

УДК 633.63:575.174.015.3

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-88-90>

Краткий обзор/Brief review

**Налбандян А.А.,
Хуссейн А.С.,
Федулова Т.П.,
Руденко Т.С.,
Михеева Н.Р.,
Селиванова Г.А.**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова», 396030, РФ, Воронежская обл., Рамонский р-н, п. ВНИИСС, д. 86
E-mail: arpnal@rambler.ru

Ключевые слова: сахарная свекла, фузариозная гниль, ген устойчивости, од-нонуклеотидные замены, специфические праймеры

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

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-88-90>**Конфликт интересов отсутствует**

**Arpine A. Nalbandyan,
Ahmad S. Hussein,
Tatyana P. Fedulova,
Tatyana S. Rudenko,
Natalia R. Mikheeva,
Galina A. Selivanova**

All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov, Voronezh, 396030, Russia
E-mail: arpnal@rambler.ru

Key words: sugar beet, fusarium root rot, resistance gene, single nucleotide polymorphism, specific primers

For citation: Nalbandyan A.A., Hussein A.S., Fedulova T.P., Rudenko T.S., Mikheeva N.R., Selivanova G.A. Studying of the acid chitinase SE2 gene in sugar beet genotypes. Agrarian Science. 2021; 348 (4): 88–90. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-88-90>**There is no conflict of interests**

Изучение гена кислой хитиназы SE2 в генотипах сахарной свеклы

РЕЗЮМЕ

Цель работы – апробация специфического праймера FusA1F/FusA1R для изучения гена SE2, ответственного за экспрессию кислой хитиназы при стрессовых ситуациях. Материалом для исследования служили растения 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 генотипирование 10 образцов сахарной свеклы с использованием молекулярно-генетического маркера FusA1. Были 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 А) в растениях селекционного номера 9 (Sh.1) по сравнению с устойчивым генотипом. Растения данного гибрида и в полевых условиях проявляли признаки зараженности фузариозом. Можно предположить, что данные SNPs могут приводить к преодолению устойчивости (путем замены аминокислотной единицы в полипептиде) и, как следствие, снижению адаптационной способности растений.

Studying of the acid chitinase SE2 gene in sugar beet genotypes

ABSTRACT

Aim of the work was specific primers (FusA1F/FusA1R) testing to study the SE2 gene controlling acid chitinase effect under stress conditions. Plants of domestic and foreign sugar beet were the material for the investigation. To confirm relationship between the SE2 gene (localized to the chromosome 3) controlling steady effect of acid chitinase and sugar beet resistance to root rot, 10 sugar beet samples were genotyped using the FusA1 molecular 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 molecular-genetic 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 breeding sample No. 9 (Sh.1). Plants of this genotype showed symptoms of fusarium infection under field conditions as well. It can be concluded that the SNPs data lead to overcoming of resistance (by changing an amino-acid unit in a polypeptide), and, as consequence, to decrease of plant adaptability.

Поступила: 2 февраля
После доработки: 12 апреля
Принята к публикации: 15 апреля

Received: 2 February
Revised: 12 April
Accepted: 15 April

Введение

Сахарная свекла подвергается различным болезням, как в процессе вегетации, так и во время хранения.

Возбудителями болезни являются микроорганизмы, которые содержатся на корнеплодах, особенно с неотмытой почвой. Все заболевания свеклы приводят в конечном итоге к ее загниванию. Загнивание свеклы в кагатах не происходит под действием 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*. Плесневые грибы во время хранения сахарной свеклы могут вызвать такие заболевания, как ботритиоз, фомоз и фузариоз.

Фузариоз — заболевание, вызываемое представителями рода *Fusarium*, проявляется образованием на поверхности корня (главным образом в верхней его части) мицелия розового или желтого цвета.

Fusarium oxysporum является одним из разрушительных патогенных микроорганизмов, вызывающим значительные потери урожая у сахарной свеклы, и выявление устойчивых форм культуры имеет решающее значение для селекции. Для сахарной свеклы большую проблему представляют такие заболевания, как фузариозное увядание и фузариозная корневая гниль, вызываемые широко распространенными и вредоносными грибами *F. oxysporum* и *F. solani* [2, 3]. 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 [4, 5, 6]. Но 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, являющуюся катализатором деградации хитина, что приводит к обезвреживанию патогена. Несмотря на отсутствие генов-кандидатов для этой культуры, опосредованные гены устойчивости, такие как гены, отвечающие за работу хитиназ, могут быть ключевыми для идентификации генов устойчивости к фузариозу сахарной свеклы [7]. Активность изоферментов хитиназы (EC 3.2.1.14) коррелирует с патогенной инфекцией и, следовательно, может играть важную роль в механизмах защиты растений в клетках корня или листьев против различных фитопатогенов, таких как *F. oxysporum*. Так, в листьях сахарной свеклы были идентифицированы две изоформы кислой хитиназы (SE1 и SE2), но только одна изоформа (SE2) проявляет экзохитиназную активность и способна эффективно гидролизовать хитоолигосахариды. Подобно SE2, гликозилированная изоформа хитиназы SP2 также способна участвовать в процессах защиты сахарной свеклы от фитопатогенов [8]. Кислые хитиназы заслужили пристальное внимание в связи с их эффективностью в широком диапазоне применений, в том числе их использование в качестве биоконтролирующего средства против растительных патогенных грибов [9].

Методика

Материалом для выявления наличия генов устойчивости к биотическим стрессорам служили растения са-

харной свеклы 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 сахарной свеклы. Когда растения достигали фазы 2 пар настоящих листьев, в почву вносили по 5 мкл споровой суспензии *Fusarium oxysporum* в концентрации 35 тыс. КОЕ/1 мл [10]. Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 20% SDS и 3,5 М ацетата аммония, а также наборами для выделения ДНК (ООО «Синтол») [11]. Качество выделенной ДНК было определено 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). ПЦР в режиме реального времени осуществляли в термоциклере CFX96 (BioRad). Условия проведения ПЦР-реакции оптимизировали в соответствии с характеристиками используемых праймеров. В работе был использован следующий специфический праймер FusA 1 на ген, контролирующий работу кислой хитиназы (F: 5,AGCTACCTTTGGTAACGGGC3, / R: 5, GCAGTGCTTAAGCTGGCATC3, [12]. Праймер был 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 экс-

Рис. 1. Электрофоретическое разделение ПЦР-фрагментов, полученных с праймером FusA 1: обозначения образцов: 1 — F119170, 2 — F119176, 3 — MC10039, 4 — MC11018, 5 — ОП19172, 6 — ОП19179, 7 — Н.1, 8 — М.1, 9 — Sh.1, 10 — дикая свекла *B. corolliflora* Zoss., М — маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (Thermo Fisher Scientific, США), К — ПЦР-смесь без ДНК

Fig. 1. Analysis of DNA fragments amplified with primer FusA 1: sample designations: 1 — F119170, 2 — F119176, 3 — MS10039, 4 — MS11018, 5 — Pollinator19172, 6 — Pollinator19179, 7 — H.1, 8 — M.1, 9 — Sh.1, 10 — *B. corolliflora* Zoss., M — GeneRuler™ DNA molecular weight marker (Thermo Fisher Scientific); K — PCR mixture without DNAs

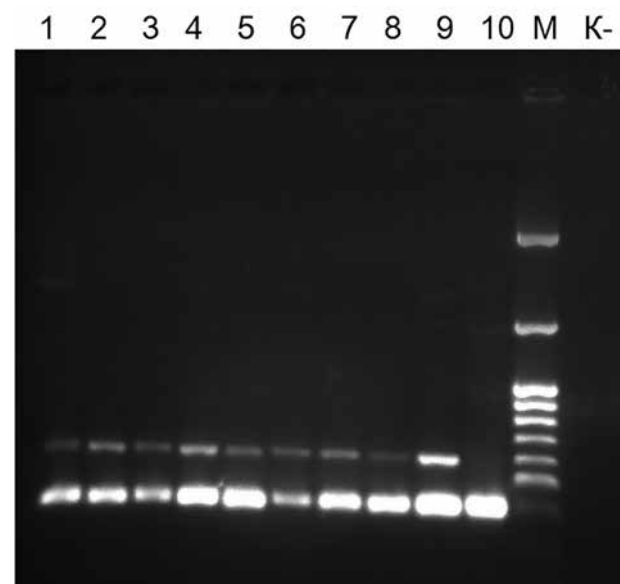
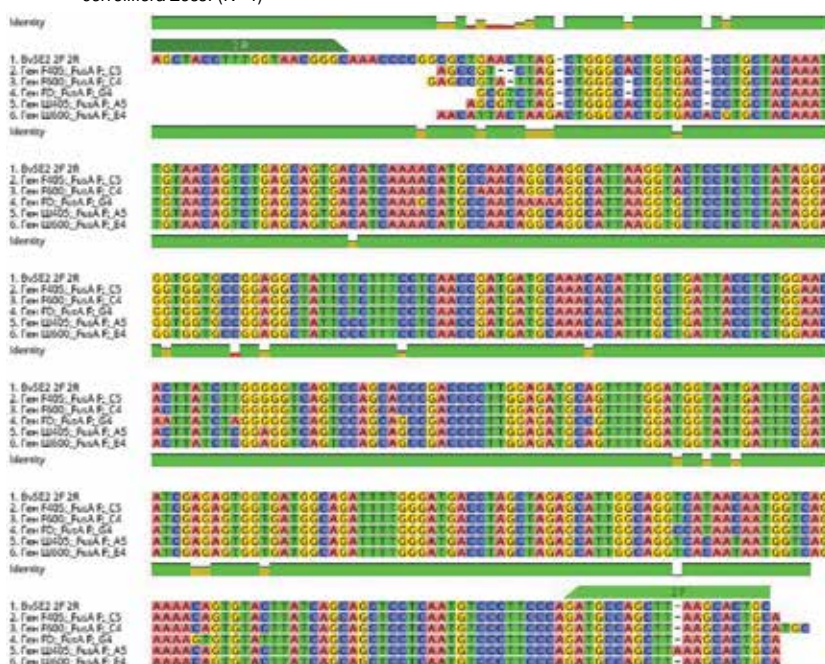


Рис. 2. Локализация SNPs в генотипах: F119170 (на фото под № 2, 3), Sh.1 (на фото под № 5, 6) и *B. corolliflora* Zoss. (на фото под № 4)

Fig. 2. Localization of single nucleotide polymorphisms in sample F119170 (№ 2, 3), Sh.1 (№ 5, 6), *B. corolliflora* Zoss. (№ 4)



прессию кислой хитинизы, с устойчивостью сахарной свеклы к корневой гнили проведено генотипирование 10 образцов сахарной свеклы с использованием молекулярного маркера *FusA1*. Выявлено по 2 ДНК-фрагмента, длиной 600 п.н. и 400 п.н., во всех исследуемых генотипах, кроме растений дикой свеклы *Beta corolliflora* Zoss. (рис. 1). Это свидетельствует о гетерозиготности образцов по данному локусу, растения же дикой свеклы являются устойчивыми гомозиготами. Дикие формы культурных растений традиционно вызывают интерес у селекционеров при отборе на устойчивость к болезням, так как являясь носителями аутосомной доминанты, и при расщеплении будут сохранять ее. 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 проанализи-

зированы в программе SnapGene. При выравнивании нуклеотидных последовательностей исследуемых генотипов с геном контрольного устойчивого генотипа (GenBank № HQ709091.1 NCBI) в селекционном номере 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 растением дикого вида *B. corolliflora* Zoss. и образцом под номером 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 зараженности. На рисунке 2 представлен фрагмент генетического анализа по Сэнгеру, где наглядно продемонстрировано положение вышеописанных однонуклеотидных замен и вставок.

Таким образом, основываясь на полученных результатах молекулярно-генетических исследований можно предположить, что идентифицированные нами однонуклеотидные замены являются *pseudopolymorphisms*, то есть кодируют другую аминокислоту, что ведет к изменениям в аминокислотном составе пептида. Следствием этого является экспрессия функционально иного белка и инактивация исходного.

Выводы

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований гена SE2 (контролирует работу кислой хитиназы) идентифицированы восемь однонуклеотидных замен (3 (Т/С, 2 С/Г, А/Г, Г/А, С/Т)) и 3 однонуклеотидные вставки (нуклеотид А) в селекционном номере 9 (Sh.1). Можно заключить, что данные однонуклеотидные замены могут приводить к преодолению устойчивости (путем 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 свеклы на устойчивость к фузариозной гнили.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kagami H., Kurata M., Matsuhira H. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Methods Mol. Biol.* 2015;1223: 335–347.
- Стогниенко О.И., Стогниенко Е.С. Полевая устойчивость гибридов F1 сахарной свеклы к наиболее вредоносным болезням в условиях ЦЧР. *Аграрная наука.* 2019;2: Р. 75–78. [Stognienko O.I., Stognienko E.S. Field resistance of sugar beet F1 hybrids to the most harmful diseases under conditions of the central black-earth region. *Agrarian science.* 2019;2:75-78. (In Russ.)].
- Lucchi De C., Stevanato P., Hanson L., McGrath J., Panella L., Biaggi M. De, Broccanello C., Bertaggia M., Sella L., Concheri G. Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* in sugar beet. *Euphytica.* 2017;213:71.
- Francis S., Asher M. Exploitation of novel sources of disease resistance in Beta germplasm using molecular markers. *J Sugar Beet.* 2000;37: 89–95.
- Fank A., Galewski P., McGrath M. Nucleotide-binding resistance gene signatures in sugar beet, insights from a new reference genome. *The Plant Journal.* 2018;95: 659-671.

- Urbach J., Ausubel F. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114: 1063-1068.
- Sekhwil M., Pingchuan Li P., Lam I., Wang X., Cloutier S., You F. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16: 19248-19290.
- Yerzhebayeva R., Abekova A., Konysbekov K., Bastaubayeva Sh., Kabsrahkmanova A., Absattrova A., Shavrukov Y. 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. *Peer J.* 2018;6: 2-19.
- Nagpure A., Choudhary B., Gupta R. Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2014;34(3): 215-232.
- Walker JC. *Plant Pathology.* Third Edition. New York: McGraw-Hill Book. 1969. 819 p.
- Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Bogacheva N.N. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis. *Russian Agricultural Sciences.* 2014;40(3): 177-178.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215(3): 403-410.