

ВОЛКОВА Н.Е.^{1, 2✉}, СЛІЩУК Г.І.¹, СІЧКАР В.І.², ЗАХАРОВА О.О.¹¹ ТОВ «Котекна Україна Лімітед»,

Україна, 65114, м. Одеса, вул. Люстдорфська дорога, 140а, ORCID: 0000-0003-1828-9044, 0000-0003-4245-8557

² Одеська державна сільськогосподарська дослідна станція Національної академії аграрних наук України,

Україна, 67667, Одеська область, Біляївський район, смт. Хлібодарське, вул. Маяцька дорога, 24, ORCID: 0000-0002-9333-4872

✉ natalia.volkova@cotecna.com

ОДНОНУКЛЕОТИДНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА, ЩО КОДУЄ АЦЕТОГІДРОКСИАЦИДСИНТАЗУ, НУТУ ЗВИЧАЙНОГО ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ

Мета. Молекулярно-маркерний аналіз гена ANAS нуту звичайного. Для досягнення мети виконували такі завдання: розробка та опрацювання SNP-маркерів гена ANAS нуту, асоційованих із гербіцидотолерантністю, генотипування сортів і зразків нуту за допомогою цих маркерів. **Методи.** ЦТАБ-метод екстрагування та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція в режимі «реального часу». **Результати.** Встановлено видоспецифічність KASP-маркера гена ANAS1 щодо нуту звичайного: ампліфікація ДНК зразків сочевиці, кукурудзи не відбулася. KASP-генотипування трьох сортів нуту української селекції та 28 зразків нуту колекції ICRISAT продемонструвало наявність «дикої» немутантної С-алелі. За використання SNP-системи праймерів, розроблених авторами, 58 зразків нуту охарактеризовані як гомозиготні за геном ANAS та не містили мутантної Т-алелі. **Висновки.** За KASP-генотипуванням, 31 зразок нуту містив «дику» немутантну С-алель, що асоціюється зі сприйнятливістю до імідазолінових гербіцидів. За SNP-аналізом, під час використання розробленої авторами системи праймерів 58 зразків нуту містили С-алель. Відсутність мутантної Т-алелі, пов'язаної із стійкістю, свідчить про низький рівень толерантності проаналізованих зразків до імідазолінових гербіцидів.

Ключові слова: нут звичайний, ген ацетогідроксиацидсинтази, однострунковий поліморфізм, стійкість до гербіцидів.

За останні 70 років помічено широке успішне використання синтетичних гербіцидів

проти сотень видів бур'янів, але ефективність таких препаратів із часом знижується внаслідок розвитку стійкості до гербіцидів. Це, в свою чергу, призводить до кількісних та якісних втрат урожаїв сільськогосподарських культур.

Ефективність гербіциду залежить від того, яка його частина потрапляє в клітину рослини і як довго його активна форма залишається доступною для взаємодії з місцем його дії (цільовим сайтом). За даними Комітету з вивчення стійкості до гербіцидів (Herbicide Resistance Action Committee), призначення якого проводити моніторинг появи стійкості, розробку і проведення заходів щодо її подолання, існує 26 сайтів молекулярних мішеней понад 260 активних інгредієнтів комерційних гербіцидів [1].

Молекулярні механізми стійкості до гербіцидів умовно розділяють на дві категорії: стійкість до гербіцидів, що пов'язана з сайтом дії (target-site resistance, TSR), та стійкість, що не пов'язана з сайтом дії (nontarget-site resistance, NTSR). Механізми NTSR передбачають активацію систем, які перешкоджають потраплянню гербіциду до цільового сайту, зменшують концентрацію протеїну, який взаємодіє з цільовим сайтом, зменшують інгібування цільового сайту завдяки зменшенню поглинання та транслокації гербіциду, посилення секвестрування гербіциду, посилення деградації гербіциду до менш токсичних сполук. Механізми TSR змінюють послідовність амінокислот та/або рівень експресії цільового ензиму, зменшуючи здатність гербіциду інгібувати цей ензим або вимагаючи більшої концентрації гербіциду для досягнення адекватного інгібування. Найпоши-

ренішим механізмом TSR є мутація одного нуклеотиду в гені, що кодує протеїн, із яким зв'язується гербіцид, що призводить до заміни однієї амінокислоти, порушуючи здатність гербіциду зв'язуватися з протеїном, не порушуючи функції ензиму. Механізми TSR і NTSR можуть поєднуватися на індивідуальному рівні для отримання більш високих рівнів стійкості.

Найбільш ефективними гербіцидами, включаючи імідазолінонові, що широко застосовуються в аграрному секторі багатьох країн, є інгібітори ензиму ацетолактатсинтази [2]. Ацетолактатсинтаза (acetolactatsynthase, ALS; EC 2.2.1.6) також відома як ацетогідроксиацетатсинтаза (acetohydroxyacid synthase, AHAS) є ключовим ензимом у синтезі амінокислот із розгалуженим ланцюгом: валіну, лейцину, ізолейцину. Стійкість забезпечує мутація гена, що кодує AHAS, яка призводить до заміни проліну-197 на гістидин чи триптофан [3]. Відтак встановлено 22 пов'язані зі стійкістю заміни амінокислот у восьми сайтах AHAS, однак заміна проліну-197 на інші амінокислоти (їх може бути 11) трапляється найчастіше [4]. Оскільки заміщення амінокислот може відбуватися в багатьох сайтах ензиму, це призводить до збільшення стійкості до різних класів речовин у межах групи інгібіторів AHAS. Молекулярно-структурні дослідження показали, що сайти зв'язування з гербіцидами і каталітичний просторово розділені, а деякі мутації чинять незначний ефект на функціонування ензиму.

Культурні рослини з пов'язаною з сайтом дії стійкістю до гербіцидів можуть бути отримані шляхом клітинної селекції, мутагенезу, добору і розмноження рослин із природною стійкістю, а також із використанням методів генетичної інженерії. Наприклад, отримано сорти соняшнику, стійкого до гербіцидів – похідних імідазолінону, які є інгібіторами AHAS, з використанням стійкого дикорослого соняшнику; сорти ріпаку зі стійкістю до триазинів шляхом схрещування з його дикорослим родичем суріпкою, яка є стійкою до цих гербіцидів [5].

У геномі нуту звичайного (*Cicer arietinum* L.), важливої сільськогосподарської культури [6], ідентифіковано точкову мутацію в гені AHAS1 – цитозин-675/тимін-675, що є результатом заміни амінокислоти аланін-205 на валін-205. Заміна амінокислоти в AHAS1 запобігає приєднанню гербіциду до ензиму, що надає нуту стійкості до імідазолінонових гербіцидів [7].

Сучасний селекційний процес здійснюється за використання молекулярно-маркерного добору. Однією з найбільш популярних технологій розробки молекулярних маркерів генів важливих агрономічних ознак є конкурентна алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція (Kompetitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction, KASP) для ідентифікації біалельних поліморфізмів типу однонуклеотидних заміни (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) та вставок/делецій (InDel) [8].

Мета наших досліджень полягала в молекулярно-маркерному аналізі гена AHAS нуту звичайного. Для досягнення мети виконували такі завдання: розробка та опрацювання SNP-маркерів гена AHAS нуту, асоційованих із гербіцидотолерантністю, генотипування сортів і зразків нуту за допомогою цих маркерів.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували 58 зразків нуту з колекцій Одеської державної сільськогосподарської дослідної станції НААН України (ОДСГДС), Міжнародного науково-дослідного інституту сільськогосподарських культур у напівзасушливих тропіках (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, ICRISAT) та Міністерства сільського господарства США (United States Department of Agriculture, USDA); сорти сочевиці «БК», «ЕК», «ЄЗ»; лінія кукурудзи «Х» (в лапках – умовні позначення назв сортів та ліній). Зразки сочевиці та кукурудзи використано для перевірки специфічності KASP-маркера.

Екстрагування та очищення ДНК виконували з розмелу насіння ЦТАБ-методом [9].

Ампліфікацію здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі «реального часу» на термоциклері «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» (Applied Biosystem, США). Для KASP-генотипування реакційна суміш містила 2x KASP Master Mix, KASP Assay mix, 50 нг ДНК. Використовували флуоресцентні барвники: FAM для С-алелі, VIC для Т-алелі. Температурно-часові умови ПЛР: 1 цикл: 94°C, 15 хв; 10 циклів: 94°C, 20 с, 61–55°C, 60 с (зниження 0,6°C/цикл); 26 циклів: 94°C, 20 с, 55°C, 60 с; зчитування 1 цикл: 37°C, 3 хв. Для SNP-генотипування з використанням розробленої авторами системи праймерів реакційна суміш містила 2x BioRad iTaq Master Mix, 10 мкМ праймери (прямий і зворотний), 50 нг ДНК. Використовували флуоресцентний барвник:

SYBR Green для С-алелі і для Т-алелі. Температурно-часові умови ПЛР: 1 цикл: 95°C, 10 хв; 35 циклів: 95°C, 15 с, 68°C, 90 с. Для аналізу результатів ампліфікації використано програмне забезпечення термоциклера.

Результати та обговорення

SNP-аналіз за використанням KASP-маркера. Для генотипування зразків нуту використано KASP-маркер гена AHAS1 (хромосома 5), функціонально перевірений на популяції рекомбінантних інбредних ліній [7]. Аналізування зразків за KASP-технологією призводить до розподілу їх на два гомозиготних та гетерозиготний генотипи.

Для опрацювання KASP-технології аналізували сорти нуту 'Триумф', 'Пам'ять', 'Зехавет', а для перевірки специфічності маркеру – сорти сочевиці та лінію кукурудзи.

За використання KASP-маркера отримано кластеризацію сортів як таких, що містять «дику» немутантну С-алель, яка асоціюється з сприйнятливістю до гербіцидів. Ампліфікація у зразків сочевиці та кукурудзи не відбулася, отже, маркер є видоспецифічним (рис. 1).

Проведено генотипування 28 зразків нуту колекції ICRISAT, що охарактеризовані як гербіцидотолерантні за KASP-маркером. Результа-

том стало формування одного кластера з алеллю С, яка асоціюється з сприйнятливістю до імідазолінових гербіцидів (рис. 2).

Отже, за KASP-маркером гена AHAS1, всі зразки нуту колекції ICRISAT охарактеризовані як нестійкі до гербіцидів, тоді як за характеристиками ICRISAT всі зразки мають статус стійких до гербіцидів.

Слід зазначити, що аналогічні результати отримано під час генотипування 126 зразків нуту (сорти 'JG11', 'KAK2', 40 мутантних ліній, 84 селекційні лінії) [10]. Цей рослинний матеріал охарактеризовано щодо стійкості до імідазолінових гербіцидів у польових умовах: вісім – нестійкі (80–100% загибель), 24 – помірно стійкі, інші – сприйнятливі. У ході генотипування за KASP-маркером для 124 зразків отримано флуоресцентний сигнал. Ці зразки сформували єдиний кластер з С-алеллю, яка асоціюється зі сприйнятливістю до імідазолінових гербіцидів. Також авторами проведено пошук іншого SNP-алельного варіанта, асоційованого зі стійкістю до гербіцидів, та його конвертацію в CAPS-маркер (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, рестрикційні фрагменти ампліфікованих поліморфних послідовностей).

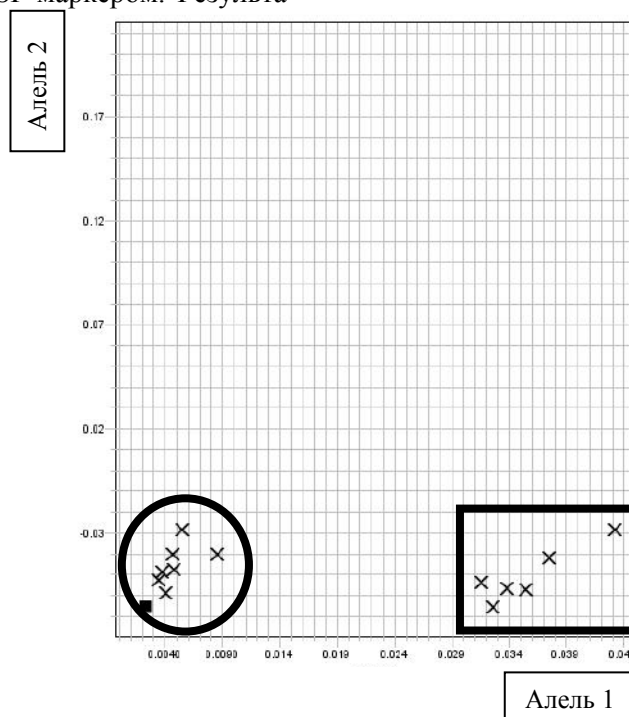


Рис. 1. Графік аельного розподілу за KASP-маркером гена AHAS1 сортів нуту 'Триумф', 'Пам'ять', 'Зехавет' (прямокутна рамка) та сортів сочевиці й лінії кукурудзи (кругла рамка). Хрестиками позначено зразки, квадратом – негативний контроль. Алень 1: С-алель дикого типу, алель 2: Т-алель – мутантний алель. Одиниці відображають нормалізовані інтенсивності флуоресценції репортерних барвників.

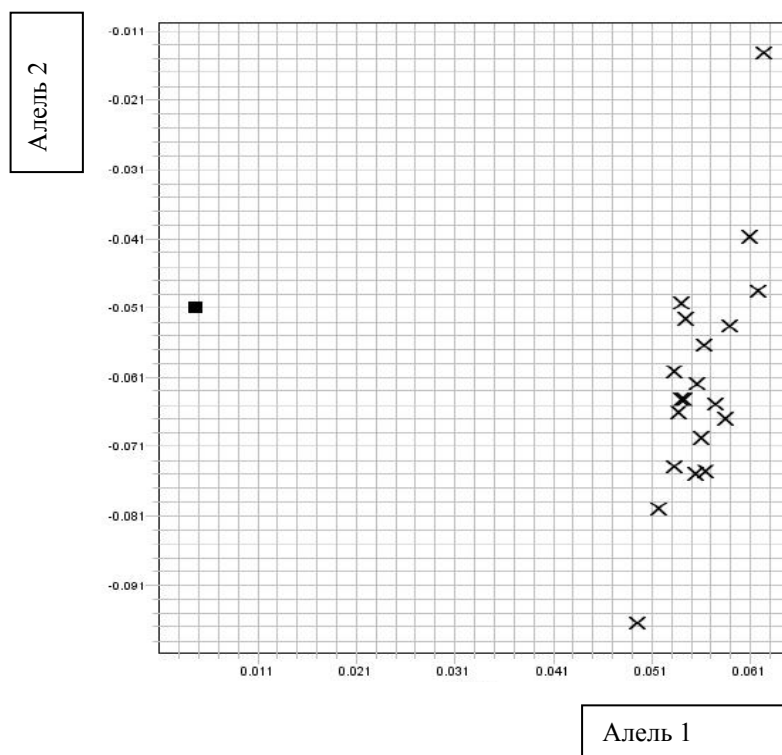


Рис. 2. Графік алельного розподілу за KASP-маркером гена ANAS1 зразків нуту ICRISAT (позначено хрестиками), квадратом позначено негативний контроль. Алель 1: С-алель дикого типу, алель 2: Т-алель – мутантний алель. Одиниці відображають нормалізовані інтенсивності флуоресценції репортерних барвників.

За цим маркером проаналізовано 40 генотипів нуту з різним фенотиповим проявом стійкості до гербіцидів. Усі генотипи показали схожий розподіл фрагментів, що свідчить про відсутність варіацій в окресленому локусі. Автори зробили висновок: оскільки в дослідженні не брали участь генотипи з високою стійкістю до гербіцидів, необхідним є подальший скринінг зразків щодо стійкості до гербіцидів, секвенування ампліконів гена ANAS для ідентифікації альтернативних алелей та розробки діагностичного маркера. Відсутність асоціації між результатами KASP-генотипування зразків нуту колекції ICRISAT (а саме наявність лише С алелі) та характеристиками зразків щодо гербіцидотолерантності призвела до необхідності розробки іншого маркера.

SNP-аналіз за використання розробленої авторами системи праймерів. За результатами біоінформатичного аналізу, проведеного авторами раніше [11], розроблено дизайн праймерів: CicerF – ccctaacccgttccaaaataa, CicerR/C – acgatgggggtttcttgaaaaag, CicerR/T – acgatgggggtttcttgaaaaa.

Цю систему використано для генотипування 58 зразків нуту колекцій ICRISAT, USDA та ОДСГДС, в т. ч. і тих, що були залучені в

KASP-генотипування. Ампліфікація відбулася в усіх зразках лише за використання пари праймерів, специфічних до С-алелі дикого типу, і не відбулася для мутантної Т-алелі; Ст варіювали в межах 29,37–33,11 (рис. 3). Це свідчить про те, що всі досліджені зразки були гомозиготними за окресленим геном і містили лише С-алель дикого типу. Зразків, що містили мутантну алель Т, не виявлено.

Отже, за SNP-маркером гена ANAS1 отримані результати аналогічні тим, що отримані за використання KASP-маркера.

Висновки

За результатами KASP-генотипування, 31 зразок нуту містив «дику» немутантну С-алель, яка асоціюється зі сприйнятливістю до імідазолінових гербіцидів.

За результатами SNP-аналізу, під час використання розробленої авторами системи праймерів 58 зразків нуту містили С-алель. Відсутність мутантної Т-алелю, пов'язаної із стійкістю, свідчить про низький рівень толерантності проаналізованих зразків до імідазолінових гербіцидів-інгібіторів ензиму ацетолактатсинтази.

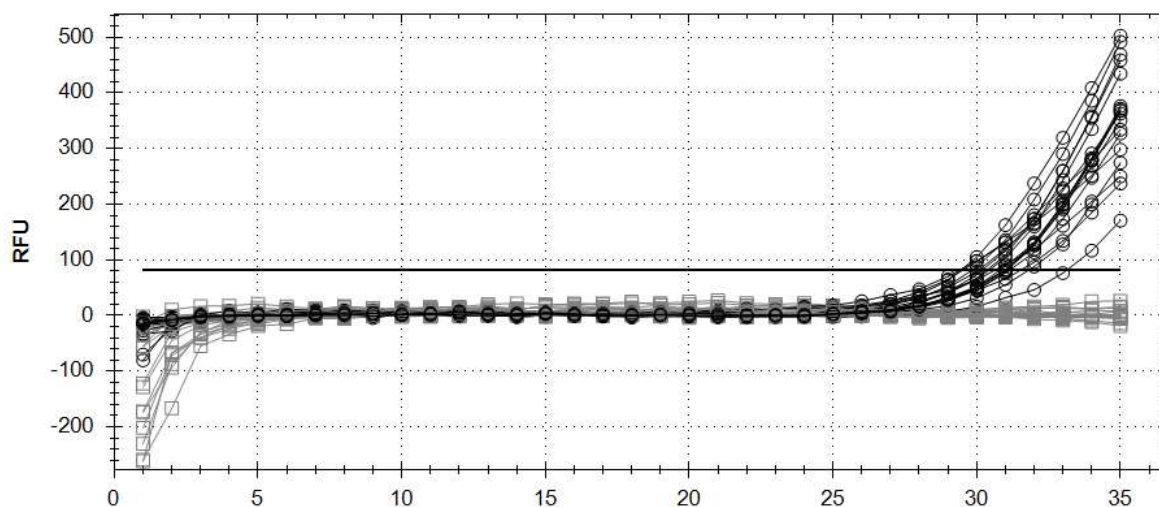


Рис. 3. Графік ампліфікації зразків нуту колекції ICRISAT. С-алель дикого типу позначено кружечками, мутантну Т-алель – квадратами. На осі абсцис позначено цикли, на осі ординат – відносні одиниці флуоресценції (Relative Fluorescent Units, RFU).

References

1. Herbicide Resistance Action Committee. HRAC Mode of Action Classification 2020 Map. 2020. <https://hracglobal.com/tools/hrac-modeof-action-classification-2020-map>.
2. Garcia M., Nouwens A., Lonhienne T. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. Vol. 114 (7). E1091-E1100. doi: 10.1073/pnas.1616142114.
3. Guttieri M., Eberlein C., Mallory-Smith C., Thill D., Hoffman D. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and -susceptible weed biotypes. 1992. *Weed Sci.* Vol. 40. P. 670–676. <http://www.jstor.org/stable/4045263>.
4. Tranel P., Wright T. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? 2002. *Weed Sci.* Vol. 50. P. 700–712.
5. Duke S. Biotechnology: herbicide-resistant crops. In: *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (Van Alfen N., ed), Elsevier, San Diego. 2014. P. 94–116.
6. Cakir O., Ucari C., Tarhan C. Nutritional and health benefits of legumes and their distinctive genomic properties. *Food Sci. Technol.* 2019. doi: 10.1590/fst.42117.
7. Thompson C., Taran B. Genetic characterization of the acetohydroxyacid synthase (AHAS) gene responsible for resistance to imidazolinone in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2014. Vol. 127. P. 1583–1591. doi: 10.1007/s00122-014-2320-0
8. He C., Holme J., Anthony J. SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1145. 12 p. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_7.
9. Rogers, S., Bendich, A. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht. 1989. doi: 10.1007/978-94-009-0951-9.
10. Teggi A. Identification and characterization of herbicide tolerant mutant lines using SNP marker(s) in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). 2017. <http://oar.icrisat.org/id/eprint/10264>.
11. Slisichuk H., Volkova N., Zakharova O., Korchmaryova A. Bioinformatic analysis of chickpea acetohydroxyacid synthase gene. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2019. Vol. 24. P. 345–349. [in Ukrainian]

VOLKOVA N.^{1,2}, SLISHCHUK H. ¹, SICHKAR V. ², ZAKHAROVA O. ¹

¹ *Cotecna Ukraine Limited, Ukraine, 65114, Odessa, Lustdorfska doroga str., 140a*

² *Odessa State Agricultural Research Station of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 67667, Odessa region, Bilyaiv district, Khllybodarske, Lighthouse doroga str., 24*

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE CHICKPEA GENE ENCODING ACETOHYDROXYACID SYNTHASE: MOLECULAR-GENETICAL ANALYSIS

Aim. Chickpea AHAS gene molecular-marker analysis. To achieve this aim following tasks were set: chickpea AHAS gene SNP markers research and development, chickpea varieties and samples genotyping by the markers. **Methods.**

CTAB method of DNA isolation and purification, real-time polymerase chain reaction. **Results.** Chickpea AHAS1 gene KASP gene specificity was found: there were no DNA amplification with lens and maize samples observed. Three Ukrainian chickpea varieties and 28 ICRISAT collection samples KASP genotyping detected only wild-type C-allele. Authors own SNP markers 58 chickpea samples genotyping showed that AHAS1 gene within samples was homozygous, no mutant T allele was detected. **Conclusions.** 31 chickpea samples contained wild-type C-allele by KASP genotyping, which is associated with imidazoline herbicide susceptibility. 58 chickpea samples contained C-allele by authors own SNP markers genotyping. Mutant T-allele that is associated with tolerance absence indicates researched samples imidazole herbicide tolerance low level.

Keywords: chickpea, acetohydroxyacid synthase gene, single nucleotide polymorphism, herbicide resistance.