

УДК 633.63:575.174.015.3

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-355-1-110-113>

Оригинальное исследование/Original research

Хуссейн А.С.,  
Налбандян А.А.,  
Федулова Т.П.,  
Крюкова Т.И.,  
Фомина А.С.,  
Моисеенко А.В.

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

**Ключевые слова:** сахарная свекла, галловые нематоды, ген устойчивости, однонуклеотидные замены, специфические праймеры

**Для цитирования:** Хуссейн А.С., Налбандян А.А., Федулова Т.П., Крюкова Т.И., Фомина А.С., Моисеенко А.В. Нуклеотидные замены в гене устойчивости к галловым нематодам сахарной свеклы. *Аграрная наука*. 2022; 355 (1): 110–113.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-355-1-110-113>**Конфликт интересов отсутствует**

Ahmad S. Hussein,  
Arpine A. Nalbandyan,  
Tatyana P. Fedulova,  
Tatyana I. Kryukova,  
Anastasiya S. Fomina,  
Aleksandr V. Moiseenko

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, root-knot nematode, resistance gene, single nucleotide polymorphism, specific primers

**For citation:** Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Kryukova T.I., Fomina A.S., Moiseenko A.V. Nucleotide substitutions in the resistance gene to root-knot nematodes in sugar beet. *Agrarian Science*. 2022; 355 (1): 110–113. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-355-1-110-113>**There is no conflict of interests**

## Нуклеотидные замены в гене устойчивости к галловым нематодам сахарной свеклы

### РЕЗЮМЕ

Цель работы – апробация специфических праймеров NEM06FWD2/NEM06REV2 и nem06FWD1/nem06REV1 для изучения гена устойчивости R6m-1 к галловым нематодам (*Meloidogyne spp.*) в селекционных образцах сахарной свеклы. Материалом для исследования служили растения сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции. Для выявления связи гена R6m-1, локализованного на хромосоме 1 и контролирующего стабильный уровень работы сигнальных киназ, с устойчивостью сахарной свеклы к фитопатогенам, проведен ПЦР-анализ 10 образцов сахарной свеклы с использованием 2 пар молекулярно-генетических маркеров. Вследствие амплификации выявлены ДНК-фрагменты длиной ~500 п.н. и ~100 п.н. В результате секвенирования полученных нуклеотидных последовательностей участка гена R6m-1 с последующим выравниванием в программе Geneious Prime идентифицированы 3 однонуклеотидные замены (A/G, G/C и G/A) в устойчивом генотипе MS11018. В гибриде иностранной селекции Хамбер обнаружена одна нуклеотидная замена (A/G) и 3 делеции. Можно предположить, что указанные SNPs могут формировать устойчивость путем замен аминокислоты в полипептидной цепи. Показано, что применяемые маркеры позволяют также дифференцировать гомозиготные и гетерозиготные генотипы по данному аллелю.

## Nucleotide substitutions in the resistance gene to root-knot nematodes in sugar beet

### ABSTRACT

Here we are testing the specific primers NEM06FWD2/NEM06REV2 and nem06FWD1/nem06REV1 for the R6m-1 resistance gene to root-knot nematodes *Meloidogyne spp.* in breeding samples of sugar beet. Sugar beet plants of domestic and foreign breeding lines were the object of the study. To identify the relationship between R6m-1 gene, which is localized on the chromosome 1 and controls the stable level of the kinase activity signal, with sugar beet resistance to phytopathogens, PCR-analysis of 10 sugar beet samples were carried out using 2 pairs of molecular genetic markers. DNA amplification revealed a fragments ~500 bp and ~100 bp in length and as a result of sequencing of nucleotide sequences of R6m-1 gene region with subsequent alignment by Geneious Prime program, 3 single nucleotide substitutions (A/G, G/C, and G/A) in the resistant MS11018 genotype and one nucleotide substitution (A/G) and 3 deletions in a foreign hybrid Humber were identified. It can be assumed that these SNPs can form resistance by amino acid substitutions in the polypeptide chain. Finally, possibility to differentiate homozygous and heterozygous genotypes for this allele was shown.

Поступила: 14 сентября  
Принята к публикации: 11 января

Received: 14 September  
Accepted: 11 January

## Введение

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) является наиболее важным источником сахарозы (ФАО — 2012). Сахар является одним из основных компонентов питания человека, источником быстро доступной энергии для организма. Мировой спрос на него растет со скоростью около 1 Мт (0,5%) в год, тогда как население мира увеличивается примерно в три раза быстрее. Этот пробел в будущем будет, вероятно, ликвидирован за счет увеличения устойчивости и, как следствие, урожайности культуры. Как показывает практика возделывания культурных растений, наибольших успехов в создании урожайных, устойчивых и высококачественных сортов и гибридов, отвечающих требованиям современного производства, можно добиться при организации селекционной работы на молекулярно-генетической основе [1, 2].

Одним из серьезных заболеваний, снижающим урожайность корнеплодов сахарной свеклы, является фитогельминтоз, вызываемый разными вредителями — представителями типа первичноротых червей нематод (*Nematoda*) [3, 4]. 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 провоцируют гнили головок корнеплодов и образование корневых галлов, приводя к значительным потерям урожая [5, 6]. 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. За последние три десятилетия на помощь традиционной селекции пришли новые технологии — технологии ДНК-маркеров, что сделало селекцию более эффективной, отвечающей современным реалиям. Молекулярно-генетические маркеры являются надежным инструментом в руках экспериментатора, так как в основном наследуются сцепленно, моногенно и кодоминантно. В Российской Федерации молекулярно-генетические исследования по сахарной свекле проводятся в незначительном объеме, не имеют широкого распространения и практически не используются в селекционном процессе.

Большие исследования по фенологическому изучению устойчивости сортов сахарной и видов дикой свеклы к свекловичной цистообразующей нематоде *Heterodera schachtii* были осуществлены во ВИГИСе. Все исследованные образцы сахарной и столовой свеклы проявили восприимчивость к данному вредителю. Устойчивыми оказались дикие виды *Beta patellaris*, *B. webbiana*, *B. procumbens*, которые были использованы авторами в селекционном процессе в качестве источников устойчивости к свекловичной нематоде. Однако созданные гибриды обладали низкой продуктивностью [7]. Но вместе с тем особого внимания заслуживает изучение толерантности культуры и к галловой нематоде. Устойчивость к галловым нематодам была интрогрессирована в сахарную свеклу (*Beta vulgaris* L.) из дикой свеклы (*B. vulgaris* ssp. *maritima* L.). Болезнь сахарной свеклы, вызванная *Meloidogyne* spp., проявляется галлами (наростами), которые образуются на боковых и доминантных корнях. Первоисточником устойчивости к болезни выступают 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 встраивается при гибридизации с резистентными видами *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, *Beta procumbens* и *Beta patellaris* и возвратными скрещиваниями [8]. Продемонстрировано, что в потомство F<sub>1</sub> устойчивость передается согласно законам расщепления классической теории наследования, так как обеспечивается деятельностью однокопийного доминантного гена, названного R6m-1. Ген локализован на 1 хромосоме сахарной свеклы, находится, соответственно, в первой группе сцепления (NCBI). Установлена эффективность данного моногена против патогенного влияния шести различных представителей рода *Meloidogyne* spp. Ген обуславливает высокий уровень экспрессии белков (киназ) — защитников, ингибирующих ферменты (протеиназы), действие которых приводит к разрушению плотной стенки клеток растений вредителем [9, 10]. Иностранцами авторами с использованием RFLP-, RAPD-, SSR- и SNP-маркеров была проведена большая работа по выявлению локусов, связанных с устойчивостью/чувствительностью к галловой нематоде. Исследования группы иранских ученых по поиску локализации гена устойчивости привели к конструированию CAPS-маркеров, посредством которых можно идентифицировать локусы, сцеплено наследуемые с геном устойчивости к корневым нематодам (R6m-1). Дуплексное применение маркеров использовалось и ранее, в частности для определения устойчивости к вирусным болезням риса [11–13].

Таким образом, применение специфических ДНК-маркеров для молекулярно-генетического отбора селекционного материала сахарной свеклы с генами устойчивости к нематоде является актуальным направлением исследований.

Цель исследования — провести молекулярно-генетический скрининг генотипов сахарной свеклы на наличие генов устойчивости к фитогельминтозу.

## Методика

В качестве материалов для исследования были использованы генотипы сахарной свеклы отечественной селекции (мужскостерильные линии — МС-формы, сростноплодные опылители — Оп, простые гибриды F<sub>1</sub>) и гибриды зарубежной селекции — Шаннон, Митика, Хамбер, Баккара (Lion Seeds, Италия).

Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 25% SDS и 4,5M ацетата аммония, а также наборами для выделения ДНК (ООО «Синтол») [14, 15]. Качество экстрагированной ДНК было определено путем электрофореза в 0,8%-м агарозном геле с бромистым этидием. Для проведения экспериментов, в частности ПЦР-анализа, полученную ДНК растворяли в 10 мМ трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА. Классическая полимеразно-цепная реакция была проведена на амплификаторе Genius (Великобритания). Условия проведения ПЦР-реакции (в соответствии с характеристиками используемых праймеров): 94 °C в течение 5 мин, далее 30 циклов со следующими условиями: 94,5 °C в течение 35 с, отжиг праймеров — 35 с, 72 °C в течение 45 с, и финальная элонгация при 72 °C в течение 4 мин.

В работе были использованы специфические праймеры на гены устойчивости к нематоде (NEM06FWD2/NEM06REV2, nem06FWD1/nem06REV1) [12] (табл. 1).

Секвенирование осуществляли на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (ООО «Евроген»).

Маркер	Название праймера	Последовательность 5'-3'
nem06	nem06FWD1 nem06REV1	TGACGGGTTGTCAATATGC TCCATTTCCTGACCTACAATTATT
NEM06	NEM06FWD2 NEM06REV2	AAAGAAAGGGAACCTCAATGTTAG TCAGAATTGCTGAAGGTCATT

### Результаты

Для профилактики инфицирования нематодами при посеве сахарной свеклы необходимо использовать генотипы, устойчивые к болезни.

Для идентификации гена устойчивости к галловым нематодам R6m-1 у изучаемых селекционных образцов сахарной свеклы проводили амплификацию ДНК растений с использованием 2 пар специфических праймеров к данному гену: NEM06FWD2/NEM06REV2 и nem06FWD1/nem06REV1.

В результате проведения мультиплексного (комбинация двух и более праймеров) ПЦР-анализа у образцов под № 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 9 выявлено по два ампликона, размером ~500 п.н. и ~100 п.н. Образцы под № 3 и 8 обнаружили по одному ДНК-фрагменту по 124 п.н. и 475 п.н. (рис. 1).

Согласно группе авторов [12], проводивших и полевые исследования, наличие парных ампликонов свидетельствует о гетерозиготности материалов по данным аллелям, тогда как единичных — о гомозиготности, где 124 п.н. говорит о воспри-

имчивости генотипа к болезни, а 475 п.н. — об устойчивости.

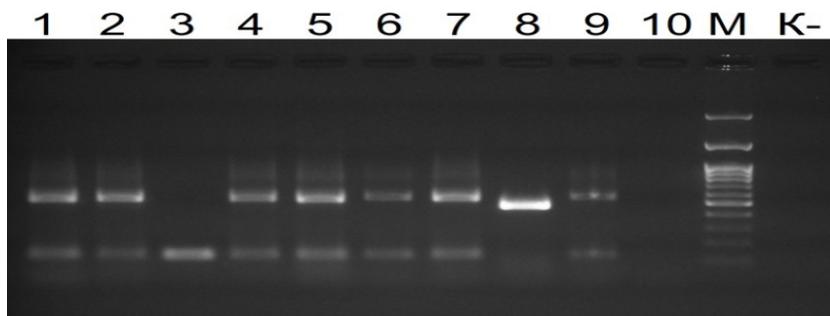
Образцы Хамбер и MC11018 были отсекарованы и выравнены по нуклеотидным последовательностям в программе Geneious Prime (рис. 2, 3).

При выравнивании нуклеотидных последовательностей областей гена R6m-1 с аннотированной последовательностью генотипа *Beta vulgaris* L. (GenBank № HQ709091.1 NCBI) у устойчивого генотипа MC11018 выявлены SNPs в трех позициях: 24 (A/G), 248 (G/C) и 393 (G/A).

При поиске гомологии полученного фрагмента длиной 124 п.н. (предположительно чувствительный гено-

**Рис. 1.** Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с применением праймеров NEM06FWD2/NEM06REV2 и nem06FWD1/nem06REV1. Обозначения образцов: 1 — Шаннон, 2 — Митика, 3 — Хамбер, 4 — Баккара, 5 — ОП19172, 6 — ОП19179, 7 — MS10039, 8 — MC11018, 9 — F119170, 10 — F119176. М — маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ («ThermoScientific», США), К — ПЦР-смесь без ДНК

**Fig. 1.** Analysis of DNA fragments amplified with primers NEM06FWD2/NEM06REV2 and nem06FWD1/nem06REV1. Sample designations: 1 — Shannon, 2 — Mitika, 3 — Hamber, 4 — Bakkara, 5 — OP19172, 6 — OP19179, 7 — MS10039, 8 — MS11018, 9 — F119170, 10 — F119176. M — GeneRuler™ DNA molecular weight marker ("ThermoScientific", USA); K — PCR mixture without DNAs



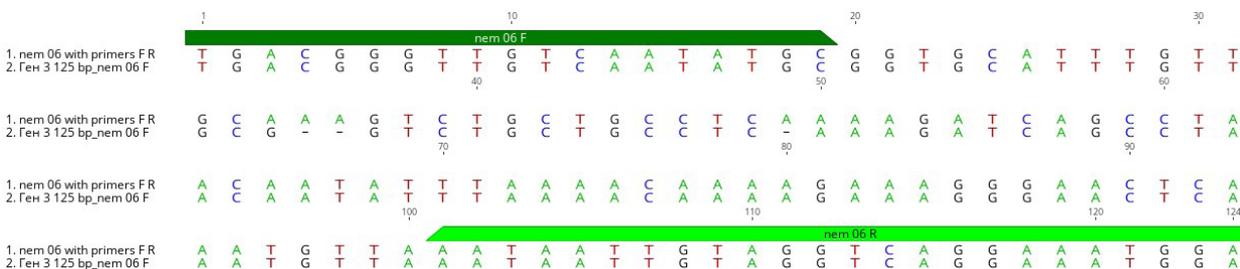
**Рис. 2.** Локализация SNPs в генотипе MC11018 (на фото: ген B 475 bp)

**Fig. 2.** Localization of single nucleotide polymorphisms in sample MS11018



**Рис. 3.** Локализация SNP и делеций в генотипе Хамбер (на фото: ген 3 125 bp)

**Fig. 3.** Localization of single nucleotide polymorphisms in sample Humber



тип, Хамбер) с участком аннотированной ДНК (GenBank № HQ709091.1 NCBI) выявлена однонуклеотидная замена в позиции 34 (A/G) и три делеции, в позициях 35, 36 и 49.

Таким образом, в результате проведенного генетического анализа нами установлено 2 новых (G/C, G/A) и один (A/G) ранее описанный в иностранной литературе SNPs в геноме устойчивого материала. Можно предположить, что данные однонуклеотидные замены играют решающую роль в формировании устойчивости к данной болезни. Но для точного подтверждения вклада обнаруженных SNPs в формирование устойчивости к негативному воздействию галловых нематод необходимо секвенировать большее количество как чувствительных, так и устойчивых генотипов сахарной свеклы. Данные исследования будут продолжаться в плане увеличения объема изучаемых генотипов и испытаний в полевых условиях.

### Выводы

В результате молекулярно-генетического анализа гена устойчивости к нематодам R6m-1 у резистентного генотипа сахарной свеклы MC11018 были выявлены как

новые (C/T, G/T, G/C), так и ранее известный (G/A) SNP, которые, предположительно, и обеспечивают его устойчивость к болезни, являясь причиной замен определенных аминокислот в полипептидной цепи. Проведенные экспериментальные исследования показали, что применимый подход при тестировании селекционных материалов *Beta vulgaris* L. на устойчивость к галловой нематоде с использованием специфических праймеров может использоваться в практической селекционной работе. Более того, примененные маркеры четко дифференцируют гомозиготные и гетерозиготные по данному локусу генотипы, что является основным преимуществом перед фенотипированием. Это позволит выявлять неоднородность партий семян по данному признаку.

Необходимо дальнейшее расширение и углубление молекулярно-генетических исследований при отборе форм сахарной свеклы с повышенной устойчивостью к биотическим факторам среды для оптимизации селекционного процесса в целом. Использование молекулярных методов в селекции сахарной свеклы открывает новые возможности для целенаправленного создания устойчивых селекционно-ценных гибридов.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Monteiro F., Frese L., Castro S., Duarte M., Paulo O., Loureiro J., Romeiras M. Genetic and Genomic Tools to Assist Sugar Beet Improvement: The Value of the Crop Wild Relatives. *Front Plant Sci.* 2018; 9: 74. doi.org/10.3389/fpls.2018.00074
2. Kagami H., Kurata M., Matsuhiro H. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Methods Mol. Biol.* 2015;1223: 335–347. doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5\_27
3. Shakeel A., Khan A., Upadhyay S. Eco-friendly dual-edged management of fly ash and its antagonistic interplay with *Meloidogyne incognita* on beetroot (*Beta vulgaris* L.). *Environmental Research.* 2022;209:112767. doi.org/10.1016/j.envres.2022.112767
4. Nguyen T.D., Trinh Q.P. First report of an important sheat nematode, *Hemicyclophora poranga*, associated with sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in Vietnam. *Helminthologia.* 2021;58(3): 333 – 338. doi 10.2478/helm-2021-0033
5. El-Nagdi W.M., El-Fattah A.I. Controlling root-knot nematode, *meloidogyne incognita* infecting sugar beet using some plant residues, a biofertilizer, compost and biocides. *Journal of Plant protection research.* 2011;51;2: 107-113.
6. Ghaemir R., Pourjam E., Safaie N. Molecular insights into the compatible and incompatible interactions between sugar beet and the beet cyst nematode. *BMC Plant Biology.* 2020;20;483: 3-16. doi. 10.1186/s12870-020-02706-8
7. Шестеперов А.А., Федотова Е. Л., Закабунина Е.Н., Колесова Е.А. Создание нематодоустойчивых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур. Учебное пособие. 2004. М. РГАУ. С. 97. [Shesteperv A., Fedotova E., Zakabunina E., Kolesova E. Creation of nematode-resistant varieties and hybrids

of agricultural crops. Tutorial. 2004. М. RSACU. P. 97. (In Russ.)].

8. 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. doi.org/10.1111/tpj.13977
9. Albar L., Bangratz-Reyser M., Hebrard E., Ndjiondjop N., Jones M., Ghesquiere A. Mutations in the eIF (ISO) 4G Translation Initiation Factor Confer High Resistance of *Rice Yellow Mottle Virus*. *The Plant Journal.* 2006;47: 417-426. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02792.x
10. Zhang C. L., Xu D. C., Jiang X. C., Zhou Y., Cui J., Zhang C. X., Chen D. F., Fowler M. R., Elliott M. C., Scott N. W., Dewar A. M., Slater A. Genetic Approaches to Sustainable Pest Management in Sugar Beet (*Beta vulgaris*). *Ann. Appl. Biol.* 2008;152: 143-156.
11. Weiland J., Yu M. A Cleaved Amplified Polimorphic Sequence (CAPS) Marker Associated with Root-Knot Nematode Resistance in Sugar beet. *Crop Sci.* 2003;43: 1814-1818.
12. 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;17: 443-454.
13. Hamajima N., Saito T., Matsuo K., Tajima K. Competitive Amplification and Unspecific Amplification in Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-pair Primers. *J. Mol. Diagn.* 2002;4: 103–107. doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60688-5
14. Mahuku G.S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2004;22: 71-81. doi.org/10.1007/BF02773351
15. 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;4;3: 177-178.

### ОБ АВТОРАХ:

**Хуссейн Ахмад Садун**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник  
**Арпине Артаваздовна Налбандян**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией маркер-ориентированной селекции  
**Федулова Татьяна Петровна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник  
**Крюкова Татьяна Ивановна**, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник  
**Фомина Анастасия Сергеевна**, младший научный сотрудник  
**Моисеенко Александр Владимирович**, научный сотрудник

### ABOUT THE AUTHORS:

**Hussejn Ahmad Sadun**, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher  
**Arpine Artavazdovna Nalbandyan**, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Head of Marker-assisted Selection Laboratory  
**Fedulova Tatyana Petrovna**, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher  
**Kryukova Tatyana Ivanovna**, Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher  
**Fomina Anastasiya Sergeevna**, Junior Researcher  
**Moiseenko Aleksandr Vladimirovich**, Researcher