

УДК 633.63:575.2

Новые полиморфизмы в гене *BTCL* сахарной свеклы© 2020 А.С. ХУССЕЙН¹, А.А. НАЛБАНДЯН^{1*}, Т.П. ФЕДУЛОВА¹, И.В. ЧЕРЕПУХИНА¹, Т.И. КРЮКОВА¹, Н.Р. МИХЕЕВА¹, Т.С. РУДЕНКО¹¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Воронеж, 396020

*e-mail: arpnal@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.

После доработки 15.06.2020 г.

Принята к публикации 05.12.2020 г.

Молекулярно-генетическими методами исследован ген *BTCL* (bolting time control 1), контролирующий время цветения растений сахарной свеклы, посредством регуляции работы двух генов-кандидатов: супрессора (flowering time 1) и индуктора (flowering time 2) этого физиологического процесса. Для проведения ПЦР использовали пару праймеров F9/R9, специфичную к области, охватывающей экзон 9, интрон и экзон 10 гена *BTCL*. Впервые у образцов, чувствительных к признаку цветущности (HF1 и VF1), в гене *BTCL* обнаружены нуклеотидные замены в экзоне 10, приводящие к заменам аминокислот в кодируемой полипептидной цепи. На основании результатов проведенного биоинформационного анализа можно сделать вывод, что по наличию определенных полиморфизмов в гене *BTCL* сахарной свеклы с большой долей вероятности можно судить о предрасположенности тех или иных генотипов к раннему цветению. Использование инструмента Geneious Prime для анализа секвенированных последовательностей гена *BTCL*, возможно, позволит выбраковывать генотипы, склонные к раннему цветению, на ранних стадиях селекции.

Ключевые слова: сахарная свекла, ген цветущности, *BTCL*, генетический полиморфизм, ПЦР-анализ, молекулярно-генетические маркеры, селекция

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-49-54

Одним из селекционно важных признаков *Beta vulgaris* L. является время выхода в стрелку. Сахарная свекла — двулетнее растение, вегетирующее в течение первого года. Удлинение стебля (выход в стрелку) с последующим цветением у нее начинается на второй год после выдерживания при низкой температуре в течение определенного периода, сопровождаемого условиями длинного светового дня. Впервые локус *B* (*bolting* — стрелкование), контролирующий ранний выход в стрелку (в первый же год), у коммерческого сорта сахарной свеклы описал О. Мунерати [1]. Позже А. Абеги [2] охарактеризовал ген *B*, контролирующий признак однолетности у свеклы, то есть выбрасывание цветоноса на первом году вегетации, как доминантный. Соответственно двулетние растения, стрелкующиеся после яровизации, имели генотип *bb* по данному признаку. С эволюционной точки зрения локус *B* можно рассматривать как главный переключатель, отвечающий за одно- и двулетний циклы развития рода *Beta* [3, 4]. Перекрестное опыление дикой свеклы *B. maritima* L. с культурной на площадях

производства семян может привести к интрогрессии гена *B* в двулетние возделываемые гибриды, результатом чего будет засорение гибридов растениями с ранним выходом в стрелку и ранней цветущностью. В этом случае неминуемы потери урожая и содержания сахара в продукте, а также возникают проблемы с уборкой урожая. Селекционеры осознают эти проблемы и предпринимают все усилия, чтобы предотвратить попадание пыльцы дикой свеклы в посевы культурной [5].

Локус *B* характеризуется достаточно сложным механизмом действия, играющим ключевую роль в регуляции жизненного цикла всех цветковых растений [6, 7].

Дикие однолетние формы свеклы, в частности *B. maritima*, характеризуются цветением в период длинного светового дня, не требуют яровизации. Культивируемые подвиды *B. vulgaris* относятся к двулетним и требуют яровизации, чтобы начать цветение. Биологическое значение яровизации свеклы двулетней заключается в постепенном снижении экспрессии *FT*-подобного гена

BvFT1 (flowering time), который функционирует как репрессор цветения. После яровизации тормозящее действие этого гена снимается и наблюдается скачок экспрессии другого *FT*-подобного гена *BvFT2* — индуктора цветения [8–10]. Сегодня молекулярно-биологическими методами установлено, что слаженная работа двух вышеуказанных генов осуществляется под строгим контролем гена-регулятора *BTC1* (bolting time control 1). Предполагается, что кодируемые им белки регулируют экспрессию генов *BvFT1* и *BvFT2*. Доказано, что небольшие, но значимые изменения в нуклеотидной последовательности *BTC1* достаточны для того, чтобы превратить однолетний генотип сахарной свеклы в двулетний. [3, 11, 12].

На основании вышесказанного становится очевидным, что одна из важных и актуальных проблем в современной селекции сахарной свеклы — создание устойчивых к цветущности гибридов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал

В исследовании использованы проростки мужско-стерильных линий (МС-линий), опылителей и гибридов сахарной свеклы иностранной селекции фирмы Lion Seeds (Италия), позиционируемые как не устойчивые к цветущности, и отечественные селекционные материалы ВНИИСС (устойчивые к цветущности).

Семена анализируемых образцов *Beta vulgaris* выращивали в горшках диаметром 15 см, заполненных грунтом, при комнатной температуре.

Выделение и анализ ДНК

Для эксперимента использовали листовой аппарат сахарной свеклы, выращенный в течение двух недель. ДНК выделяли с использованием стандартного протокола экстракции 7,5 М ацетатом аммония [13, 14]. Качество образца оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в ТВЕ-буфере (0,1 М трис, 0,1 М борная кислота, 0,05 М ЭДТА, рН 8,0–8,2) и определяли концентрацию ДНК с использованием набора HS QubitR (Thermo Fisher Scientific, США).

Для идентификации нуклеотидных и белковых последовательностей выполняли поиск гомологичных последовательностей в базе данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Дополнительный поиск генов и исследование их функций выполнены с использованием сервера KAAS с параметрами по умолчанию [15]. Функции некоторых генов проверяли вручную с использованием алгоритма BLAST и резервной белковой базы данных [16].

ПЦР-амплификацию проводили на приборе SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific). Поиск оптимальной температуры отжига праймеров осуществляли с помощью реакции ПЦР с температурным градиентом. Реакцию амплификации проводили согласно следующему протоколу:

- 1) 95 °С в течение 5 мин (предварительная денатурация для активации ДНК-полимеразы Hotstart);
- 2) 95 °С в течение 30 с (денатурация в начале амплификационного цикла);
- 3) 58 °С в течение 1 мин 20 с (отжиг праймеров);
- 4) 72 °С в течение 1 мин 30 с (элонгация) — 33 цикла;
- 5) 72 °С в течение 5 мин (конечная элонгация).

Для обнаружения гена, контролирующего время цветения, в работе использовали пару праймеров, F9/R9, сконструированную в программе Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>):

F9 — 5'-GCAAGCAATCATGGGAGCA-3'

R9 — 5'-GTTTCCGGAATCGCGTTTGA-3'.

Для регистрации продуктов ПЦР-амплификации проводили аналитический электрофорез в 1,3%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Для визуализации использовали УФ-трансиллюминатор Vilber Lourmat (Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения селекционного материала сахарной свеклы на наличие гена *BTC1*, контролирующего работу основных генов устойчивости к цветущности: *FT1* и *FT2*, — использована сконструированная нами в программе Primer BLAST пара праймеров F9/R9, специфичная к гену *BTC1* и охватывающая половину экзона 9, интрон и весь экзон 10.

В результате тестирования 12 селекционно ценных образцов сахарной свеклы методом ПЦР с использованием пары праймеров F9/R9 у 8 генотипов выявлен один ампликон размером 1 000 п. н.: № № 3 (МС17070), 4 (F1 18092), 5 (ОП 18094), 26 (HF1), 30 (МС 1, ВИР), 31 (МС 2, ВИР), 36 (BF1), 38 (R1F1) (рис. 1).

Среди образцов, в которых обнаружен ожидаемый ПЦР-продукт, присутствуют как цветущие, так и нецветущие растения. Объясняется это наличием полиморфизма определенных нуклеотидов в гене *BTC1*, в том числе и однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). В данном случае они встречаются в экзонах 9 и 10 и, возможно, приводят к преобразованию цветущего генотипа в нецветущий [3]. Для проверки этой гипотезы мы провели секвенирование нескольких ампликонов: 3, 26, 36.

3 4 5 26 27 30 31 36 37 38 41 42 K⁻ M

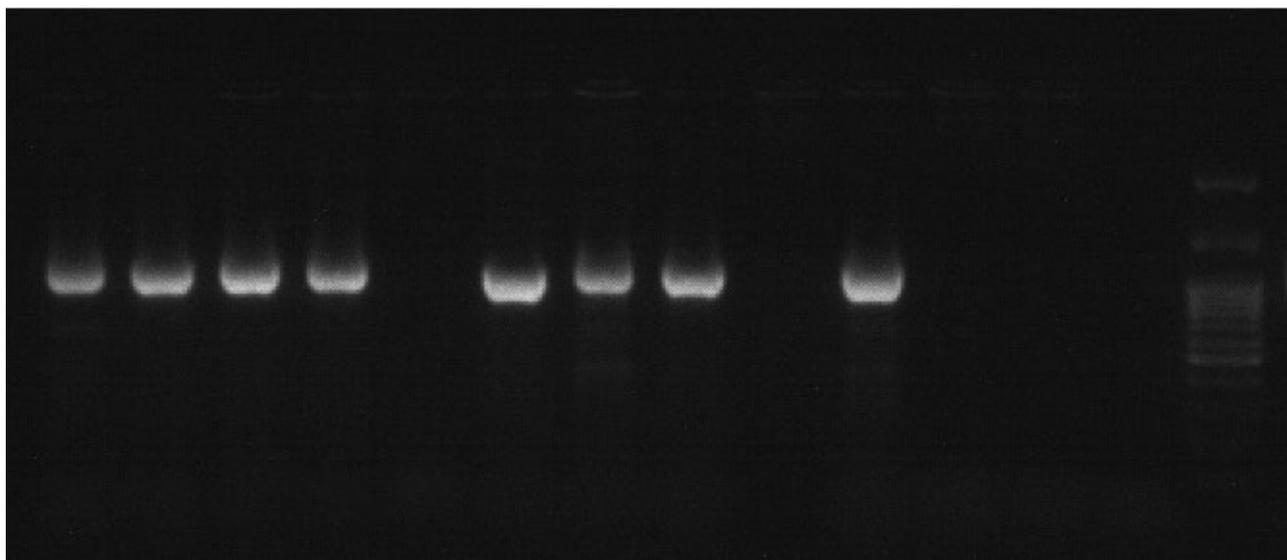


Рис. 1. Анализ амплифицированных с праймерами F9/R9 ДНК-фрагментов 12 генотипов сахарной свеклы. Обозначения образцов: 3 — MS17070; 4 — F1 18092; 5 — ОП 18094; 26 — HF1; 27 — *Beta maritima*; 30 — MS 1 (ВИР); 31 — MS 2 (ВИР); 36 — BF1; 37 — 1186 РС 8×7 цветущий; 38 — R1F1; 41 — 1186 РС 8×7 нецветущий; 42 — RF1; K⁻ — ПЦР-смесь без ДНК; M — маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 1. Analysis of DNA fragments amplified with primers F9/R9 for 12 genotypes of sugar beet. Sample designations: 3 — MS17070; 4 — F1 18092; 5 — Pollinator 18094; 26 — HF1; 27 — *Beta maritima*; 30 — MS 1 (VIR); 31 — MS 2 (VIR); 36 — BF1; 37 — 1186 (VNIISS) 8×7 flowering; 38 — R1F1; 41 — 1186 (VNIISS) 8×7 non-flowering; 42 — RF1; K⁻ — PCR mixture without DNAs; M — GeneRuler™ DNA molecular weight marker (Thermo Fisher Scientific).

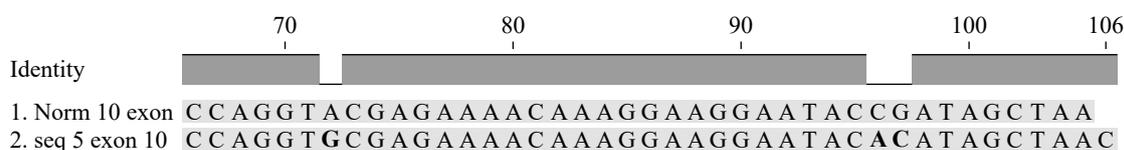


Рис. 2. Локализация трех нуклеотидных полиморфизмов в экзоне 10 гена *BTC1* образца № 26 (HF1), относящегося к цветущему генотипу (2), при сравнении с контрольным образцом (1) (здесь и далее: нецветущий генотип; GenBank, Acc. No HQ709091.1).

Fig. 2. Localization of three nucleotide polymorphisms in exon 10 of the *BTC1* gene in sample #26 (HF1), related to the flowering genotype (2) when compared with the control sample (1) (hereinafter: non-flowering genotype; GenBank Acc. No HQ709091.1).

Результаты прочтения нуклеотидных последовательностей частично экзона 9, интрона и экзона 10 в ДНК сорта № 26 (HF1), относящегося к цветущему генотипу, проанализированы в программе Geneious Prime (<https://www.geneious.com/prime/>). При сравнении селекционного номера 26 и контрольного образца (GenBank, Acc. No HQ709091.1), обладающего устойчивым генотипом с двулетним циклом развития, подтверждено наличие известных SNP, характерных для цветущих генотипов. Также в генотипе образца № 26 выявлено два новых нуклеотидных полиморфизма в экзоне 10. На рис. 2 представлен фрагмент секвенированного по Сэнгеру экзона 10, где наглядно продемонстрировано положение известного SNP A/G в позиции 72, а также двух новых замен: C96A и G97C.

В ходе сравнительного анализа, проведенного в программе Geneious Prime, выявлен гипотетический вариант трансляции нуклеотидной последовательности экзона 10 с идентифицированными нуклеотидными заменами. Так, удалось проанализировать, какие из них являются действительно значимыми и изменяют аминокислотный состав кодируемых полипептидов (рис. 3), что подразумевает и возможное изменение функциональной активности кодируемого геном *BTC1* белка.

При сравнении последовательностей гена *BTC1* контрольного образца с устойчивым генотипом с двулетним циклом и сорта № 26 в последнем выявлено 8 нуклеотидных замен и 5 делеций в экзоне 9 (рис. 4a) и вставка длиной 22 п. н. в прилегающем интроне (рис. 4b).

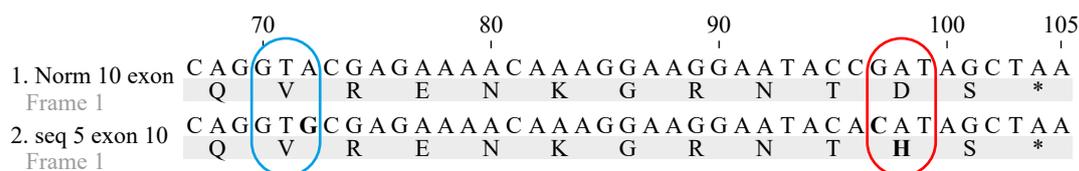


Рис. 3. Дедуктивная аминокислотная последовательность, кодируемая фрагментом экзона 10 гена *BTCL*, с выявленными нуклеотидными заменами в образце № 26 (2). Красным овалом выделена значимая (nonsynonymous) однонуклеотидная замена, синим — незначимая (synonymous). Сравнение проведено по той же области гена *BTCL* контрольного образца (1).

Fig. 3. Deductive amino acid sequence encoded by the exon 10 fragment of the *BTCL* gene with identified nucleotide substitutions in sample #26 (2). A significant (non-synonymous) single nucleotide substitution is marked with a red oval, and an insignificant one (synonymous) is marked with blue. Comparison was made for the same region of the *BTCL* gene of the control sample (1).

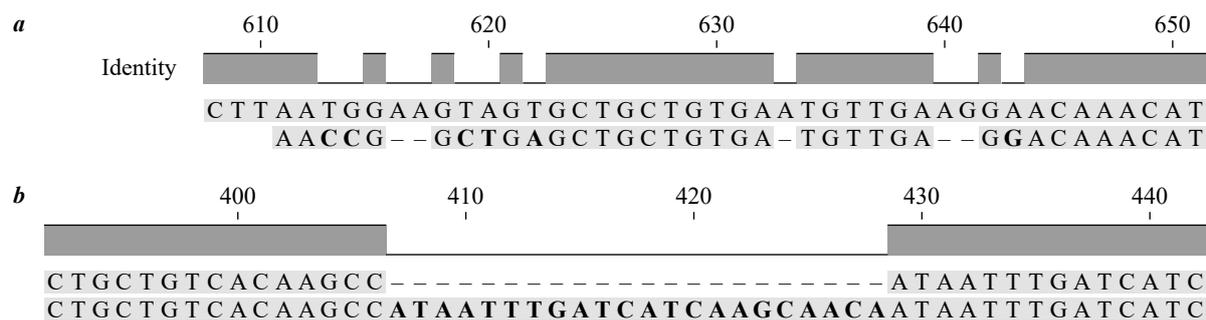


Рис. 4. Локализация нуклеотидных замен в экзоне 9 (a) и 22-нуклеотидной вставки в прилегающем интроне (b) гена *BTCL* образца № 26 при сравнении с последовательностью контрольного образца.

Fig. 4. Localization of nucleotide substitutions in exon 9 (a) and 22-nucleotide insertion in the adjacent intron (b) of the *BTCL* gene in sample #26 when compared with the sequence of the control sample.

Пока мы не знаем, характерна ли идентифицированная нами 22-нуклеотидная вставка в интроне 9 гена *BTCL* для чувствительных генотипов сахарной свеклы, это можно выяснить в дальнейшем — при изучении большого числа образцов, склонных к цветущности.

Итоги прочтения нуклеотидных последовательностей экзона 10 образца № 3 (MC 17070), который позиционируется селекционерами как нецветущий генотип, также были проанализированы при помощи программы Geneious Prime. В сравнении с контрольным образцом (нецветущий генотип) селекционный номер 3 отличался только наличием одного известного SNP — A/G в позиции 72, — который, как показано выше, не изменяет аминокислотный состав кодируемого белка (см. рис. 3).

В тестируемом образце № 36 (BF1) в результате секвенирования по Сэнгеру выявлено две замены в экзоне 10: A94T и C95G, — которые приводят к замене аминокислоты треонин на цистеин (T/C) в кодируемом белке.

При помощи программы Geneious Prime показан гипотетический вариант трансляции нуклеотидной последовательности полиморфных вариантов экзона 10 для всех трех проанализированных генотипов (рис. 5).

Для селекционера и селекционного процесса в целом данный алгоритм исследований имеет большое практическое значение, так как позволяет с определенной долей вероятности говорить о предрасположенности тех или иных генотипов к раннему цветению. Знания об этом необходимо при посеве культуры в разных климатических условиях.

По результатам проведенного молекулярно-генетического анализа можно отметить, что в геноме исследованных генотипов *Beta vulgaris* L. содержится полноценный ген *BTCL*, контролирующий работу двух генов-кандидатов цветущности: *FT1* и *FT2*. По результатам генетического анализа в экзонах 9 и 10 гена *BTCL* селекционных номеров 26 (HF1) и 36 (BF1) сахарной свеклы подтверждено наличие известных нуклеотидных полиморфизмов, характерных для цветущих генотипов. Кроме того, в экзоне 10 этих генотипов выявлены новые, ранее не описанные в литературе полиморфизмы, что имеет важное теоретическое и практическое значение. На основании полученных результатов можно говорить о необходимости дальнейшего изучения первичной структуры гена *BTCL* для идентификации генетических маркеров цветущности сахарной свеклы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

НОВЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ В ГЕНЕ *BTC1* САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

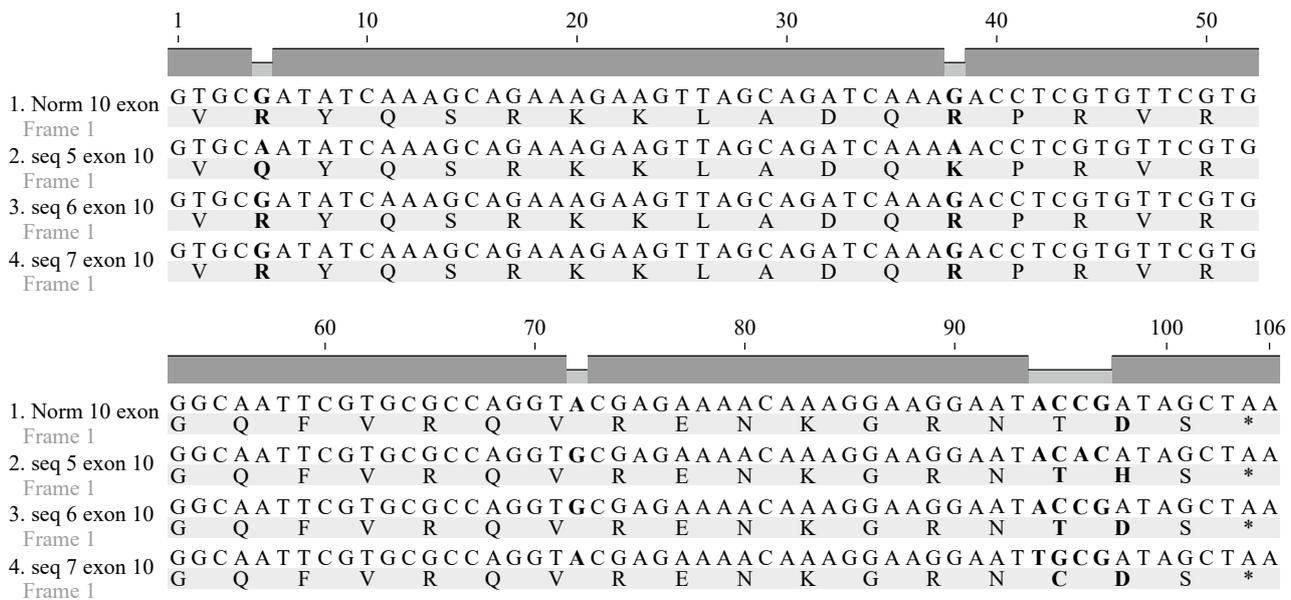


Рис. 5. Дедуктивные аминокислотные последовательности, кодируемые полиморфными вариантами фрагмента экзона 10 гена *BTC1*. Обозначения: 1 — контроль (нецветушный генотип), 2 — №26 (HF1), 3 — №3 (MC 17070), 4 — №36 (BF1).

Fig. 5. Deductive amino acid sequences encoded by polymorphic variants of the exon 10 fragment of the *BTC1* gene. Designations: 1 — control (non-flowering genotype), 2 — #26 (HF1), 3 — #3 (MS 17070), 4 — #36 (BF1).

ЛИТЕРАТУРА

- Munerati O., Reihe A. L'eredita della tendenza alla annualita nella commune barbabietola coltivata. *Zeitschrift für Züchtung, Pflanzenzüchtung*, 1931, 17, 84–89.
- Abegg F.A. A genetic factor for the annual habit in beets and linkage relationship. *J. Agr. Res.*, 1936, 53, 493–511.
- Pin P., Zhang W., Vogt S., et al. The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet. *Curr. Biol.*, 2012, 22, 1095–1101. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.007
- Biscarini F., Stevanato P., Broccanello C., et al. Genomic predictions for binomial traits in sugar beet populations. *BMC Genet.*, 2014, 87(15), 3–9. doi: 10.1186/1471-2156-15-87
- Kagami H., Kurata M., Matsuhira H., et al. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1223, 335–347. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_27
- Mutasa-Gottgens E., Qi A., Zhang W., et al. Bolting and flowering control in sugar beet: relationships and effects of gibberellins, the bolting gene *B* and vernalization. *AoB Plants*, 2010, plq012. doi: 10.1093/aobpla/plq012
- Tränkner C., Lemnian I.M., Emrani N., et al. A detailed analysis of the BR1 locus suggests a new mechanism for bolting after winter in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Front. Plant Sci.*, 2016, 7, 1662. doi: 10.3389/fpls.2016.01662
- Dally N., Eckel M., Batschauer A., et al. Two *CONSTANS-LIKE* genes jointly control flowering time in beet. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 16120. doi: 10.1038/s41598-018-34328-4
- Pfeiffer N., Tränkner C., Lemnian I., et al. Genetic analysis of bolting after winter in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 2014, 127, 2479–2489. doi: 10.1007/s00122-014-2392-x
- Tränkner C., Pfeiffer N., Kirchhoff M., et al. Deciphering the complex nature of bolting time regulation in *Beta vulgaris*. *Theor. Appl. Genet.*, 2017, 130(8), 1649–1667. doi: 10.1007/s00122-017-2916-2
- Höft N., Dally N., Jung Ch. Sequence variation in the bolting time regulator *BTC1* changes the life cycle regime in sugar beet. *Plant Breeding*, 2018, 137(3), 412–422. doi: 10.1111/pbr.12579
- Höft N., Dally N., Hasler M., et al. Haplotype variation of flowering time genes of sugar beet and its wild relatives and the impact on life cycle regimes. *Front. Plant Sci.*, 2018, 8, 2211. doi: 10.3389/fpls.2017.02211
- Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Bogacheva N.N. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis. *Russ. Agricult. Sci.*, 2014, 40(3), 177–178. https://doi.org/10.3103/S1068367414030082
- 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. https://doi.org/10.1007/BF02773351
- Moriya Y., Itoh M., Okuda S., et al. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35, 182–185. doi: 10.1093/nar/gkm321
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215(3), 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

New Nucleotide Polymorphisms in the *BTC1* gene of Sugar Beet

A.S. HUSSEIN¹, A.A. NALBANDYAN^{1*}, T.P. FEDULOVA¹, I.V. CHEREPUKHINA¹,
T.I. KRYUKOVA¹, N.R. MIKHEEVA¹, T.S. RUDENKO¹

¹ *A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Voronezh, 396030, Russia*

**e-mail*: arpna1@rambler.ru

Received April 29, 2020

Revised June 15, 2020

Accepted December 5, 2020

Abstract—The flowering time control gene of various sugar beet plants has been studied. The *BTC1* gene is a regulator for the suppressor (flowering time 1) and inducer (flowering time 2) genes of this physiological process. The F9/R9 primer pair was used for polymerase chain reaction; these primers are specific to the *BTC1* gene region containing exon 9, as well as intron and exon 10. For the first time, nucleotide substitutions in exon 10 of *BTC1* gene were identified in bolting sensitive samples (HF1 and BF1), which led to a change in the amino acid composition of the coded polypeptide chain. Based on the results of bioinformatic analysis, it can be assumed that certain nucleotide polymorphisms in the *BTC1* gene may determine with a high probability the predisposition of sugar beet genotypes to early flowering. The use of the Geneious Prime tool for the analysis of the *BTC1* gene sequences may allow the culling of genotypes prone to early flowering at early stages of selection.

Key words: sugar beet, flowering gene, *BTC1*, genetic polymorphism, PCR, molecular genetic markers, selection

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-49-54