

УДК 635.64:632.484:632.938

**ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ К Cf-2, Cf-5 И Cf-6 ГЕНАМ
УСТОЙЧИВОСТИ К КЛАДОСПОРИОЗУ ТОМАТА**

З.Е. Грушецкая, В.Д. Поликсенова, В.А. Лемеш, Л.В. Хотылева
Институт генетики и цитологии НАНБ, Республика Беларусь
E-mail: polyksenova@newmail.ru

РЕЗЮМЕ

На основании данных по картированию генома томата найдены молекулярно-генетические маркеры, позволяющие выявлять локусы Cf-2, Cf-5, и Cf-6 устойчивости к кладоспориозу томатов, которые далее могут быть использованы в селекционных программах при создании устойчивых сортов.

Ключевые слова: овощные культуры, томаты, молекулярно-генетические маркеры, устойчивость к кладоспориозу, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Признак устойчивости к кладоспориозу томатов, или бурой пятнистости листьев вызываемой грибом *Cladosporium fulvum* Ске. [1], является неизменным требованием при создании современных сортов томатов [1,2]. Ряд генов устойчивости путем селекции внесен в промышленные сорта томатов. Однако в последние годы в мире наблюдается тенденция к возрастанию вирулентности рас возбудителя, возникновению сложных рас, что приводит к преодолению устойчивости, определяемой большинством известных генов [1]. Таким образом, для создания устойчивых сортов как правило требуется введение нескольких локусов устойчивости к заболеванию.

Обычным методом тестирования на наличие определенных генов устойчивости к кладоспориозу является искусственное заражение популяцией возбудителя, предварительно идентифицированной на коллекции линий-дифференциаторов. Использование молекулярных маркеров позволяет избежать длительных, сложных и трудоемких предварительных исследований и провести тестирование индивидуальных растений на ранних стадиях развития по нескольким локусам одновременно. Целью наших исследований являлся поиск уникальных молекулярно-генетических маркеров, позволяющих выявить наличие *Cf-2* и *Cf-5* генов в геноме томата, а также локуса *Cf-6*, который был ранее локализован нами на 6 хромосоме томата [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служил набор линий-дифференциаторов с определенными генами устойчивости к кладоспориозу, предоставленных Нидерландским центром генетических ресурсов (CGN).

Из каждого индивидуального образца томата была выделена ДНК и проведен поиск молекулярных маркеров, выявляющих определенные гены устойчивости. Для поиска маркеров были подобраны праймеры 2-5 CF и CF5 на основании данных по картированию локусов *Cf-2* и *Cf-5* [4], предположительно имеющие родство к локусам *Cf-2* и *Cf-5*, и дающие при амплификации продукты определенного молекулярного веса. Праймер 2-2CR сконструирован нами на основании данных о нуклеотидной последовательности короткого плеча хромосомы 6 томата:

2-5CF 5'-GCTATCTTTGGGTATCAAAATCTT-3'

2-5CR 5'-AGATGACATCGACAAAATGTG-3'

CF5F2 5'-GTAATATCAGTGACCTTCACA -3'

CF5R2 5'-ATTTCCAAACTGAAAAG-3'

2-2CR 5'-TTAGATCACATCGACAAAACC-3'

Реакционная смесь включала от 50 до 100 нг геномной ДНК, по 0,25 mM прямого и обратного праймера, 0,2 mM каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP,

от 1,5 до 2,5 mM MgCl₂ и 1 единицу Taq-полимеразы в инкубационном буфере. Условия проведения реакции: денатурация - 4 мин при 94⁰ С; циклы 2 – 45, 1 мин. при 94⁰С, 1 мин. при 50-60⁰С и 2 мин при 72⁰С; цикл 36 – 10 мин при 72⁰С.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле с добавлением этидиум бромидом и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера 1 kb DNA ladder (BRL).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании данных по картированию локусов *Cf-2* и *Cf-5* [4] нами были подобраны праймеры 2-5 CF и CF5, предположительно имеющие сродство к локусам *Cf-2* и *Cf-5*, и дающие при амплификации продукты определенного молекулярного веса. В результате амплификации праймера 2-5 CF с набором линий-дифференциаторов были получены молекулярные маркеры ожидаемого размера в случае амплификации с индивидуальными растениями, содержащими локусы *Cf-2* и *Cf-5*, и минорный спектр продуктов амплификации того же веса с ДНК растений, содержащих локус *Cf-6*. Амплификация праймера с ДНК линий томата, содержащих другие локусы устойчивости, а также восприимчивых форм, отсутствовала. Таким образом, данный праймер выявляет кластер генов *Cf-2/5*, однако непригоден для выявления локуса *Cf-6* (Рис.1).

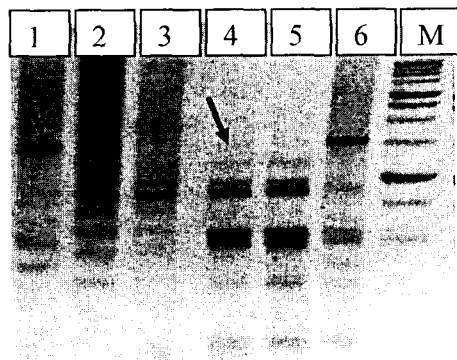


Рис. 1. Амплификация ДНК томата с праймером 2-5CF. ДНК томатов содержит локусы: 1- *Cf-2*, 2-3 - *Cf-5*, 4-6 - *Cf-6*. М – маркер молекулярной массы (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелкой обозначены уникальные маркеры

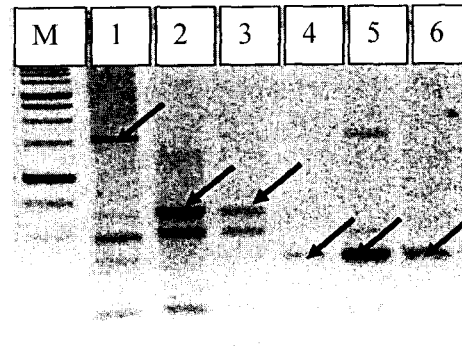


Рис. 2. Амплификация ДНК томата с праймером 2-2CR. ДНК томатов содержит локусы: 1- *Cf-2*, 2-3 - *Cf-5*, 4-6 - *Cf-6*. М – маркер молекулярной массы (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелкой обозначены уникальные маркеры

Амплификация ДНК томатов с праймером CF5 давала маркер ожидаемого молекулярного веса только у растений, содержащих локус *Cf-5*, в других случаях амплификация отсутствовала. На основании данных о нуклеотидной

последовательности короткого плеча хромосомы 6 томата, на котором картирован локус *Cf-6*, нами был сконструирован праймер 2-2CR, предположительно повышающий специфичность амплификации кластера *Cf-2/5*. Действительно, полученный спектр продуктов амплификации позволяет выявить как локусы *Cf-2* и *Cf-5*, так и *Cf-6*, в то время как с ДНК прочих линий-дифференциаторов амплификация отсутствует (Рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании предварительно полученных нами данных по локализации гена *Cf-6* устойчивости к кладоспориозу на 6 хромосоме томата разработаны молекулярно-генетические маркеры, позволяющие выявлять локусы *Cf-2*, *Cf-5*, и *Cf-6* устойчивости к кладоспориозу томатов, которые далее могут быть использованы в селекционных программах при создании устойчивых сортов.

Литература

1. Joosten M.H.A.J., De Wit P.J.G.M. The tomato – *Cladosporium fulvum* interaction: a versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. // Annu. Rev. Phytopathol. – 1999. - V. 37. - P. 335-367
2. Поликсенова В.Д. Ретроспективный обзор болезней томата в Беларуси и перспектива развития фитопатологической ситуации // Защита растений на рубеже XXI в. Материалы науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию БелНИИЗР (Минск-Прилуки, 19-21 февр. 2001 г.) - Минск, 2001. – С. 225-228.
3. Грушецкая З.Е. Маркирование локуса устойчивости к кладоспориозу *Cf-6* на шестой хромосоме томата // Молекуляр. генетика, геномика и биотехнология. Материалы междунар. науч. конф. 24-26 нояб. 2004 г. – Минск, 2004. – С. 329-330.
4. The Tomato *Cf-5* Disease Resistance Gene and Six Homologs Show Pronounced Allelic Variation in Leucine-Rich Repeat Copy Number / M.S. Dixon, K. Hatzixanthis, D.A. Jones, K. Harrison, J.D.G. Jones // The Plant Cell. - 1998. - V. 10. - P. 1915–1925.

SEARCH OF MOLECULAR MARKERS TO CF-2, CF-5 AND CF-6 GENES OF LEAF MOLD RESISTANCE OF TOMATO

Z.E. GRUSHETSKAYA, V.D. POLIKSENOVA, V.A. LEMESH,
L.V. KHOTYLYOVA

SUMMARY

Based on previously obtained tomato genome mapping data we designed specified molecular markers exclusively linked to leaf mold resistance loci Cf-2, Cf-5, and Cf-6. In future this markers can be widely used in breeding for development of new resistant varieties.