

УДК 631.524.86:635.64.088.5

З. Е. ГРУШЕЦКАЯ, В. Д. ПОЛИКСЕНОВА\*, В. А. ЛЕМЕШ

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ТОМАТА  
ПО УСТОЙЧИВОСТИ К КЛАДОСПОРИОЗУ МЕТОДОМ RAPD

(Представлено академиком Л. М. Суценой)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,  
\* Белорусский государственный университет

Поступило 18.09.2002

**Введение.** Бурая пятнистость листьев (кладоспориоз), вызываемая грибом *Cladosporium fulvum* Ske., во всем мире считается наиболее вредоносным заболеванием томатов закрытого грунта. Устойчивость к этому заболеванию должна быть неизменным качеством современного сорта, что позволит свести к минимуму потери урожая и сократить использование фунгицидов при выращивании томатов.

Несмотря на то, что многие гены устойчивости к кладоспориозу (*Sf* гены) картированы и включены в промышленные сорта, в последние годы в мире наблюдается тенденция к возрастанию вирулентности рас возбудителя, что приводит к преодолению устойчивости, определяемой большинством известных генов. В связи с этим проблема поиска и маркирования новых *Sf* генов остается актуальной.

Источниками желательных генов устойчивости к кладоспориозу могут быть дикие виды и полукультурные разновидности рода *Lycopersicon*. Предварительная оценка геномного полиморфизма устойчивых форм позволяет предположить, что наиболее генетически удаленные из них с большей долей вероятности содержат неизвестные *Sf*-локусы. Для успешного картирования генов необходим значительный исходный полиморфизм родительских форм, используемых при создании расщепляющейся популяции. Для оценки общей генетической изменчивости, картирования генов и изучения филогенетических отношений между представителями рода *Lycopersicon* используются белковые и ДНК-маркеры [1], а также один из наиболее простых и быстрых вариантов полимеразной цепной реакции (ПЦР) — RAPD-PCR анализ [2].

Цель нашей работы заключалась в изучении методом RAPD генетической изменчивости образцов томата, устойчивых к кладоспориозу, и установлении степени генетического родства диких видов с культурными сортами для оценки перспективы использования данных видов в качестве источников *Sf* генов.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили восприимчивый сорт белорусской селекции Перамога 165, 7 дифференциаторов рас *S. fulvum* (2 сорта и 5 линий) на основе *Lycopersicon esculentum* Mill. с известными генами устойчивости из коллекции кафедры ботаники БГУ, и 18 образцов диких видов из 6 географических источников, полученных из коллекции ВНИИР им. Н. И. Вавилова (г. Санкт-Петербург).

Образцы коллекции были оценены расой 1.2.3.4 на устойчивость к кладоспориозу методом искусственного заражения [3].

Тотальная геномная ДНК выделена из 300 мг свежей ткани по методу Plaschke и др. [4]. Для ПЦР использовали 10 коммерческих декамерных праймеров (Operon Technologies, Alameda, USA) и праймер p37 (Южный биотехнологический центр растениеводства УААН, г. Одесса), которые давали максимальное число фрагментов амплификации по результатам предварительных исследований.

Для расчета матрицы генетических дистанций по Жаккарду был использован пакет программ PhylTools [5]. На основании полученной матрицы с помощью программного пакета Phylip [6] методом ближайших соседей (NJ) построена дендрограмма, отражающая филогенетические связи между изученными образцами.

**Результаты и обсуждение.** Оценка коллекции томатов на устойчивость к кладоспориозу расой 1.2.3.4 выявила 7 иммунных и 4 устойчивых образца (табл. 1), которые содержат Cf-локусы, отличные от широко используемых в селекции генов Cf1, Cf2, Cf3 и Cf4.

Для дальнейших исследований были отобраны образцы диких видов с высокой степенью устойчивости (I- и R-реакция), и образцы *L. esculentum* (дифференциаторы и сорт Перамога 165).

Таблица 1. Устойчивость коллекции образцов рода *Lycopersicon* к кладоспориозу

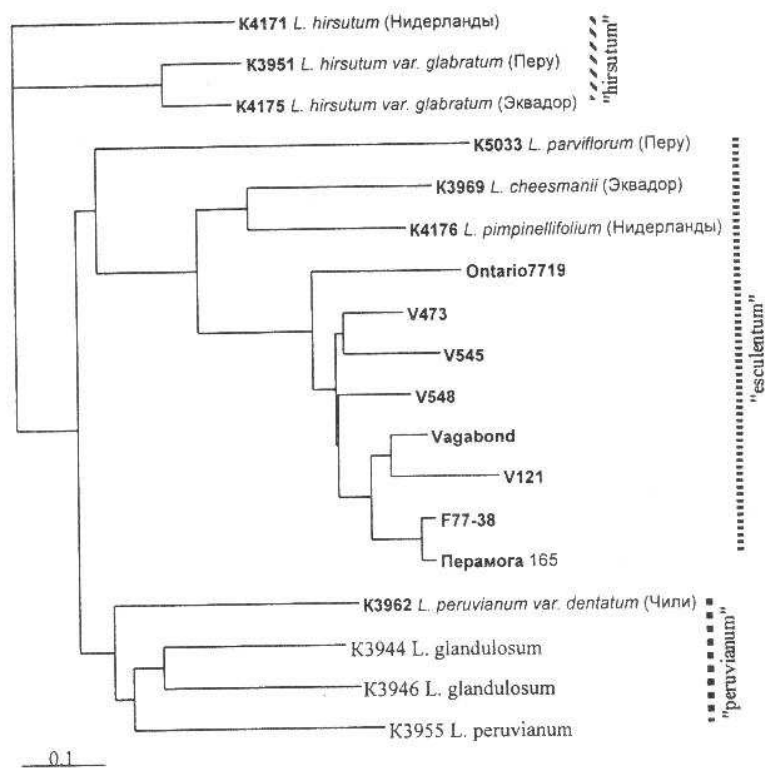
Номер	Образец	Вид	Происхождение	Устойчивость к <i>S. fulvum</i>
1	K5710	<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Колумбия	S
2	K5451	<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Германия	S
3	K5031	<i>L. chilense</i>	Нидерланды	S
4	K5033	<i>L. parviflorum</i>	Перу	I
5	K3969	<i>L. cheesmanii</i>	Эквадор	I
6	K4174	<i>L. pimpinellifolium</i>	Нидерланды	S
7	K4176	<i>L. pimpinellifolium</i>	Нидерланды	I
8	K4228	<i>L. pimpinellifolium</i>	Перу	S
9	K3948	<i>L. hirsutum</i>	Перу	S
10	K4171	<i>L. hirsutum</i>	Нидерланды	R
11	K3951	<i>L. hirsutum</i> var. <i>glabratum</i>	Перу	R
12	K4175	<i>L. hirsutum</i> var. <i>glabratum</i>	Эквадор	I
13	K3952	<i>L. peruvianum</i>	Перу	S
14	K3955	<i>L. peruvianum</i>	Перу	I
15	K3962	<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	Чили	I
16	K3963	<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	Перу	S
17	K3944	<i>L. glandulosum</i>	Перу	R
18	K3946	<i>L. glandulosum</i>	Перу	R
19	Vagabond	<i>L. esculentum</i>	Канада	S
20	V121	<i>L. esculentum</i>	Канада	S
21	V473	<i>L. esculentum</i>	Канада	S
22	V545	<i>L. esculentum</i>	Канада	S
23	V548	<i>L. esculentum</i>	Канада	S
24	F77-38	<i>L. esculentum</i>	Канада	I
25	Ontario7719	<i>L. esculentum</i>	Канада	I
26	Перамога 165	<i>L. esculentum</i>	Беларусь	S

Примечание: образцы № 1–18 получены из коллекции ВНИИР им. Н. И. Вавилова, № 19–26 из коллекции кафедры ботаники БГУ; I — иммунные, R — устойчивые, S — восприимчивые.

В результате RAPD-анализа коллекции томатов было получено 142 полиморфных продукта амплификации. Количество амплифицируемых фрагментов в зависимости от праймера колебалось от 3 до 14, их размеры варьировали от 200 до 1600 пн. Уровень полиморфизма для всех образцов коллекции составлял от 58% до 100% (в среднем 81%), в то время как для дифференциаторов, созданных на основе *L. esculentum* — от 0 до 63% (в среднем 20%) (табл. 2). Вместе с тем образцы одной таксономической группы, но из различных географических источников, были значительно более мономорфны. У них уровень полиморфизма варьировал от 9.5% (образцы *L. hirsutum* var. *glabratum* из Перу и Эквадора) до 11% (образцы *L. glandulosum* из различных районов Перу).

Таблица 2. Сравнительный анализ полиморфизма продуктов амплификации ДНК томатов с RAPD-праймерами

Праймер	Количество PCR-фрагментов		Общий уровень полиморфизма, %	Количество PCR-фрагментов образцов <i>L. esculentum</i>		Уровень полиморфизма образцов <i>L. esculentum</i> , %
	всего	полиморфных		всего	полиморфных	
OPA08	13	12	92	7	4	57
P37	11	9	82	6	0	0
OPU05	10	10	100	8	5	63
OPU07	14	14	100	10	2	20
OPU15	11	8	73	7	2	29
OPV08	14	14	100	7	1	14
OPV09	13	8	62	8	2	25
OPV10	11	11	100	8	0	0
OPV12	11	4	36	7	0	0
OPX01	12	7	58	8	0	0
OPX14	10	7	70	6	2	33
OPY02	9	8	89	6	0	0



Дендрограмма филогенетических отношений между образцами коллекции томатов. В скобках указана страна, из которой образец поступил в коллекцию ВНИИР им. Вавилова. Длина ветвей соответствует генетическим дистанциям между образцами коллекции

способные скрещиваться между собой. Его представителей ряд исследователей, в частности Мюллер [2], относят к подроду *Eulycopersicon*. В свою очередь кластер подразделяется на группу видов с зелеными плодами, представителем которой является *L. parviflorum*, и группу красноплодных *L. cheesmanii*, *L. pimpinellifolium*, и *L. esculentum*, что согласуется с данными Миллера и Тэнксли [7].

Кластер «peruvianum» включает самонесовместимые виды, неспособные скрещиваться с представителями других кластеров. С. М. Рик выделяет виды этого кластера в отдельный «peruvianum-комплекс» [8].

Кластер «hirsutum» — группа, находящаяся на расстоянии 0,0968 и 0,11271 от кластера 1 и 2 соответственно. По признаку самонесовместимости Мюллер объединяет виды, входящие в этот кластер, и виды кластера «peruvianum» в подрод *Egiopersicon* [1]. Вместе с тем представители этой группы способны скрещиваться как между собой, так и с видами «esculentum» кластера, что дает основание С. М. Рикю относить эти два кластера к общей группе, называемой «esculentum-комплексом». На основании полученных нами данных можно утверждать, что группа «hirsutum» достаточно генетически обособлена от других видов, и ей можно придать самостоятельный систематический статус. Сходные данные были недавно получены Маршаллом с соавторами при сравнении последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) ядерной рибосомальной ДНК коллекции томата [9].

Анализ генетических дистанций между восприимчивым сортом Перамора 165 и устойчивыми к кладоспориозу образцами коллекции показал, что наиболее перспективными источниками *Sf*-генов могут быть формы K5033, K3955, K3962, K3944 и K3946 со значениями дистанций 0,85; 0,77; 0,72; 0,70 и 0,71 соответственно. Высокий уровень полиморфизма (73%) был также отмечен между сортом Перамора 165 и видами кластера «hirsutum», однако, поскольку *L. hirsutum* является донором ряда известных генов устойчивости, мы считаем возможным исключить его и генетически близкие виды из числа источников новых локусов устойчивости.

Таким образом, показано, что с помощью RAPD-метода можно достаточно быстро и эффективно оценить меж- и внутривидовую генетическую изменчивость томата и установить филогенетические связи в пределах рода *Lycopersicon*. Полученные результаты дают основа-

На основании полученных данных методом ближайших соседей (NJ) была построена филогенетическая дендрограмма (рисунок).

Анализ образцов коллекции показал их разделение на три крупных кластера:

1) «esculentum», включающий виды *L. parviflorum*, *L. cheesmanii*, *L. pimpinellifolium*, сорта и линии на основе *L. esculentum*;

2) «hirsutum» (*L. hirsutum*, *L. hirsutum* var. *glabratum* (Перу), *L. hirsutum* var. *glabratum* (Эквадор));

3) «peruvianum» (*L. peruvianum*, *L. peruvianum* var. *dentatum* и *L. glandulosum*).

Главными таксономическими признаками, на основании которых выделяют группы внутри рода *Lycopersicon*, являются самосовместимость, способность к скрещиванию и цвет плода.

Кластер «esculentum» включает самосовместимые виды,

ние предположить, что устойчивые к кладоспориозу дикие виды и разновидности, которые наиболее генетически удалены от *L. esculentum*, могут использоваться при создании популяции для картирования Cf-генов.

### Литература

1. Egashira H., Ishihara H., Takashina T., Imanishi S. // *Euphytica*. 2000. Vol. 116. P. 23—31.
2. Williams J. C. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. // *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 6531—6535.
3. Поликсенова В. Д. // Методы оценки картофеля, овощных и плодовых культур на устойчивость к болезням. 1987. С. 57—61
4. Plaschke J., Ganai M. W., Roder M. S. // *Theor. Appl. Genet.* 1995. Vol. 91. P. 1001—1007.
5. Buntjer J. B. *Phylogenetic Computer Tools* Vol. 1.3 // Wageningen University, The Netherlands. 1997—2001.
6. Felsenstein J. // University of Washington. Seattle. 1986.
7. Miller J. C., Tanksley S. D. // *Theor. Appl. Genet.* 1990. Vol. 80. P. 437—448
8. Rick C. M. // *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, Linnean Society of London. 1979. P. 667—678.
9. Marshall J. A., Knapp S., Davey M. R., Power J. B., Cocking E. C., Bennett M. D., Cox A. V. // *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103 P. 1216—1222.

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

### RAPD EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF TOMATO THROUGH RESISTANCE TO TOMATO LEAF MOULD

#### Summary

The extent of a genetic diversity among wild and cultivated tomato accessions, previously identified as highly resistant to tomato leaf mould, was evaluated by RAPD. Genetic dissimilarity values between genotypes calculated by the RAPD data were used to produce a dendrogram of relationships between accessions using the neighbour-joining method (NJ). These results will be useful in the identification of suitable parents for the development of mapping populations for tagging tomato leaf mould resistance genes.