

ПОЛИМОРФИЗМ NBS-LRR ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПО ДАННЫМ NBS-ПРОФАЙЛИНГА

© 2022 г. А. А. Трифонова¹, *, Е. Р. Парадня¹, К. В. Борис¹, А. М. Кудрявцев¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: aichka89@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2021 г.

После доработки 14.05.2021 г.

Принята к публикации 25.05.2021 г.

Проведено исследование 49 современных отечественных и зарубежных гибридов сахарной свеклы методом NBS-профайлинга. Уровень полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости гибридов сахарной свеклы был достаточно высоким и составил 87.77% (74.21% для 15 отечественных гибридов и 83.80% для 34 зарубежных гибридов), для 11 гибридов были выявлены уникальные NBS-фрагменты. Кластерный анализ полученных данных выявил дифференциацию отечественных и зарубежных гибридов сахарной свеклы, что свидетельствует о различии в их наборах генов устойчивости. Кроме того была выявлена кластеризация ряда зарубежных гибридов в зависимости от селекционной компании.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, генетическое разнообразие, R-гены.

DOI: 10.31857/S0016675822010118

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) – основная техническая культура, выращиваемая для производства сахара в регионах с умеренным климатом, в том числе в России. Одним из главных факторов, влияющих на производство сахарной свеклы, является пораженность посевов различными болезнями и вредителями, которые могут вызывать существенные потери урожая. В этой связи большое значение приобретает создание гибридов сахарной свеклы, устойчивых к фитопатогенам. В настоящее время до 80% открытых селекционных программ по созданию гибридов сахарной свеклы направленно на формирование устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессам [1]. При этом важную роль в селекционном процессе играют современные молекулярно-генетические методы и подходы, позволяющие значительно ускорить процесс создания гибридов и сократить затраты [2].

Устойчивость растений ко многим патогенам обуславливается семейством генов резистентности (гены устойчивости, Resistance genes, **R-гены**). В геноме сахарной свеклы было идентифицировано 715 аналогов R-генов (RGA – Resistance Gene Analogs) [3]. Одним из наиболее распространенных классов R-генов у *B. vulgaris* являются **NBS-LRR** (Nucleotide Binding Site, Leucine-Rich Repeats) гены, кодирующие соответствующие консервативные домены [3, 4]. Показано, что именно NBS-LRR гены обуславливают устойчивость к таким рас-

пространным патогенам сахарной свеклы как ризомания (Beet Necrotic Yellow Vein Virus) и цистовая нематода (*Heterodera schachtii* Schm.) [5–7].

Для оценки варибельности R-генов растений, кодирующих NBS-домен, был разработан метод NBS-профайлинга, основанный на амплификации фрагментов R-генов с помощью выжженных праймеров, комплементарных консервативным участкам NBS-домена (P-петля, киназа 2, GLPL) [8]. Данный метод является универсальным и был успешно применен для исследования генов устойчивости широкого спектра сельскохозяйственных культур [9–12]. Однако ранее NBS-профайлинг не применялся для изучения NBS-LRR генов устойчивости сахарной свеклы и других видов рода *Beta*.

Целью данной работы является оценка варибельности NBS-LRR генов устойчивости современных коммерческих гибридов сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции методом NBS-профайлинга.

Для проведения исследования были отобраны 15 отечественных гибридов сахарной свеклы: Рамонский МС 46, Рамонский МС 60, Рамоза, РМС 120, РМС 121, РМС 127, РМС 134, РО 117 (ВНИИСС), Гибриды 1146, 1182, 1132, 1177, 1143 (СоюзСемСвекла); Каскад (Львовские семена); Рубин (Первомайская СОС); и 34 зарубежных гибрида сахарной свеклы: Андромеда КВС, Баронесса КВС, Дубравка КВС, Маришка КВС, Оле-

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия гибридов сахарной свеклы по данным NBS-профайлинга

Анализируемая выборка	Общее число фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Число уникальных фрагментов	Уровень полиморфизма, %	Ожидаемая гетерозиготность, H_e	Диапазон значений коэф-та Дайса
Общая выборка, NBS2/ <i>Mse</i> I	196	167	10	85.2	—	—
Общая выборка, NBS7/ <i>Mse</i> I	172	156	4	90.7	—	—
Общая выборка, NBS2/ <i>Mse</i> I и NBS7/ <i>Mse</i> I	368	323	14	87.77	0.265	0.71–0.91
Отечественные гибриды, NBS2/ <i>Mse</i> I и NBS7/ <i>Mse</i> I	318	236	3	74.21	0.260	0.73–0.88
Зарубежные гибриды, NBS2/ <i>Mse</i> I и NBS7/ <i>Mse</i> I	358	300	11	83.80	0.260	0.72–0.91

сия КВС, Светлана КВС (KWS); BTC 320, BTC 590, BTC 845, BTC 980 (BETASEED); Баккара, Милорд, Оти, Урал (FLORIMOND); Кариока, Митика, Мишель, Портланд, Шаннон (LION SEEDS); Ангус, Бугги, Вентура, Гамильтон, Харлей (MARIBO); Волга, Неро, Риттер (DLF SEEDS); Каньон, Койот, Шайенн (SESVANDERHAVE); Борислав, Гулливер, Логан, Пушкин (STRUBE), предоставленных ООО «СоюзСемСвекла» в рамках подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства сахарной свеклы в Российской Федерации». 42 из 49 образцов изученной выборки включены в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на 2020 г.

ДНК выделяли из свежих проростков (по одному проростку для каждого гибрида) с использованием набора ZR Plant/Seed DNA Mini Prep (Zymo Research) согласно инструкции производителя.

NBS-профайлинг проводили по стандартной методике [8], с небольшими модификациями. Для рестрикции 200 нг геномной ДНК использовали эндонуклеазу *Mse*I (NEB). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора реактивов производства «Диалат-ЛТД» и двух праймеров (NBS2 5'-GTWGTYTTCYRA-ICCISSCAT-3' и NBS7 5'-ATTGTTGGRATGGG-MGGIMTIGG-3') [8], в термоциклере T100™ (Bio-Rad). Продукты реакции амплификации разделяли электрофорезом в денатурирующем

6%-ном полиакриламидном геле в 1× TBE буфере в камере Sequi-Gen® GT Sequencing Cell (Bio-Rad), затем гели окрашивали нитратом серебра [13].

Наличие/отсутствие продуктов амплификации отмечали визуально, учитывали только четко воспроизводимые фрагменты, результаты заносили в бинарную матрицу (1/0) в программе Microsoft Excel. Расчет коэффициента генетического сходства Дайса между парами образцов проводили с использованием программы PAST 3.16 [14]. Значения ожидаемой гетерозиготности (H_e) рассчитывали с помощью программы GenAlEx6.41 [15]. Кластерный анализ проводили методом Neighbor-Joining (NJ) в программе MEGA 7 [16].

В ходе NBS-профайлинга 49 гибридов сахарной свеклы с использованием двух праймеров было выявлено 368 фрагментов, в том числе 323 полиморфных (табл. 1). Для каждого изученного образца сахарной свеклы был получен уникальный NBS-спектр, а для двух отечественных и девяти зарубежных гибридов были идентифицированы уникальные фрагменты. При этом для образцов BTC-320 (BETASEED), Шайенн (SESVANDERHAVE) и Рамоза (ВНИИСС) выявлено по два уникальных фрагмента. Присутствие уникальных фрагментов в NBS-спектрах отдельных образцов позволяет предположить наличие у них специфичного набора генов устойчивости.

Уровень генетического разнообразия изучаемой выборки оказался достаточно высоким и составил 87.77%, а показатель ожидаемой гетерозиготности (H_e) – 0.265. При этом для 15 отечественных гибридов уровень полиморфизма составил 74.21%, а для 34 зарубежных – 83.80% (табл. 1). Несмотря на то, что NBS-профайлинг ранее не применялся для изучения представителей рода *Beta*, данный метод был успешно использован для изучения других сельскохозяйственных культур и родственных видов с использованием системы из двух комбинаций праймер/фермент, что позволяет сравнить полученные данные. Так, более низкий уровень варибельности (70.6%) был показан для 66 образцов картофеля отечественной и зарубежной селекции (NBS7/*MseI* и NBS9/*MseI*), а для одного сорта был выявлен уникальный фрагмент [12]. Существенно ниже был уровень полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости 53 сортов твердой пшеницы (34%), выявленный с помощью рестриктазы *MseI* и пяти NBS-праймеров [9]. Уровень варибельности генов устойчивости 46 представителей рода *Malus* выявленный с использованием комбинаций праймер/фермент NBS2/*MseI* и NBS5/*MseI* составил 79%, при этом для изученных сортов яблони отечественной и зарубежной селекции данный показатель был ниже и составил 49% [11]. При исследовании межвидового полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости 46 образцов рода *Cucumis* (NBS3/*MseI* и NBS5/*MseI*) уровень варибельности составил 89% [10]. Интересно, что уровень внутривидового разнообразия генов устойчивости изученных гибридов сахарной свеклы оказался сопоставим с выявленным в вышеперечисленных работах межвидовым уровнем разнообразия, и был выше, чем внутривидовой у преимущественно вегетативно размножаемых культур, таких как картофель и яблоня.

Таким образом, система NBS-профайлинга, впервые примененная для анализа генетического разнообразия гибридов сахарной свеклы оказалась эффективной несмотря на относительно небольшое число генов устойчивости в геноме сахарной свеклы [3], а уровень их полиморфизма был достаточно высоким. В целом, учитывая узость генетической базы сахарной свеклы, обусловленную ее происхождением и почти полным переходом на ЦМС-гибриды, уровень полиморфизма генома данной культуры, выявленный ранее с использованием различных типов маркеров достаточно велик. Так, SSR-анализ 40 гибридов сахарной свеклы показал значительный уровень полиморфизма не только между гибридами, но и внутри гибридов (до семи аллельных вариантов по одному локусу) [17]. А уровень генетического полиморфизма 43-х российских и иностранных гибридов сахарной свеклы, выявленный с помощью AFLP-анализа, составил 91% (75.8% – для

восьми отечественных и 87.6 – для 35 зарубежных гибридов) [18].

Среднее значение коэффициента попарного генетического сходства Дайса для всей изученной выборки составило 0.81, при максимальном значении 0.91 (между образцами Ангус и Гамильтон (MARIBO)), и минимальном – 0.71 (между образцами Мишель (LION SEEDS) и Гибрид 1182 (СоюзСемСвекла)). Минимальный уровень сходства между иностранными гибридами отмечен для образцов Мишель (LION SEEDS) и Олесия (KWS) (0.72), максимальный совпадает с показателем для общей выборки. Отечественные гибриды Рубин (Первомайская СОС) и Гибрид 1143 (СоюзСемСвекла) имели наибольшее сходство, а гибриды РМС-121 (ВНИИСС) и Гибрид 1177 (СоюзСемСвекла) – наименьшее.

На основе данных NBS-профайлинга была построена дендрограмма на которой отечественные и зарубежные гибриды сахарной свеклы формируют отдельные кластеры (рис. 1). Такое разделение может свидетельствовать о существенном различии в наборах генов устойчивости гибридов разного происхождения, которое, по-видимому, связано с использованием различных генетических баз для их создания. Ранее с помощью AFLP-анализа также была выявлена дифференциация зарубежных и отечественных гибридов [18]. При этом для отечественных гибридов, как правило, характерна более высокая адаптивность, устойчивость к корневым и кагатным гнилям и лежкость, что важно из-за особенностей технологии хранения и переработки сахарной свеклы в нашей стране. Однако в настоящее время на высокопродуктивные зарубежные гибриды, обладающие комплексной устойчивости к болезням, приходится более 90% посевов сахарной свеклы в России.

Отдельно была рассмотрена дифференциация зарубежных и отечественных гибридов. Среди проанализированных отечественных гибридов (преимущественно двух производителей) не наблюдается дифференциации по происхождению. Зарубежные гибриды формируют несколько подкластеров, объединяющих гибриды одной селекционной компании. Так, отдельный подкластер формируют восемь гибридов датских компаний MARIBO и DLF SEEDS, вместе группируются пять из шести изученных гибридов компании KWS, а также четыре гибрида компании BETASEED. Остальные зарубежные гибриды формируют смешанные подкластеры (рис. 1).

В исследованиях, проведенных ранее с помощью других методов, также наблюдалась дифференциация гибридов некоторых производителей. Так, из трех групп образцов, выявленных при анализе популяционной структуры 54 гибридов сахарной свеклы пяти американских компаний с

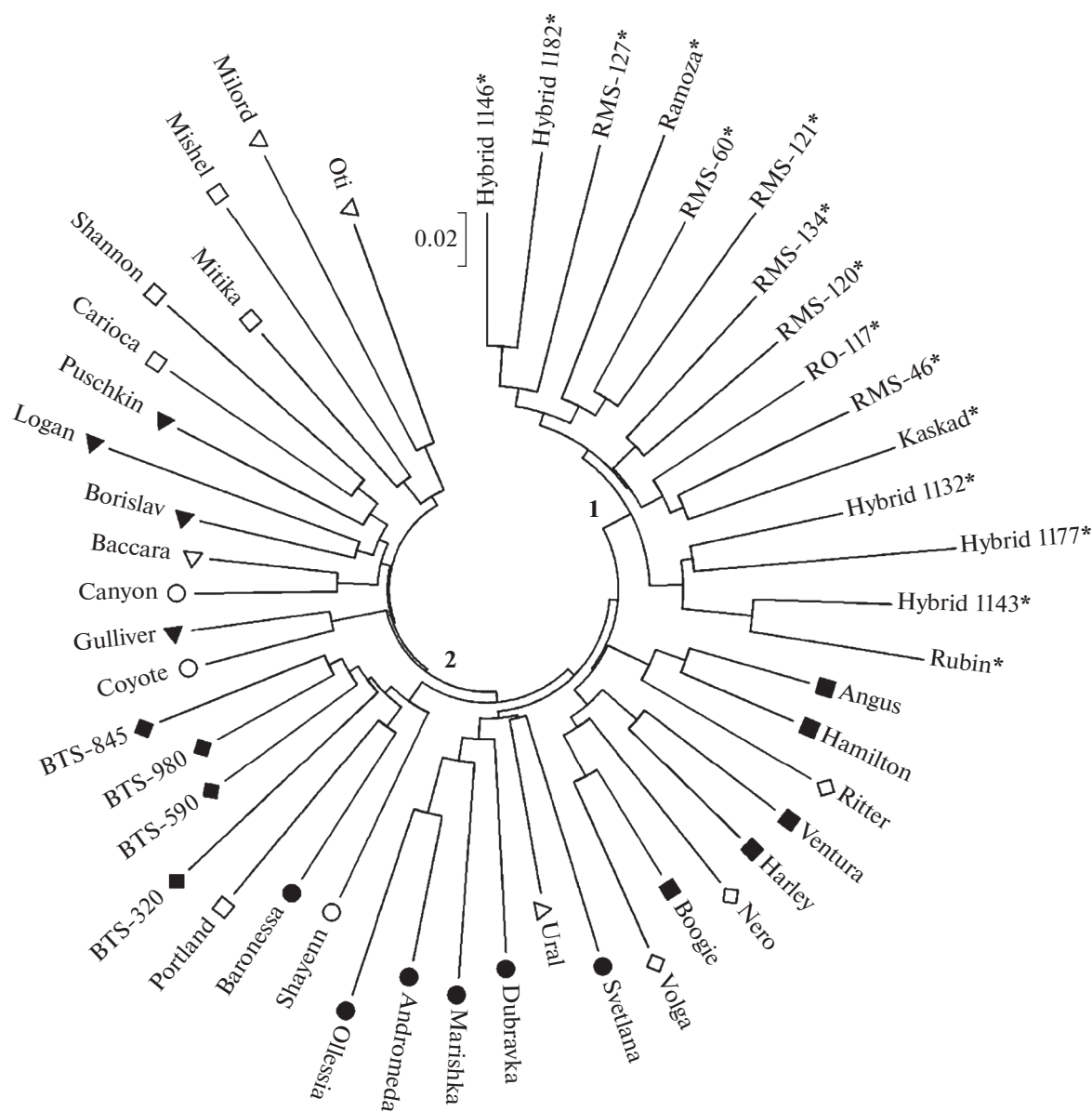


Рис. 1. Дендрограмма, построенная по данным NBS-профайлинга 49 образцов сахарной свеклы методом Neighbor-Joining. 1: * – отечественные гибриды; 2: зарубежные гибриды ● – KWS; ■ – MARIBO; □ – LION SEEDS; △ – FLORIMOND; ○ – SESVANDERHAVE; ◇ – DLF SEEDS; ◆ – BETASEED; ▲ – STRUBE.

помощью SSR, DaT и SNP маркеров, одна группа была сформирована гибридами компании Holly Hybrids, а остальные имели смешанный состав [19]. По данным SSR-анализа 40 зарубежных гибридов сахарной свеклы тринадцати компаний не группировались в зависимости от производителя, кроме девяти гибридов компании KWS [17]. Дифференциация образцов производства компаний BETASEED и KWS была выявлена с помощью AFLP-анализа гибридов восьми различных зарубежных производителей [18].

Выявленная дифференциация гибридов сахарной свеклы может свидетельствовать о том,

что производители используют различные источники и разных доноров устойчивости при создании гибридов. Известно, что в селекции сахарной свеклы на устойчивость часто применяют близкородственные виды секции *Beta*, например, свеклу морскую (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) как источник генов устойчивости к ризомании и церкоспорозу [20]. В отечественной селекции на устойчивость к биотическим стрессам использовались и представители секции *Corollinae*, такие как *B. corolliflora* и *B. trigyna* [2]. Разработанная система NBS-профайлинга в дальнейшем может быть использова-

на для изучения полиморфизма и поиска доноров генов устойчивости для селекции у видов рода *Beta*.

Таким образом, был впервые изучен полиморфизм NBS-LRR генов устойчивости современных гибридов сахарной свеклы методом NBS-профайлинга. Выявлен высокий уровень полиморфизма генов устойчивости как отечественных, так и зарубежных гибридов и показана их дифференциация в зависимости от происхождения и компании производителя.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания ИОГен РАН “Разработка и применение систем молекулярных маркеров для создания отечественных гибридов сахарной свеклы”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McGrath J.M., Panella L. Sugar Beet Breeding // Plant Breeding Reviews. 2018. V. 42. P. 167–218. <https://doi.org/10.1002/9781119521358.ch5>
2. Корниенко А.В., Подвигина О.А., Жужжалова Т.П. и др. Приоритетные направления исследований по генетике и селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в XXI веке // Генетика. 2014. Т. 50. № 11. С. 1286–1298. <https://doi.org/10.7868/S001667581411006X>
3. Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgräwe D. et al. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*) // Nature. 2014. V. 505. P. 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature12817>
4. Funk A., Galewski P., McGrath J.M. Nucleotide-binding resistance gene signatures in sugar beet, insights from a new reference genome // The Plant J. 2018. V. 95. P. 659–671. <https://doi.org/10.1111/tpj.13977>
5. Cai D., Kleine M., Kifle S. et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet // Science. 1997. V. 275. P. 832–834. <https://doi.org/10.1126/science.275.5301.832>
6. Lein J.C., Asbach K., Tian Y. et al. Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and cosegregate with QTL for rhizomania resistance // Genome. 2007. V. 50. P. 61–71. <https://doi.org/10.1139/g06-131>
7. Capistrano-Gossmann G.G., Ries D., Holtgräwe D. et al. Crop wild relative populations of *Beta vulgaris* allow direct mapping of agronomically important genes // Nat. Commun. 2017. V. 8. 15708. <https://doi.org/10.1038/ncomms15708>
8. Van der Linden C.G., Wouters D.C., Mihalka V. et al. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. № 2. P. 384–393. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1642-8>
9. Mantovani P., van der Linden G., Maccaferri M. et al. Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat // Genome. 2006. V. 49. № 11. P. 1473–1480. <https://doi.org/10.1139/g06-100>
10. Горюнова С.В., Гашкова И.В., Косарева Г.А. Изменчивость и филогенетические связи вида *Cucumis sativus* L. по данным NBS-профайлинга и RAPD-анализа // Генетика. 2011. Т. 47. № 8. С. 1052–1063.
11. Савельева Е.Н., Борис К.В., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М. Полиморфизм NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) по данным NBS-профайлинга // Генетика. 2016. Т. 52. № 12. С. 1463–1468. <https://doi.org/10.7868/S0016675816120110>
12. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Вариабельность геномных RGA-локусов современных отечественных сортов картофеля: данные NBS-маркирования // С.-хоз. биология. 2021. Т. 56. № 1. С. 32–43. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.1.32rus>
13. Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // BASE. 2006. V. 10. № 2. P. 77–81.
14. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Paleontologia Electronica. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
15. Peakall R., Smouse P.E. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
16. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. and Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
17. Smulders M.J.M., Esselink G.D., Everaert I. et al. Characterization of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers // BMC Genetics. 2010. V. 11. № 41. P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-41>
18. Коваль Е.В., Трифонова А.А., Дедова Л.В. и др. Генетическое разнообразие отечественных и зарубежных гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) по данным AFLP-анализа // Генетика. 2018. Т. 54. № 13. С. 37–40. <https://doi.org/10.1134/S001667581813009X>
19. Simko I., Eujayl I., van Hintum T.J.L. Empirical evaluation of DArT, SNP, and SSR marker-systems for genotyping, clustering, and assigning sugar beet hybrid varieties into populations // Plant Science. 2012. V. 184. P. 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.009>
20. Biancardi E., Panella L.W., Lewellen R.T. Beta Maritima: The Origin of Beets. New York: Springer, 2012. 294 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0842-0>

NBS-LRR Resistance Genes Polymorphism of Sugar Beet Hybrids according to NBS-Profiling Data

A. A. Trifonova^{a, *}, E. R. Paradnya^a, K. V. Boris^a, and A. M. Kudryavtsev^a

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: aichka89@mail.ru*

NBS-profiling was used to study 49 modern Russian and foreign sugar beet hybrids. The detected NBS-LRR resistance genes polymorphism was rather high – 87.77% (74.21% for 15 Russian hybrids and 83.80% for 34 foreign hybrids), for 11 hybrids unique NBS-fragments were detected. Cluster analysis revealed the differentiation of Russian and foreign sugar beet hybrids, which indicates a difference in their sets of resistance genes. In addition, the clustering of a number of foreign hybrids was revealed depending on the seed company.

Keywords: *Beta vulgaris*, genetic diversity, R-genes.