

Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) =Вестник науки Казахского агротехнического исследовательского университета имени Саке-на Сейфуллина (междисциплинарный). – Астана: С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті, 2023. -№ 3 (118). - Б.125-139. - ISSN 2710-3757, ISSN 2079-939X

doi.org/ 10.51452/kazatu.2023.3 (118).1435
ӘОЖ 633:41/44:577.21

ҚАНТ ҚЫЗЫЛШАСЫ ҮЛГІЛЕРІНІҢ ҚЫШҚЫЛДЫ ХИТИНАЗА ГЕНДЕРІН ГЕНОТИПТЕУ ҮШІН ASQ ТЕХНОЛОГИЯСЫН АПРОБАЦИЯЛАУ

Амангелдиева Айгүл

Магистр

«Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС

Алмалыбақ ауылы, Қазақстан

E-mail: aigul_seidinabiyeva@inbox.ru

Ержебаева Раушан

Биология ғылымдарының кандидаты

«Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС

Алмалыбақ ауылы, Қазақстан

E-mail: raushan.yerzhebayeva@zir.kz

Табынбаева Лайла

PhD

«Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС

Алмалыбақ ауылы, Қазақстан

E-mail: tabynbaeva.lyaylya@mail.ru

Түйін

Қазақстанның қызылша егетін өңірлерінде қант қызылшасын тұрақты өсіруге байланысты тамыр шірік ауруын тудыратын патогендік микроорганизмдердің жинақталуымен топырақтың жоғары инфекциялануы байқалады. Бұл мәселенің шешімі *Fusarium* саңырауқұлақтарынан туындаған тамыр шірік ауруына төзімді қант қызылшасының жаңа будандарын алу және енгізу болып табылады. Тамыр шірік ауруына төзімді генотиптерді таңдау мәселелерін шешу үшін қант қызылшасының селекциялық процесіне жоғары тиімді ДНҚ маркерлерін енгізу маңызды. Осы ғылыми зерттеу жұмысының барысында қант қызылшасы үлгілерінің тамыр шірік ауруына төзімділігін анықтау мақсатында ASQ технологиясы бойынша аллельге тән полимеразды тізбектік реакциясын апробациялау жүргізілді. Бұл генотиптеу әдісі өсімдіктердің тәжірибелік селекциясында қолдануға өте қолайлы, қарапайым, қаражат жағынан қол жетімді болып табылады. Зерттеу жұмысында қант қызылшасының қышқылды хитиназа гендерімен байланысты тамырдың шірік ауруына төзімділігін анықтайтын SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) *BvSE2*, *BvSP2* молекулярлық маркерлері пайдаланылды. Зерттеу нысаны ретінде «Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС қант қызылшасының жұмыс коллекциясының 28 үлгісі алынды. Зерттеу нәтижелері бойынша *BvSE2* маркері үшін оңтайлы полимераздық тізбектік реакция құрамы мен режимі анықталып, гомозиготалы төзімді *aa* аллельді – 23 үлгі, гомозиготалы төзімсіз *bb* аллельді – 4 үлгі, гетерозиготалы *ab* – 1 үлгі анықталды. *BvSP2* молекулярлық маркері үшін әлі де болса полимераздық тізбектік реакцияны оңтайландыруды қажет етеді. *BvSE2* гені бойынша алынған оңтайландыру нәтижелерін қант қызылшасының тәжірибелік селекциясында тамыр шірік ауруына төзімділігін жаппай генотиптеу үшін қолдануға болады.

Кілт сөздер: *Allele-specific q-PCR*; *SNP* – генотиптеу; әмбебап зонд; флуоресцентті бояғыштар; сөндіргіштер; қант қызылшасы.

Кіріспе

Қазіргі биология саласындағы прогресс негізінен молекулярлық маркерлердің әртүрлі түрлері арқылы анықталған дезоксиробонуклеин қышқылының (ДНК) полиморфизмін талдауға негізделген молекулалық-генетикалық тәсілдердің дамуы мен қолданылуына негізделген. Молекулярлық маркерлер қазіргі уақытта жеке адамдарды генотиптеу үшін, сұрыптар арасындағы генетикалық біркелкілік/әртүрлілікті бағалауда, генетикалық карталарды жасау үшін, нақты керек гендерді картаға түсіру үшін, селекциялық процесте (*MAS, marker assisted selection*), популяциялық генетикада, филогенетикалық зерттеулерде, биотехнологияда және т.б. [1-4] салаларда кеңінен қолданылады. Экспериментті бастамас бұрын кез келген зерттеуші келесі критерийлерге сүйене отырып, молекулярлық маркерлердің қай түрін қолдану керектігін анықтауы керек: өзгергіштік және қажетті маркерлердің саны, олардың кодоминанттылығының қажеттілігі, сыналатын ДНК – ға сәйкес талаптар, практикалық-талдаудың тиімділігі, қайталануы, қажетті техникалық қамтамасыз етілуі және оның құны. Генотиптеу нәтижелерін дұрыс түсіндіру үшін молекулярлық маркерлердің кез-келген түрін қолдану генотиптеуді оңтайландырумен байланысты екенін ескерген жөн.

Өсімдіктерді генотиптеу үшін әртүрлі әдістерді қолдануға болады және зерттеушілер осы әдістердің қайсысы ең қолайлы, ыңғайлы екенін таңдай алады [5,6]. Сонымен қатар, осы әдістердің басым бөлігі немесе барлығы генотиптеудің сапасы мен қол жетімділігін жақсартуға, қолданылатын әдістердің спектрін кеңейтуге бағытталып үнемі дамып, өзгертіліп отырады. Зерттеу жұмысының барысында өсімдіктерді генотиптеумен қатар шығындарды азайтуда маңызды рөл атқарады. Осы мақсатта аллельге тән полимераздық тізбектік реакция (*ASQ – Allele-specific q-PCR*) әдісін «түпнұсқа» ретінде қолдану үлкен сұранысқа ие [7]. Бір нуклеотидті полиморфизмді (*SNP – Single Nucleotide Polymorphism*) анықтаудың бұл әдісі флуоресценцияның резонанстық энергия беру жүйесіне негізделген (*FRET – Fluorescence resonance energy transfer*), онда бояғыш донор ретінде флуоресцентті сигнал шығарады, ал акцептор ретінде сөндіргіш жақын жерде болған кезде флуоресценцияны сөндіреді [8-10] Бұл принциптер *FRET* негізделген кейбір өте та-

нымал әдістерде де қолданылады.

Модификацияланған *ASQ* әдісі екі бөлек компонентті қажет етеді: біріншісі – *ол аллельге тән бөлік*, екі *AS* *праймер*: *SNP-ге* бағытталған 3'соңындағы соңғы бөлік және арнайы белгілері бар 5' соңындағы бөлік және екіншісі – *эмбебап бөлік*: 5' ұшында сәйкес белгілері және әртүрлі флуоресцентті бояғыштары бар екі эмбебап зонд (*UPs*) және барлық *UP* белгілерін толықтыратын 3' ұшында (*Uni-Q*) сөндіргіші бар бір жалпы эмбебап зонд.

Модификацияланған *ASQ* әдісі *FRET* негізіндегі басқа ұқсас әдістермен салыстырғанда әлдеқайда арзан, өйткені ең қымбат бөлігі – эмбебап зондтар, негізгі нуклеотидтік тізбекке қосылмаған флюорофорлар мен сөндіргіштер ұштарында орналасқан, қысқа бір сызықты бөліктен құралған [11]. Сонымен қатар, модификацияланған *ASQ* әдісі кез-келген компонентті толығымен өзгертуге немесе қайта жасауға, оның ішінде аллельге тән праймерлер мен эмбебап зондтардың дизайны мен құрамын, сондай-ақ амплификация бағдарламасын, оның ішінде әр кезеңнің температурасы мен ұзақтығын өзгертуге мүмкіндік береді. Модификацияланған *ASQ* әдісі өсімдіктерді генотиптеуде [11], сондай-ақ медициналық зерттеулерде кеңінен қолданылуда [12]. Бұл әдіс әртүрлі бояғыштар мен бір сөндіргішті қолдана отырып, мультиплексті генотиптеуге «жол» ашады.

Зерттеу жұмысында *ASQ* технологиясының тиімділігі мен қолдану аясын оңтайладыру мақсатында еліміздегі аса маңызды дақыл – қант қызылшасы таңдап алынды.

Қант қызылшасын өндіру республикамыздың экономикасының стратегиялық маңызды саласы болып табылады [13], себебі қант өзінің жоғары энергетикалық құндылығына байланысты тамақ өнімі ретінде де, шикізат ретінде де маңызды рөл атқарады. Алайда қант қызылшасын өсіру және жалпы жинау аймағын ұлғайту, осы дақылдың жоғары өнімді, экологиялық бейімделген, генетикалық біртекті, ауруға төзімді будандары мен линияларын алу мен зерттеуді талап етеді.

Зерттеу жұмысының мақсаты – аллельге тән полимераздық тізбектік реакция (*ASQ – Allele-specific q-PCR*) әдісінің функционалдығын анықтау, апробациялау және полимеразды тізбекті реакцияның барлық компоненттері

мен амплификация шарттарын оңтайландыру, сондай-ақ бұл әдісті қолдану мысалы ретінде

қант қызылшасының қышқылды хитиназа гендерін SNP – генотиптеу.

Материалдар мен әдістер

Ғылыми зерттеу жұмысы «Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының» (бұдан әрі - «ҚазЕжӨШҒЗИ» ЖШС), өсімдіктер биотехнологиясы, биохимиясы, физиологиясы және өнім сапасын бағалау зертханасының базасында 2022-2033 жылдар аралығында орындалды.

Зерттеу нысаны. *ASQ* – технологиясын сынау үшін 31 үлгі пайдаланылды, олардың 21-і қант қызылшасы будандарының компоненттері ретінде қолданылатын линиялар, яғни *11-i* стерильдікті бекітетін ядролық геномы бар интрогрессивті алоплазмалық линиялар және *Beta L.* тұқымдасының жабайы түрлерінің стерильді цитоплазмалы аталық стерильді линиялары, *5-i* көп тұқымды тозандандырғыштар, *5-i* стерильділікті бекітушілер және отандық селекциялық процесте алынған 7 будан, сонымен қатар бақылаулық нұсқа ретінде 2244

(төзімді), 2291 (сезімтал) будандары және *KWS2320* (төзімді) линиясы алынды (1 кесте). Барлық линиялар «ҚазЕжӨШҒЗИ» ЖШС, қант қызылшасы лабораториясының жұмыс коллекциясы ретінде пайдаланылады. Зерттеу жұмысының нысаны ретінде қолданылып отырған үлгілер «Биоэнергетикалық дақылдар және қант қызылшасы институтынан» (Украина), «Белоцерковская тәжірибе станциясынан» (Украина), «Кутновская қант қызылшасы селекциялық станциясынан» (Kutnowska Hodowla BURAKA CUKROWEGO Sp. Z. O. O.) (Польша), «А.Л. Мазлумов атындағы Бүкілресейлік қант қызылшасы және қант ғылыми-зерттеу институтынан» ФМБҒМ (Ресей) және «Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС жинақталған.

1-кесте – Қант қызылшасының үлгілері

№	Атауы	будан /линия	Шыққан жері
1	FMS 161	линия	Польша
2	FMS 162	линия	Польша
3	FMS Rh 167	линия	Польша
4	FMS 173	линия	Польша
5	FMS Cr 183	линия	Польша
6	FM 1 Rh 184	линия	Польша
7	CMS-16951-1	линия	Украина
8	CMS-16952-1	линия	Украина
9	CMS-16954-2	линия	Украина
10	CMS-16956-3	линия	Украина
11	CMS-UK-A	линия	Украина
12	O-type 16950-1	линия	Украина
13	O-type 16953-2	линия	Украина
14	O-type 16955-3	линия	Украина
15	O-type L53	линия	АҚШ
16	O-type UK-A	линия	Украина
17	OP-17232	линия	Украина
18	OP-17231	линия	Украина
19	OP-GO MM 14044	линия	Ресей
20	OP-RK	линия	Қазақстан
21	OP-UK-A	линия	Украина
22	Sheker	будан	Қазақстан
23	Taraz	будан	Қазақстан

1-кесте жалғасы

24	Aksu	будан	Қазақстан
25	Alikhan	будан	Қазақстан
26	Aidyn	будан	Қазақстан
27	Enbekshi	будан	Қазақстан
28	Pamyat Abugaliyeva	будан	Қазақстан
29	KWS2320 st	линия	Германия
30	2244 st	будан	Казахстан
31	2291 st	будан	Украина

Үлгілерді дайындау. Қант қызылшасының геномдық ДНҚ-лы көшеттердің нағыз жапырақтарының бірінші жұбының фазасы кезінде *DeLaporta S. L. et al.*, 1983 [14] әдісін қолдану арқылы алынды. Алынған ДНҚ сапасы бромді этидидің қатысуымен 1% агарозды геледе электрофорез әдісімен анықталды. ДНҚ концентрациясын өлшеу Jenway (Англия) құралында 260 нм және 280 нм нуклеин қышқылдарының максималды фотометриялық сіңірілуіндегі толқын ұзындығының қатынасына негізделген спектрофотометриялық әдіспен жүргізілді.

Аллельге тән праймерлер мен флуоресцентті таңбаланған зондтарды және ПТР құрамын таңдау. Флуоресцентті таңбаланған зондар екі таңбаланбаған аллельге тән (AS) праймерден (әрқайсысы шамамен 22 ж.н.), яғни 5' – соңы SNP-ге бағытталған соңғы позицияда және оның ұшы мен белгілері бекітілген бөліктен, бір кері праймерден (шамамен 22 ж.н.) тұрады. Екі әмбебап молекулярлық зондтан (*Uni-1* және *Uni-2*), мысалы, 5' ұшында 6-флуоресцеин амидитімен (*FAM*) немесе *HEX / VIC* және 3' соңында нақты белгісі бар ұшы болуы керек. 3' – соңында сөндіргіші бар бір жалпы әмбебап зонд (*UniQ*) қолданылады [15]. Флуоресцентті таңбаланған зондтар мен праймерлер – [16] *Sigma Aldrich* (АҚШ) компаниясында, стерильді-нуклеазасыз су – Биолабмиксте (Ресей, Новосибирск қ.), ал *Tag-Buffer*, *dNTP*, *Tag Polymerase* – Ресейлік Биосан компаниясында синтезделген.

Real-Time PCR талдауы. Аллельге тән ПТР (*ASQ – Allele-specific q-PCR*) әдісінің функционалдығын анықтау, апробациялау және ПТР барлық компоненттері мен ампли-

фикация шарттарын оңтайландыру, сондай-ақ бұл әдістің қолдану мысалы ретінде қант қызылшасын SNP – генотиптеу үшін *QuantStudio 5 Real-Time PCR System* («Applied Biosystems™», АҚШ) амплификаторы пайдаланылды.

ASQ технологиясын қолдана отырып, *SNP* – генотиптеу нәтижелері *FRET*-ге негізделген басқа әдістерге ұқсас, *qPCR* құралының құрамына кіретін компьютерлік бағдарламалық жасақтаманың көмегімен нәтижелерді қарапайым автоматты түрде ұсынады. Қолданылатын бояғыштардың екеуінің де флуоресценция деңгейлері аллельдік дискриминация графигі графикалық және кестелік форматтарда берілген. X және Y осьтері сәйкесінше *FAM* және *HEX / VIC* сияқты салыстырмалы флуоресценция бірліктері (*RFU*) үшін автоматты түрде орнатылады. *SNP* генотипін бағалау сәйкесінше 1 (*FAM*) және 2 (*HEX* немесе *VIC*) аллельдері үшін aa және bb гомозиготаларының екі түрін де анықтаумен автоматты түрде жасалады. ав гетерозиготалары шамамен бірдей деңгейде болатын флуоресценция сигналдарының екеуімен де генотип ретінде анықталады. Сонымен қатар, флюорофорлардың айқын дискриминациямен аралас амплификациясын көрсететін генотиптер «анықталмаған» немесе «аралас» деп жіктеледі және мұндай генотиптер қосымша талдауды қажет етеді. *SNP* – генотиптеу барысында екі генінде бақылаулық үлгілерін қолдану аллельді анықтау дәлдігі үшін генотиптеудің әр кезеңінде өте қажет.

Кез-келген ПТР барысындағыдай бұл зерттеу жұмысында да бақылаулық нұсқа ретінде [16] 2244 (төзімді), 2291 (сезімтал) будандары және *KWS2320* линиясы қолданылды.

Нәтижелер

ASQ – технологиясын апробациялау және амплификация процесін оңтайландыру мақсатында қант қызылшасының қышқылды хитиназа гендерімен байланысты *BvSE2*, *BvSP2* молекулярлық маркерлерінің дизайны ұрық плазмасының шығу тегі әртүрлі қант қызылшасының екі буданын (2217 және 2263) секвенирлеу нәтижесінде құрастырылған [15].

2-кесте – Қант қызылшасы үлгерінде қышқылды хитиназа гендерінің детекциясы үшін пайдаланылған олигонуклеотиді праймерлердің құрылымы

Праймерлердің жұбы	5'-3' бірізділігі
BvSE2-sht-F1 BvSE2-sht-F2 BvSE2-SNP-R	GTCCTTGCGAAGGC ATCC GACTGACCCCAAGATAAGTGTT GTCCTTGCGAAGGC CAAC GACTGACCCCAAGATAAGTGAT CAGGCATTAAGGTA CTCCTCTC
BvSP2-sht-F1 BvSP2-sht-F2 BvSP2- SNP-R	GTCCTTGCGAAGGC ATCC ACAGCACTAAGAAAAGCAGCGC GTCCTTGCGAAGGC CAAC ACAGCACTAAGAAAAGCAGCAC TGGTGGCTCATCAGTGTCTGAT

Төменде кестеде көрсетілгендей ұзындығы 18 жұп нуклеотид болатын тізбек аллельге тән праймерлердің (AS – F1, AS – F2) 5' соңына жалғануы керек. Бұл фрагмент (үзінді) ұшы бірдей 14 ж.н. және негізгі ерекше 4 ж.н. тұрады. Ал аллельге тән праймерлердің екі бастапқы ұшы да бірдей. AS – F1 праймері үшін «tag1» ұшы [5'-ATCC-3'], ал AS – F2 праймері үшін «tag2» ұшы [5'-CAAC-3'] тән. Алынған фрагменттер аллельге тән праймерлерге тапсырыс берер алдында 18 жұп нуклеотидтік ұзындықты береді [15].

3-кесте – Флуоресцентті таңбаланған зондтардың құрылымы

Зонд түрі	Бірізділік, 5'-3'	Ұзындығы, жұп нуклеотид
UP1-short – FAM	gtccttgcaaggc ATCC	18
UP2-short – HEX	gtccttgcaaggc CAAC	18
UniQ-short – BHQ1	gcttcgcaaggac	14

SNP – генотиптеуді бастамас бұрын екі қоспа дайындаңыз: біріншісі, аллельге тән үш праймерді (*AS-F1*, *AS-F2* және *R*) қамтитын праймер қоспасы. Екінші қоспа, үш әмбебап молекулярлық зондты (UP1, UP2 және Uni-Q) қамтитын зонд қоспасы.

Реакцияның сезімталдылығы мен тиімділігін бағалау үшін оң бақылау (*NTC* – *notemplate control*) ретінде стерильді-нуклеазасыз су қолданылады.

Полимеразды тізбекті реакцияның қоспасын дайындау салқындатқыштарды қолдану арқылы жүргізіледі, тіпті 96 ұяшықты микропланшетті де салқындатқышы бар ортаға орналастырамыз. ПТР

қоспасын әр ұяшыққа құйып болған соң, ДНҚ үлгілерін қосып, ультра мөлдір лентамен жабамыз.

Жалпы *ASQ* технологиясын апробациялау және ПТР кезеңдерін оңтайландыру, қант қызылшасы үлгілерін *SNP* – генотиптеу үшін қышқылды хитиназа гендерімен байланысты *BvSE2*, *BvSP2* молекулярлық маркерлері пайдалана отырып, 15 тәжірибелік жұмыс атқарылды. Осы атқарылған тәжірибеделдің ішінде ең оң нәтиже көрсеткен ПТР құрамы мен сынақ қоспаларының арақатынасы 4 кестеде көрсетілген. Сонымен қатар 5 кестеде тәжірибе барысында қолданылған барлық ПТР құрамы мен арақатынасы берілген.

4-кесте – Модификацияланған *ASQ* – технологиясымен *SNP* – генотиптеу үшін полимераздық тізбектік реакцияның құрамы мен концентрациясы

Құрамы	Концентрациясы	Көлемі, μ L	Қорытынды концентрациясы
Стерильді су (Биолабмикс)	–	1.72	–
TagBuffer (KCl)	5x	2.0	1 x
MgCl ₂	25 mM	1.2	3.0 mM
dNTP	2 mM	1.0	0.2 mM
<i>Праймерлер қоспасы</i>			
ASP-F1	1 μ M	1.0	0.1 μ M
ASP-F2	1 μ M		0.1 μ M
ASP-R	5 μ M		0.5 μ M
<i>Зондтар қоспасы</i>			
UP-FAM	2 μ M	1.0	0.2 μ M
UP-HEX	2 μ M		0.2 μ M
Uni-Q	6 μ M		0.6 μ M

4-кесте жалғасы

Tag polymerase	5 units/ μ L	0.08	0.04 units/ μ L
ДНҚ	10 ng/ μ L	2.0	20 ng/ μ L
	Жалпы көлемі, μ L	10.0	–

Қолданылатын *qPCR* құралы берілген нұсқаулыққа сәйкес дайындалуы және қолданылуы керек. Қолданылып, оң нәтиже берген ПТР бағдарламасы төменде көрсетілген, бірақ бұдан да жақсы нәтижеге қол жеткізу үшін оны өзгертуге болады (1сурет). *ASQ* әдісімен генотиптеу үшін қолданылған ПТР режимі:

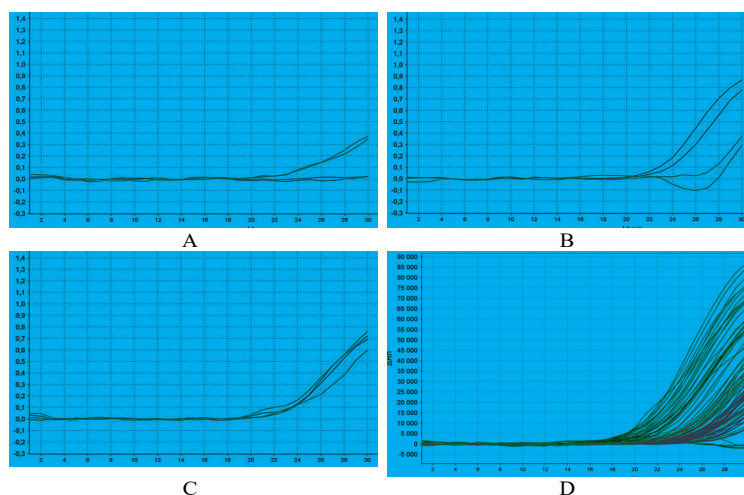
- | | |
|-------------------------------|--|
| 1) 94°C – 2 минут | (6) 94°C – 10 секунд |
| (2) 94°C – 10 секунд | (7) 62°C – 20 секунд |
| (3) 55°C – 20 секунд | (8) 68°C – 20 секунд |
| (4) 68°C – 20 секунд | (9) 55°C – 30 секунд + <i>Plate read</i> |
| (5) 2 кезеңнен бастап 10 цикл | (10) 6 кезеңнен бастап 27 цикл |

BvSE2 праймерін қолдану арқылы *ASQ* технологиясын апробациялау барысында эмбебап зондтардың ең оңтайлы нәтиже көрсеткен ара қатынасы 2 μ M+2 μ M+6 μ M (*UP1-(FAM)* + *UP2(VIC)* + *Uni-Q*) тең екендігін көрсетті. Праймерлер сияқты олардың қоспасыда +4 °C, ал егер ұзақ уақыт сақтау керек болса -20 °C сақтаймыз. Барлық үш эмбебап зонд (*UP1*, *UP2* және *UniQ*) жарыққа сезімтал болғандықтан, оларды сақтайтын микропробиркалар қара пластиктен немесе фольгамен оралуы шарт.

Тәжірибе барысында флюорофорлардың бірі «үстемдік ете» бастайды, бұл барлық үлгілерде жалған амплификацияны қамтамасыз етеді. Қарапайым реттеу негізінде жалған басым бояғыштың үлесін азайту және альтернативті

флюорофордың көлемін шамалы өсіру нәтижесінде тамаша және дұрыс нәтижелерге қол жеткізуге болады.

SNP – генотиптеу барысында *NTC* (ДНҚ-сыз сынама) қолдану генотиптеу мен аллельдік дискриминацияның дұрыс айырылуының ажырамас бөлігі болып табылады. Алайда, *ASQ* әдісі апробациялау барысында, бастапқы кезде *NTC* қолданылатын екі бояғыштың бірінен, *FAM* немесе *HEX/VIC* флуоресцентті сигналдардың амплификациясы тіркелгендігін байқаймыз. Бұл құбылыстың себебі түсініксіз болып қалады. Әрбір флюорофордың нақты уақыттағы флуоресценциясын әр циклден кейін бақылауға және автоматты түрде жазуға болады (1-сурет).



1-сурет – *ASQ* әдісін қолдану мысалдары

SNP – генотиптеу үшін қант қызылшасының *BvSE2* праймері қолданылды: (A) *FAM* амплификациясын көрсететін екі гомозиготалы *aa* генотипі, қызыл түсті; (B) басқа екі гомозиготалы *VIC* амплификациясы бар *vv* генотипі, көк түсті; (C) сәйкесінше қызыл және көк сызықтармен *FAM* және *VIC* амплификацияланған екі гетерозиготалы *av* генотипі; (D) шағын масштабты генотиптеу кезінде және сол экспериментте флуоресценцияның жалпы көрінісі (ДНҚ-мен 31 үлгі және *NTC*-мен 4 үлгі).

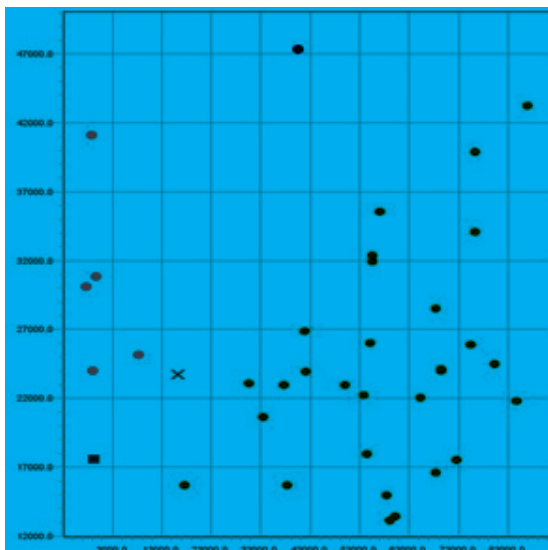
5-кесте – Модификацияланған ASQ – технологиясымен SNP – генотиптеу үшін полимераздық тізбектік реакцияның құрамы мен концентрациясы оңтайландыру тәжірибелері

Тәжірибе саны	Mg ₂ (μM)	Праймерлер F1+F2+R (μM)	Праймер қоспасы	Зонд U1+U2+UQ (μM)	Зонд қоспасы	ДНҚ	ПТР-режимі	Нәтижесі
1	3,0	1+1+5	1 μl	3+3+6		1 μl	55-68+62-68-55	VIC амплификациясы жоқ, NTC - жақсы, аллельдік дискриминациясы нашар
2	3,0	1+1+5		4+3+6	1 μl	1 μl	55-68+62-68-55	VIC амплификациясы жоқ (тек 6 үлгіде ғана аздап бар) NTC - жақсы
3	3,0	1+1+5		4+5+6		1 μl	55-68+62-68-55	VIC, NTC амплификация бар. Бірақ FAM амплификациясы жоқ.
4	3,0	1+1+5		1+1,5+10	1 μl	1 μl		VIC, FAM және NTC (VIC) амплификациясы бар.
5	2,0	1+1+5	1 μl	1+1,5+10	1 μl	1 μl	55-68+62-68-55	VIC, FAM және NTC (VIC, FAM.) амплификациясы бар.
6	1,5	1+1+5		1+1,5+10	1 μl	1 μl		Амплификация жоқ
7	3,0	1+1+5	1 μl	1+1,5+10		1 μl		VIC амплификациясы жоқ (тек 6 үлгіде ғана аздап бар) NTC - жақсы
8	2,0	1+1+5	0,8 μl	1+1,5+10		1 μl	56-50+62-55 gradient	VIC амплификациясы жоқ (тек 4 үлгіде ғана аздап бар) NTC - жақсы
9	2,0	1+1+5	1 μl	4+5+6	1 μl	1 μl		VIC амплификациясы жоқ (тек 1 үлгіде ғана VIC бар), (3 үлгіде VIC, FAM амплификациясы бар) NTC-өте нашар
10	2,0	1+1+5	0,8 μl	1+2+10		1 μl	55-68+68-55	VIC, FAM және NTC амплификациясы бар.
11	2,0	1+1+5	0,8 μl	1+2+10		1 μl	55-68+69-55	VIC, FAM және NTC (VIC) амплификациясы бар.
12	2,0	1+1+5		1+2+10	1 μl	1 μl		VIC амплификациясы жоқ, NTC - жақсы
13	2,0	1+1+5	0,8 μl	1+2+10	0,8 μl	1 μl	56-50+68-55 gradient	VIC амплификациясы жоқ, NTC - нашар
14	2,0	1+1+5		1+2+10	1 μl	2 μl		VIC, FAM және NTC амплификациясы бар.
15	3,0	1+1+5	1 μl	2+2+6	1 μl	1 μl	55-68+62-68-55	VIC, FAM амплификациясы бар, NTC – жақсы.

ПТР қоспасын дайындаған кезде барлық шарттар мен ұсынылған талаптарды сақтау маңызды. Алайда, егер аллельдің амплификациясы мен дискриминациясы жеткілікті деңгейде жақсы болмаса, салыстырмалы түрде өзгертулер енгізуге болады. Сонымен қатар, диметилсульфоксидті (ДМСО) шамамен 5% концентрацияда (10 мкл реакция үшін 0,5 мкл) қосу аллельдердің амплификациясы мен дискриминациясын айтарлықтай жақсартаты-

ны анықталды. Зерттеушілер назар аударатын тағы бір сәт, *Taq-буфер*, *MgCl₂*, *Taq-полимераза* сияқты коммерциялық реагенттердің құрамына мұқият назар аударуы қажет.

SNP – генотиптеу нәтижелері әртүрлі түсті нүктелері немесе пішіндері бар аллельдік дискриминация графигі ретінде ұсынылған, *NTC* немесе осы деректерді ескере отырып қалыпқа келтірілген (2-сурет).



2-сурет – *ASQ* әдісінің *SNP* негізіндегі аллельді дискриминация графигінің мысалдары *BvSE2* праймері, қант қызылшасының 31 үлгісі мен *NTC*. **aa** және **bb** гомозиготалы генотиптері сәйкесінше қызыл және көк нүктелермен белгіленеді, ал гетерозиготалы **ab** генотиптері жасыл нүктелермен көрсетілген. Қара квадраттар стерильді сумен *NTC* (үлгісіз бакылау) білдіреді. *FAM* және *VIC* үшін салыстырмалы флуоресценция бірліктері автоматты түрде *qPCR* құралында орнатылған және сәйкесінше *X* және *Y* осьтерінде есептеледі.

ASQ – технологиясын апробациялау және амплификация процесін оңтайландыру мақсатында қант қызылшасының үлгілерін *SNP* – генотиптеу үшін қышқылды хитиназа гендерімен байланысты *BvSE* молекулярлық маркерлері қолдану нәтижесі бойынша гомозиготалы **aa** аллельді 23 үлгі (төзімді), гомозиготалы **bb** аллельді 4 үлгі (төзімсіз), гетерозиготалы **ab** аллельді 1 үлгі анықталды (6 кесте).

6-кесте – *ASQ* – технологиясын апробациялау және амплификация процесін оңтайландыру мақсатында қант қызылшасының үлгілерін *SNP* – генотиптеу үшін қышқылды хитиназа гендерімен байланысты *BvSE2* молекулярлық маркерін қолдану нәтижелері

№	Атауы	будан /линия	Аллельдік дискриминациясы		
			aa	bb	ab
1	FMS 161	линия	aa		
2	FMS 162	линия	aa		
3	FMS Rh 167	линия	aa		
4	FMS 173	линия	aa		
5	FMS Cr 183	линия	aa		
6	FM 1 Rh 184	линия	aa		
7	CMS-16951-1	линия	aa		

6-кесте жалғасы

8	CMS-16952-1	линия	aa		
9	CMS-16954-2	линия	aa		
10	CMS-16956-3	линия	aa		
11	CMS-UK-A	линия	aa		
12	O-type 16950-1	линия	aa		
13	O-type 16953-2	линия	aa		
14	O-type 16955-3	линия	aa		
15	O-type L53	линия	aa		
16	O-type UK-A	линия		bb	
17	OP-17232	линия	aa		
18	OP-17231	линия			ab
19	OP-GO MM 14044	линия	aa		
20	OP-RK	линия		bb	
21	OP-UK-A	линия	aa		
22	Sheker	будан	aa		
23	Taraz	будан	aa		
24	Aksu	будан	aa		
25	Alikhan	будан	aa		
26	Aidyn	будан	aa		
27	Enbekshi	будан		bb	
28	Pamyat Abugaliyeva	будан		bb	
29	KWS2320 st	линия	aa		
30	2244 st	будан	aa		
31	2291 st	будан		bb	

ПТР кезеңінің бағдарламасы тәжірибе нәтижелеріне сай орындалады. Дегенмен, кез келген кезеңде кейбір модификацияларды әлі де жасауға болады, соның ішінде температура мен цикл ұзақтықтың өзгеруі және кез келген кезеңді енгізу немесе жою.

Қолданылып отырған эмбебап зондтардың әрқайсысының флуоресценциясын бақылау нақты уақыт режимінде *qPCR* құралымен өте ыңғайлы, ол әр амплификация циклінен кейін флуоресценцияны автоматты түрде тіркейді. Алайда, әдетте, кез-келген флуоресценциядағы

Талқылау

Тамыр шірік ауруының салдарынан қант қызылшасыдақылыныңөнімділігіменсапасының төмендеу мәселесі, ҚР-дағы осы дақыл бойынша негізгі мәселелердің бірі болып табылады [17]. Оның негізгі себебі – қант қызылшасын дәстүрлі өсіретін аймақтардың (Алматы, Жетісу және Жамбыл облыстары) топырағының тамыр шірік ауруының әртүрлі қоздырғыштарымен зақымданғандығы. Қант қызылшасының тамыржемісінің ауруының таралуының негізгі

амплификация 14-15, тіпті 20 циклден ерте басталмайды. *SNP* – генотиптеу үшін реакцияның болжанбайтын немесе өздігінен бұзылуын болдырмау үшін типтік емес немесе «қате» амплификаияланған үлгілерді алып тастау немесе қайта қайталау қажет. Мысалы, бұл жағдай флуоресцентті сигнал бірнеше циклден кейін өте ерте анықталған жағдайда немесе амплификация тегіс экспоненциалды болмаса қолданылуы мүмкін, себебі бұл ПТР негізіндегі әдістердің барлығына тән талап болып табылады.

факторлары – қант қызылшасын ұзақ уақыт өсіру болып табылады, бұл қызылша плантацияларында табиғи жұқтырған фонды құруға, жергілікті микробиотаға төзімді емес импорттық тұқымдарды кеңінен қолдануға, сондай-ақ патогендердің жаңа, агрессивті формаларының пайда болуына әкелді [18, 19, 20]. Ресейде [21], Беларусьияда [22], Молдовада [23] да осындай проблемалар кездеседі. Қант қызылшасының тамыр шірік ауруының салдарынан

өнімділігі мен өнім сапасының төмендеуін, ауруға төзімді тұрақты генотиптерді енгізу арқылы шешуге болады [24]. Дегенмен, осы уақытқа дейін қант қызылшасы сияқты коммерцияланған дақыл бойынша ашық ба-сылымдарда кандидат гендер және тамыр шірік ауруына төзімділікті бақылайтын *QT L* локустары туралы ақпарат жоқ. Біздің зерттеу жұмысында қышқылды хитиназа гендерінің (*BvSE2*, *BvSP2*) ДНҚ маркерлері тамыр шірік ауруына төзімді генотиптерді анықтау үшін пайдаланылды, себебі хитиназа гендері *F. oxysporum* [25, 26] қарсы тамыр мен жапырақтарда өсімдіктердің қорғаныс реакцияларын қалыптастыруда маңызды рөл атқарады. Осы уақытқа дейін патогендік тамыр шірік инфекциясымен байланысты және хитоолигосахаридтердің гидролизіне ықпал ететін хитиназа ферменттерінің белсенділігі туралы бірнеше зерттеулер жарияланған [27, 28]. Ресейлік ғалымдар тобы *Fusarium* тектес саңырауқұлақтар тудыратын тамыр шірік ауруына төзімділік туралы зерттеулерінде кандидат ген ретінде қышқылды хитиназа гендерін қолданды. Олар *Beta vulgaris L.* бастапқы селекциялық материалдарының фузариозды шірік ауруына төзімділігін бағалау

Қорытынды

ASQ генотиптеу әдісі салыстырмалы түрде жаңа, бағасы жағынан тиімді болғанымен де, бұл технологияны қолдану арқылы нақты нәтижелерге қол жеткізу үшін ПТР құрамы мен режимін оңтайландыруды, тандап алынған праймерлердің, эмбебап зондтардың ара қатынасын анықтауды талап етеді. Сонымен қатар ДНҚ-сыз үлгіде ДМСО бақылаулық нұсқа ретінде қолдану *Uni-FAM* және *Uni-HEX/VIC* зондтардың және *NTC* флуоресценциясын айтарлықтай төмендеуіне, *SNP*–генотиптеудің жақсаруына әкелетіні анықталды. Бұл зерттеу жұмысында қант қызылшасының 28 үлгісін

Қаржыландыру туралы ақпарат

Зерттеу жұмысы ҚР БҒМ Ғылым комитетінің 217 бюджеттік бағдарламасы шеңберінде «Молекулалық селекция мен биотехнология негізінде генетикалық анықталған қасиеттері бар қант қызылшасы будандарын шығару және оларды өндіріске тұрақты енгізу» ИРН АРО09057999 жобасы бойынша орындалды.

үшін қолдануға болатын маркерлерді әзірледі (*Fus1F/R*, *2Ch300 F/R* и *7Ch310 F/R*)[29].

Жаңа жылдам және бюджеттік *ASQ* генотиптеу технологиясын қант қызылшасының селекциялық процесінде тамыр шірік ауруына төзімділігін бағалау үшін қолдану өте маңызды. Біздің зерттеу жұмысының барысында *BvSE2*, қышқылды хитиназа генін тасымалдаушы 11 цитоплазмалы аталық стерильді және 3 тозандандырғыш линиялары анықталды, олар инбридті линия болып табылады және оларды будандардың құрамдас бөлігі ретінде пайдалану ұсынылады. Сонымен қатар *ASQ* генотиптеу әдісі Данио рерионың (*Danio rerio*) *nr3c1*, *nod2*, *mc2r*, *il-6* и *myo 7aa* гендерінде [7], *HvSAP16* және *HvSAP8* гендері бойынша арпа (*Hordeum vulgare L.*) дақылында генотиптеу жүргізілген [11].

Жүргізілген зерттеу жұмысы барысында нақты нәтижелерге қол жеткізу үшін әліде болса ПТР оңтайландыру қажет екенін көреміз. *Lee H.B.*, *Kalendar R.* зерттеулерінде *ASQ* және *Amplifluor-like* бойынша авторлар да нақтылау қажеттілігін атап өтеді [7,11]. Алайда, қолданылған әдістердің бюджеті мен қол жетімділігі осы әдістерді селекциялық процеске енгізуге ынталандырады.

қышқылды хитиназа гендерімен байланысты *BvSE* молекулярлық маркерін қолдану арқылы *ASQ* – технологиясын апробациялау оң нәтиже көрсетіп, гомозиготалы төзімді *aa* аллельді – 23, гомозиготалы төзімсіз *bb* аллельді – 4, гетерозиготалы *ab* – 1 үлгі анықталды, ал *BvSP2* молекулярлық маркерімен жұмысты әлі де болса оңтайландыруды талап етеді. *BvSE2* гені бойынша алынған оңтайландыру нәтижелерін қант қызылшасының тәжірибелік селекциясында тамыр шірік ауруына төзімділігін жаппай генотиптеу үшін қолдануға болады.

Әдебиеттер тізімі

- 1 Ganal M.W., Large SNP arrays for genotyping in crop plants [Text] / Journal of Biosciences–2012. – Vol. 37. – P. 821-288.
- 2 Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding [Text] / Phytopathology. – 2012. – Vol.102. – P. 560-566.
- 3 Hall D., Tegström C., Ingvarsson P.K. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants [Text]/ Hall D., Tegström C., Ingvarsson P.K. // Briefings in Functional Genomics. – 2010. – Vol. 9. – P. 157-165.
- 4 Zimmer E.A., Wen J. Using nuclear gene data for plant phylogenetics: progress and prospects [Text]/ Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2012. – Vol. 65. – P. 774-785.
- 5 Kim S., Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications Hall D., Tegström C., Ingvarsson P.K. Annu Rev Biomed Eng. – 2007. – Vol. 9. -P. 289–320.
- 6 Schramm C., Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for cereal breeding and crop research: current methods and future prospects [Text] / Schramm C., Shavrukov Y., Anderson P., Kurishbaev A., Jatayev S. // In: Ordon F, Friedt W (eds) Advances in breeding techniques for cereal crops. BD Publishing, Cambridge. – 2019. – P. 327–362.
- 7 Lee H.B., Allele-specific quantitative PCR for accurate, rapid, and cost-effective genotyping [Text] / Lee H.B., Schwab T.L., Koleilat A., Ata H., Daby C.L., Cervera R.L. et al. // Human Gene Therapy. – 2016. – Vol. 27. -P.425–435.
- 8 Chen X., Sullivan P.F. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput [Text] / Pharmacogenomics J. – 2003. – Vol. 3. -P.77–96.
- 9 Giancola S., Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploidy plants [Text] / Giancola S., McKhann H.I., Be´rard A., Camilleri C., Durand S., Libeau P. et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – Vol. 112. -P.1115–1124.
- 10 Mamotte C.D. Genotyping of single nucleotide substitutions [Text] / Clinical Biochemist Reviews. – 2006. – Vol. 27. – P.63–75.
- 11 Kalendar R., Modified “Allele-specific qPCR” method for SNP genotyping based on FRET[Text] / Kalendar R., Baidyussen A., Serikbay D., Zotova L., Khassanova G., Kuzbakova M., Jatayev S., Hu Yin-Gang, Schramm C., Peter A. Anderson, Colin L. D. Jenkins, Kathleen L. Soole and Shavrukov Y. // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 12:747886.
- 12 Kalendar R., Designing Allele-specific competitive-extension PCR-based assays for high-throughput genotyping and gene characterization [Text] / Kalendar R., Shustov AV., Akhmetollayev I., Kairov U. // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 9:773956.
- 13 <http://www.akorda.kz> [Электрон. ресурс]. - 2022. - (дата обращения 14.03.2022).
- 14 Dellaporta S.L., Wood J., Hicks B.J. A plant DNA minipreparation: Version II [Text] / Plant Molecular Biology Reporter. –1983. – Vol.1(4). – P.19-21.
- 15 Amangeldiyeva A., Modified Allele-Specific qPCR (ASQ) Genotyping [Text] / Amangeldiyeva A., Baidyussen A., Kuzbakova M., Yerzhebayeva R., Jatayev S., Shavrukov Y. // Plant Genotyping: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – 2023. – Vol. 2638. – P.231-247.
- 16 Yerzhebayeva R., Two sugar chitinase genes, BvSP2, BvSE2 analysed with SNP Amplifluor-like markers are highly expressed after Fusarium root rot inoculations and field susceptibility trial [Text] / Yerzhebayeva R., Abekova A., Konysbekov K., Bastaubayeva Sh., Kabdrakhmanova A., Absattarova A., Shavrukov Y. // PeerJ. – 2018. – P. 19.
- 17 Акмуллаева А.С Динамика роста болезней и вредителей сахарной свеклы Алматинской области [Текст]/ Акмуллаева А.С., Абилмажин М.С., Аскарбекова К.Б., Абдильда А., Сердалин А. // Наука, Производство, Бизнес. – 2019. – С.177-180.
- 18 Maui A. Diseases of sugar beet in Kazakhstan [Text]/ In book: Agricultural research updates // Maui A., Urazaliev K., Abekova A. – Nova science publishers, New York, -2016. -Vol. 12. Chapter 9. – P.143-171.

- 19 Момбекова Г.А., Фитопатогены сахарной свеклы и сои, возделываемых в почвенно-климатических условиях Алматинской области [Текст]/ Момбекова Г.А., Шемшура О.Н., Сейтбагталова А.И., Айтхожина Н.А., Бекмаханова Н.Е. // Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан. – 2013. – №4. – С.95-99.
- 20 Стогниенко О.И. Микобиота семян сахарной свеклы и почвы свекловичных полей [Текст] / Защита и карантин растений. – 2008. – №4. – С.21-26.
- 21 Костенко Е. И. Корневые гнили сахарной свёклы в ЦЧР в 2016 году [Текст] / Сахар. – 2016. – №. 8. – С. 34-35.
- 22 Турук Е. В. Распространение болезней корневой системы сахарной свеклы и их вредоносность [Текст] / Земледелие и селекция в Беларуси. – 2022. – №. 51. – С. 171-183.
- 23 Лупашку Г. А., Меренюк Г. В. Влияние севооборота и удобрений на видовой состав возбудителей и поражаемость сахарной свеклы корневыми гнилями [Текст] / Микология и фитопатология. – 2010. – Т.44. – 255-261.
- 24 Christ D., Varrelmann M. Fusarium in sugar beet [Text] / Sugar Industry (Zuckerindustrie). – 2011. – Vol.136. – P. 161-171.
- 25 Larson RL, Hill AL, Nuñez A. Characterization of protein changes associated with sugar beet (*Beta vulgaris*) resistance and susceptibility to *Fusarium oxysporum* [Text] / Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – Vol. 55(19). – P.7905–7915.
- 26 Nielsen K.K., Bojsen K., Roepstorff P., Mikkelsen J.D. A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose [Text] / Plant Molecular Biology. – 1994. – Vol. 25(2). – P.241–257.
- 27 Nagpure A., Choudhary B., Gupta R. Chitinases: in agriculture and human healthcare [Text] / Critical Reviews in Biotechnology. – 2014. – Vol. 34. – Iss. 3. – P. 215-232.
- 28 Pasonen H., Seppänen Y., Degefú A., Rytkönen K., Pappinen A. Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases [Text] / Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Vol. 109(3). – P. 562-570.
- 29 Налбандян А.А., Руденко Т.С., Фомина А.С. Выявление новых SNPs в генах/локусах устойчивости к фузариозу и хитиназам [Текст]/ Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. –2022. –№. 3 (59). – С.110-115.

References

- 1 Ganai M.W., Large SNP arrays for genotyping in crop plants [Text] / Journal of Biosciences– 2012. – Vol. 37. – P. 821-288.
- 2 Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding [Text] / Phytopathology. – 2012. – Vol.102. – P. 560-566.
- 3 Hall D., Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants [Text]/ Hall D., Tegström C., Ingvarsson P.K. // Briefings in Functional Genomics. – 2010. – Vol. 9. – P. 157-165.
- 4 Zimmer E.A., Wen J. Using nuclear gene data for plant phylogenetics: progress and prospects [Text]/ Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2012. – Vol. 65. – P. 774-785.
- 5 Kim S., Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications / Annu Rev Biomed Eng. – 2007. – Vol. 9. -P. 289–320.
- 6 Schramm C., Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for cereal breeding and crop research: current methods and future prospects [Text]/ Schramm C., Shavrukov Y., Anderson P., Kurishbaev A., Jatayev S. // In: Ordon F, Friedt W (eds) Advances in breeding techniques for cereal crops. BD Publishing, Cambridge. – 2019. – P. 327–362.
- 7 Lee H.B., Allele-specific quantitative PCR for accurate, rapid, and cost-effective genotyping [Text] / Lee H.B., Schwab T.L., Koleilat A., Ata H., Daby C.L., Cervera R.L. et al. // Human Gene Therapy. – 2016. – Vol. 27.- P.425–435.
- 8 Chen X., Sullivan P.F. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput [Text]/ Pharmacogenomics J. – 2003. – Vol. 3. -P.77–96.

- 9 Giancola S., Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploidy plants [Text] / Giancola S., McKhann H.I., Be' rard A., Camilleri C., Durand S., Libeau P. et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – Vol. 112. –P.1115–1124.
- 10 Mamotte C.D. Genotyping of single nucleotide substitutions [Text]/ Clinical Biochemist Reviews. – 2006. – Vol. 27. – P.63–75.
- 11 Kalendar R., Modified “Allele-specific qPCR” method for SNP genotyping based on FRET [Text]/ Kalendar R., Baidyussen A., Serikbay D., Zotova L., Khassanova G., Kuzbakova M., Jatayev S., Hu Yin-Gang, Schramm C., Peter A. Anderson, Colin L. D. Jenkins, Kathleen L. Soole and Shavrukov Y. // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 12:747886.
- 12 Kalendar R., Designing Allele-specific competitive-extension PCR-based assays for high-throughput genotyping and gene characterization [Text]/ Kalendar R., Shustov AV., Akhmetollayev I., Kairov U. // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 9. 773956.
- 13 <http://www.akorda.kz> [electronic resource]. - 2022. - (date of application 14.03.2022).
- 14 Dellaporta S.L., A plant DNA minipreparation: Version II [Text]/ Dellaporta S.L., Wood J., Hicks B.J. // Plant Molecular Biology Reporter. – 1983. – Vol.1(4). – P.19-21.
- 15 Amangeldiyeva A., Modified Allele-Specific qPCR (ASQ) Genotyping [Text] / Amangeldiyeva A., Baidyussen A., Kuzbakova M., Yerzhebayeva R., Jatayev S., Shavrukov Y. // Plant Genotyping: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – 2023. – Vol. 2638. – P.231-247.
- 16 Yerzhebayeva R., Two sugar chitinase genes, BvSP2, BvSE2 analysed with SNP Amplifluor-like markers are highly expressed after Fusarium root rot inoculations and field susceptibility trial [Text]/ Yerzhebayeva R., Abekova A., Konysbekov K., Bastaubayeva Sh., Kabdrakhmanova A., Absattarova A., Shavrukov Y. // PeerJ. – 2018. – P. 19.
- 17 Akmullaeva A.S., Dinamika rosta boleznj i vreditelej saharoj svekly Almatinskoy oblasti [Text] / Akmullaeva A.S., Abilmazhin M.S., Askarbekova K.B., Abdil'da A., Serdalin A. // Nauka, Proizvodstvo, Biznes. – 2019. – S.177-180.
- 18 Maui A. Diseases of sugar beet in Kazakhstan [Text]/ In book: Agricultural research updates // Maui A., Urazaliev K., Abekova A. – Nova science publishers, New York, -2016. -Vol. 12. Chapter 9. – P.143-171.
- 19 Mombekova G.A., Fitopatogeny saharnoj svekly i soi, vzdelyvaemyh v pochvenno-klimaticheskikh usloviyah Almatinskoy oblasti [Text]/ Mombekova G.A., SHemshura O.N., Sejtballalova A.I., Ajthozhina N.A., Bekmahanova N.E. // Vestnik Nacional'noj akademii nauk Respubliki Kazahstan. – 2013. – №4. – S.95-99
- 20 Stognienko O.I. Mikobiota semyan saharnoj svekly i pochvy sveklovichnyh polej [Text]/ Zashchita i karantin rastenij. – 2008. – №4. – 21-26 s.
- 21 Kostenko E. I. Kornevye gnili saharnoj svyokly v CCHR v 2016 godu [Tekst] /Sahar. – 2016. – №. 8. – S. 34-35.
- 22 Turuk E. V. Rasprostranenie boleznj kornevoj sistemy saharnoj svekly i ih vredonosnost' [Tekst] / Zemledelie i selekciya v Belarusi. – 2022. – №. 51. – S. 171-183.
- 23 Lupashku G. A., Merenyuk G. V. Vliyanie sevooborota i udobrenij na vidovoj sostav vzbuditelej i porazhaemost' saharnoj svekly kornevymi gnilyami [Text] / Mikologiya i fitopatologiya. – 2010. – T.44. – 255-261.
- 24 Christ D., Varrelmann M. Fusarium in sugar beet [Text] / Sugar Industry (Zuckerindustrie). – 2011. – Vol.136. – P. 161-171.
- 25 Larson RL, Hill AL, Nun~ez A. Characterization of protein changes associated with sugar beet (*Beta vulgaris*) resistance and susceptibility to *Fusarium oxysporum* [Text]/ Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – Vol. 55(19). – P.7905–7915.
- 26 Nielsen K.K., A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose [Text]/ Nielsen K.K., Bojsen K., Roepstorff P., Mikkelsen J.D. // Plant Molecular Biology. – 1994. – Vol. 25(2). – P.241–257.

27 Nagpure A., Chitinases: in agriculture and human healthcare [Text]/ Nagpure A., Choudhary B., Gupta R. // Critical Reviews in Biotechnology. – 2014. – Vol. 34. – Iss. 3. – P. 215-232.

28 Pasonen H., Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases [Text]/ Pasonen H., Seppänen Y., Degefu A., Rytönen K., Pappinen A. // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Vol. 109(3). – P. 562-570.

29 Nalbandyan A.A., Vyyavlenie novykh SNPs v genah/lokusah ustojchivosti k fuzariozu i hitinazam [Tekst]/ Nalbandyan A.A., Rudenko T.S., Fomina A.S. // Vestnik Ul'yanovskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii. – 2022. – №. 3 (59). – S. 110-115.

АПРОБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ASQ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ КИСЛОЙ ХИТИНАЗЫ ОБРАЗЦОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Амангелдиева Айгул

Магистр

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства»

п. Алмалыбак, Казахстан

E-mail: aigul_seidinabiyeva@inbox.ru

Ержебаева Раушан

Кандидат биологических наук

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства»

п. Алмалыбак, Казахстан

E-mail: raushan.yerzhebayeva@zir.kz

Табынбаева Лайла

PhD

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства»

п. Алмалыбак, Казахстан

E-mail: tabynbaeva.lyaylya@mail.ru

Аннотация

В свеклосеющих регионах Казахстана, в связи с бесменным выращиванием сахарной свеклы, наблюдается высокое инфицирование почв с накоплением патогенных микроорганизмов, вызывающих корневые гнили. Решением данного вопроса является создание и внедрение новых гибридов сахарной свеклы, устойчивых к корневым гнилям, вызываемым грибами рода *Fusarium*. Для решения вопросов отбора устойчивых к корневой гнили генотипов актуальным является внедрение высокоэффективных ДНК-маркеров в селекционный процесс сахарной свеклы. Целью данного исследования было проведение апробирования аллель – специфической полимеразной цепной реакции по технологии *ASQ* на растениях сахарной свеклы по устойчивости к корневой гнили. Данный метод генотипирования является простым, доступным и бюджетным для использования в практической селекции растений. В исследованиях использовали *SNP (Single Nucleotide Polymorphism)* маркеры к генам кислой хитиназы сахарной свеклы (*BvSE2*, *BvSP2*), ассоциированные с устойчивостью к корневой гнили. Материалом служили 28 образцов сахарной свеклы из рабочей коллекции ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства». В результате исследований определен оптимальный состав и режим полимеразной цепной реакции для маркера *BvSE2*. Идентифицированы 23 образца сахарной свеклы, носители гомозиготной резистентной аллели *aa* гена кислой хитиназы *BvSE2*, 4 образца с гомозиготной чувствительной аллелью *bb* и 1 образец с гетерозиготной аллелью *ab*. Для молекулярного маркера *BvSP2* все еще требуется оптимизация полимеразной цепной реакции. Полученные результаты оптимизации по гену *BvSE2* могут быть применены в практической селекции сахарной свеклы для массового генотипирования по устойчивости к корневой гнили.

Ключевые слова: *Allele-specific q-PCR*; *SNP* – генотипирование; универсальные зонды; флуоресцентные красители; гасители; сахарная свекла.

APPROBATION OF ASQ TECHNOLOGY FOR GENOTYPING CHITINASE GENES SUGAR BEET SAMPLES

Amangeldiyeva Aigul

Master

LLP «Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing»

v. Almalybak, Kazakhstan

E-mail: aigul_seidinabiyeva@inbox.ru

Yerzhebayeva Raushan

Candidate of Biological Sciences

LLP «Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing»

v. Almalybak, Kazakhstan

E-mail: raushan.yerzhebayeva@zir.kz

Tabynbayeva Laila

PhD

LLP «Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing»

v. Almalybak, Kazakhstan

E-mail: tabynbaeva.lyaylya@mail.ru

Abstract

In the beet-growing regions of Kazakhstan, due to the permanent cultivation of sugar beet, there is a high infection of soils with the accumulation of pathogenic microorganisms that cause root rot. The solution to this issue is the creation and introduction of new sugar beet hybrids resistant to root rot caused by fungi of the genus *Fusarium*. To solve the issues of selection of genotypes resistant to root rot, the introduction of highly effective DNA markers into the selection process of sugar beet is relevant. The purpose of this study was to test an allele-specific polymerase chain reaction using *ASQ* technology on sugar beet plants for resistance to root rot. This method of genotyping is simple, affordable and budget-friendly for use in practical plant breeding. The studies used *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*) markers for sugar beet acid chitinase genes (*BvSE2*, *BvSP2*) associated with resistance to root rot. The material was 28 samples of sugar beet from the working collection of LLP «Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing». As a result of the studies, the optimal composition and mode of polymerase chain reaction for the *BvSE2* marker was determined. 23 sugar beet samples, carriers of the homozygous resistant *aa* allele of the *BvSE2* chitinase gene, 4 samples with the homozygous sensitive *bb* allele and 1 sample with the heterozygous *ab* allele were identified. Polymerase chain reaction optimization is still required for the *BvSP2* molecular marker. The obtained optimization results for the *BvSE2* gene can be applied in practical selection of sugar beet for mass genotyping for resistance to root rot.

Key words: *Allele-specific q-PCR; SNP – genotyping; universal probes; fluorescent dyes; quencher; sugar beet.*