урожая [10].

Распознавание устойчивых генотипов в классических селекционных программах требует много времени и труда, что сегодня является непозволительной роскошью. Селекционный процесс можно ускорить, используя преимущества молекулярной (MAS) селекции. Целесообразно применение молекулярно-генетических маркеров, сцепленных с локусами, ответственными за устойчивость растений к болезни. Сегодня практически во всех свеклосеющих странах молекулярные маркеры широко интегрированы в селекционные программы.

Иностранцами авторами были протестированы RFLP, RAPD, SSR и SNP маркеры на выявление локусов, связанных с устойчивостью/чувствительностью к галловой и свекловичной нематодам [1, 2, 3, 8].

Установлено, что гены, которые обеспечивают устойчивость к корневым нематодам, отсутствуют у возделываемых гибридов сахарной свеклы. Источниками устойчивости являются дикие виды свеклы. Ранее устойчивость к нематодам идентифицирована у приморской свеклы, откуда и была интрогрессирована в сахарную свеклу (*Beta vulgaris* L.). В сахарную свеклу ген устойчивости переносится путем гибридизации с устойчивыми видами *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, *Beta procumbens* и *Beta patellaris* и возвратными скрещиваниями [5, 7]. Продемонстрировано, что в потомство F1 устойчивость передается согласно законам расщепления классической теории наследования, так как обеспечивается деятельностью однокопийного доминантного гена, названного *R6m-1*. Установлена эффективность данного моногена против патогенного влияния шести различных представителей рода *Meloidogyne* spp. [11]. Ген обеспечивает высокий уровень экспрессии защитных белков – ингибиторов протеиназ, с помощью которых вредитель разрушает клеточную оболочку растений.

Исследования группы иранских ученых по поиску локализации гена устойчивости привели к конструированию CAPS маркеров Nem06, NEM06 и nem06, сцепленных с геном устойчивости к корневым нематодам (*R6m-1*) [1].

Отбор и использование культурных генетически устойчивых форм сахарной свеклы в сельскохозяйственных экосистемах может привести к сокращению применения химических препаратов против нематод, что, в свою очередь, снизит издержки производства и нагрузку на окружающую среду. Наиболее верная стратегия – это селекция устойчивых сортов на генетической основе. В связи с этим тестирование селекционных материалов сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к нематодозам является актуальным.

Целью данной работы являлось апробирование и отбор молекулярно-генетических маркеров, позволяющих идентифицировать ген устойчивости к корневым нематодам.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований на наличие генов устойчивости к болезни использованы растения 6 гибридов сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции (см. табл.).

Происхождение исследуемых генотипов сахарной свеклы

№ образца	Образец	Происхождение
1	H7581 (гибрид)	Швеция
2	БО32 4X (Белоцерковская односемянная 32 тетраплоид)	Украина
3	P1537 (Рамонский, сахаристый сортотип)	Россия
4	Z67-Z тип (сахаристый сортотип)	Германия
5	Poli (церкоспороустойчивый сортотип)	Болгария
6	4НН25 (гибрид)	США

Для проведения экспериментов осуществлялось выделение тотальной ДНК из зеленой массы растений, с применением 7,5М ацетата аммония, протеиназы К и 20% SDS [4, 6]. Качество выделенной ДНК определялось электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Полученная ДНК, растворенная в 10 мМтрис-НСI-буфере (ТЕ), содержащем 0,1 мМ ЭДТА, использовалась для проведения полимеразно-цепной реакции. Амплификация проводилась на термоциклере «Genius» (Великобритания).

Для проведения амплификации были подобраны следующие параметры:

- предварительная денатурация: 94°C в течение 5 минут;
- 35 циклов: 94°C – 30 с, температура отжига (59°C) – 30 с, 72°C – 60 с;
- финальный этап элонгации цепи: 72°C – 5 минут.

Визуализация ПЦР-фрагментов происходила под УФ-лучами в трансиллюминаторе Vilber.

Идентификация гена устойчивости к корневым нематодам осуществлялась при помощи следующего аллель-специфичного праймера [1, 9]:

Nem 06 F - 5, -TGCCGAGCTGCTTGACGGGTTGTC- 3,

Nem 06 R - 5, -GTTTCGCTCCTCAGAATTGCTGAAG- 3.

Гомо- и гетерозиготность исследуемых образцов также устанавливалась аллель-специфичными праймерами [1]:

nem06 F - 5, -TGACGGGTTGTCAATATGC- 3,

nem06 R - 5, TCCATTTCTGACCTACAATTATT- 3,

NEM06 F - 5, AAAGAAAGGGAAC TCAAATGTTAG- 3,

NEM06 R - 5, TCAGAATTGCTGAAGGTCATT- 3.

Результаты и их обсуждение

Для профилактики инфицирования нематодами при посеве сахарной свеклы целесообразно использовать формы, устойчивые к данной болезни.

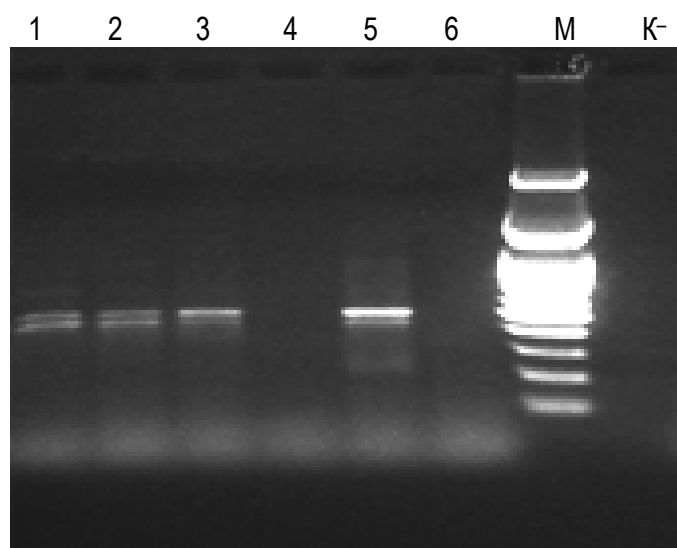


Рис. 1. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймера Nem06 F/R: дорожки (образцы сахарной свеклы): 1 – H7581, Швеция; 2 – БО32 4X, Украина; 3 – P1537, Россия; 4 – Z67-Z-тип, Германия; 5 – Poli, Болгария; 6 – 4НН25, США; М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим) 100–3000 п.н.; К⁻ – отрицательный контроль (без ДНК-образцов)

Амплификация ДНК растений сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к нематодам проводилась с использованием праймера Nem 06 F/R. Применение полимеразно-цепной реакции позволило установить, что не у всех тестируемых гибридов сахарной свеклы выявлены гены устойчивости к галловой нематоды (рис. 1).

Электрофореграммы показывают, что только у четырех образцов растений сахарной свеклы идентифицирован ампликон, длиной 600 п.н., характерный для гена *Rbt-1*: первый образец – Н7581, Швеция; второй – БО32 4Х, Украина; третий – Р1537, Россия; четвертый – Poli, Болгария.

Далее с использованием вышеуказанных четырех образцов и одного неустойчивого генотипа Z67-Z-тип, Германия (№ 1) был проведен эксперимент по установлению в них гомозиготных аллелей по данному гену (рис. 2).

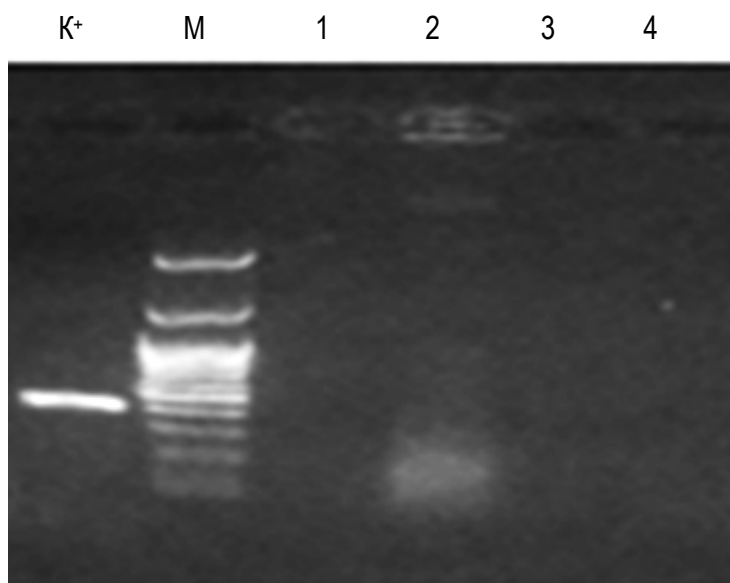


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймера NEM06 F/R: дорожки (образцы сахарной свеклы): 1 – Z67-Z-тип, Германия; 2 – БО32 4Х, Украина; 3 – Р1537, Россия; 4 – Poli, Болгария; K⁺ – Н7581, Швеция (Nem06); М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим) 100–3000 п.н.

ПЦР-амплификация у генотип Н7581, Швеция (K⁺) выявила один ампликон длиной 478 п.н., характерный для устойчивых гомозигот (рис. 2). Это свидетельствует о том, что все генотипы, кроме указанного, оказались гетерозиготами. Следовательно, при дальнейшем расщеплении данные селекционные материалы образуют гаметы с доминантными и рецессивными аллелями в соотношении 4 : 1 [11].

Заключение

Результаты исследований показали, что применяемый нами подход при скрининге гибридов сахарной свеклы на устойчивость к корневым нематодам может успешно использоваться на практике. Выделены 4 образца растений сахарной свеклы (Украина, Россия, Швеция, Болгария), несущие ген устойчивости к галловой нематоды (*Rbt-1*). Данные растения можно рекомендовать для использования как исходный материал при селекции на устойчивость к болезням.

Таким образом, результаты проведенных ПЦР-анализов свидетельствуют о необходимости дальнейшего расширения и углубления молекулярно-генетических исследований для отбора форм сахарной свеклы с повышенной устойчивостью к биотическим стрессам для оптимизации селекционного процесса в целом.

Вместе с тем для более точной и уверенной классификации генотипов сахарной свеклы (устойчивые/чувствительные) необходимо дальнейшее исследование селекционных материалов на экспрессию данного гена с использованием нового поколения ДНК-маркеров (SNP) и с применением генетического секвенирования.

Библиографический список

1. Bakooie M. 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 // Journal of Agricultural Science and Technology. – 2015. – Vol. 17 (2). – Pp. 443–454.
2. Cai D. Positional Cloning of a Gene for Nematode Resistance in Sugar Beet / D. Cai, M. Kleine, S. Kifle, H.-J. Harloff et al. // Science. – 1997. – Vol. 275. – Issue 5301. – Pp. 832–834.
3. Chunming B. Gene Cloning and Gene Expression of Hsp90 from *Meloidogyne incognita* under the Temperature and Heavy Metal Stress / B. Chunming, D. Yuxi, L. Chen et al. // International Journal of Agriculture & Biology. – 2014. – Vol. 16 (3). – Pp. 451–460.
4. Hussein A.S. 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. – Vol. 40. – Issue 3. – Pp. 177–178.
5. Klein M. Evaluation of nematode-resistant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis / M. Klein, H. Voss, D. Cai, C. Jung // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – Vol. 97. – Issue 5–6. – Pp. 896–904.
6. Rogers S.O. Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh, Herbarium and Mummified Plant Tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5, No. 2. – Pp. 67–76.
7. Schulte D. 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 // Molecular Genetics & Genomics. – 2006. – Vol. 275. – Issue 5. – Pp. 504–511.
8. Schumacher K. Combining Different Linkage Maps in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) to Make One Map / K. Schumacher, J. Schondelmaier, E. Barzen et al. // Plant Breeding. – 1997. – Vol. 116. – Pp. 23–38.
9. Stevanato P. Identification and Validation of a SNP Marker Linked to the Gene *HsBvm-1* for Nematode Resistance in Sugar Beet / P. Stevanato, D. Trebbi, L. Panella et al. // Plant Molecular Biology Reporter. – 2015. – Vol. 33. – Pp. 474–479.
10. Yu M.H. Root-Knot Nematode Development and Root-Gall Formation in Sugar Beet // Journal of Sugar Beet Research. – 1995. – Vol. 32 (1). – Pp. 47–58.
11. Weiland J.J. A Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) Marker Associated with Root-Knot Nematode Resistance in Sugar Beet / J.J. Weiland, M.H. Yu // Crop Science. – 2003. – Vol. 43. – Pp. 1814–1818.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Арпине Артаваздовна Налбандян – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, 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», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

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

Дата поступления в редакцию 09.04.2018

Дата принятия к печати 18.05.2018

AUTHOR CREDENTIALS

Affiliations

Arpine A. Nalbandyan – Candidate of Biological Sciences, Research Scientist, 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.

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 – Doctor 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.

Received April 09, 2018

Accepted May 18, 2018