

УДК 575.116.4:633.2: 631.523

КАРТИРОВАНИЕ ЛОКУСА *Cf-6* УСТОЙЧИВОСТИ К КЛАДОСПОРИОЗУ ТОМАТА С ПОМОЩЬЮ SSR-МАРКЕРОВ

© 2007 г. З. Е. Грушецкая¹, В. А. Лемеш¹, В. Д. Поликсенова², Л. В. Хотылева¹

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск 220072, Беларусь; факс: (+375 17) 284-19-17; e-mail: z_grushetskaya@mail.ru

²Белорусский государственный университет, кафедра ботаники и микологии, Минск, 220030 Беларусь

Поступила в редакцию 20.02.2007 г.
Окончательный вариант получен 08.06.2007 г.

Локус *Cf-6*, который обеспечивает устойчивость к белорусской популяции возбудителя кладоспориоза томатов, картирован в районе 2.2 и 3.4 сМ от микросателлитных маркеров SSR128 и SSR48 соответственно. Установлено, что ген *Cf-6* расположен на коротком плече 6 хромосомы томата, как и кластер *Cf-2/Cf-5*, однако фитопатологически и молекулярно отличим от данных генов. На основании нуклеотидной последовательности гена *Cf-2* создан молекулярный маркер 2–2С, способный выявлять локусы *Cf-6*, *Cf-2*, *Cf-5*.

Бурая пятнистость листьев томата, или кладоспориоз, вызываемая грибом *Cladosporium fulvum* Ске. [1], считается одним из наиболее вредоносных заболеваний томатов закрытого грунта в большинстве регионов мира [2, 3]. Устойчивость к этому заболеванию является неременным требованием при создании современного сорта или гибрида. Один из наиболее экономически эффективных способов борьбы с заболеванием – создание устойчивых сортов, что позволяет одновременно сократить использование фунгицидов и минимизировать потери урожая.

Большинство диких видов рода *Lycopersicon* L. устойчивы к возбудителю бурой пятнистости в отличие от исходно восприимчивых культурных сортов томата и являются источниками генов устойчивости, которые путем селекции внесены в современные промышленные сорта томатов. Так, локусы *Cf-2* и *Cf-9* были привнесены из *L. pimpinellifolium* (Mill.) Brezh.[4–6], источником локуса *Cf-5* послужила одна из форм *L. esculentum* var *cerasiforme* (Dun.) Gray [7], локуса *Cf-4* – *L. hirsutum* (Humb. et Bonpl.) Dun.[4, 8]. Комбинация классических методов картирования и картирования с помощью RFLP, CAPS и SSR-анализа позволила доказать, что все картированные на данный момент *Cf*-гены располагаются на двух хромосомах томата [7, 9–13]. Гены *Cf-4* и *Cf-9* были картированы на коротком плече хромосомы 1, на интервале в 5 сМ между RFLP-маркерами TG236 (на 3 сМ проксимальнее *Cf-4/Cf-9*) и GP46 (на 2 сМ дистальнее *Cf-4/Cf-9*) [14–16]. В области кластера *Cf-4/Cf-9* картирован ген *Cf-1*, источником которого является сорт *L. esculentum* Stirling Castle [8]. Блоттинг-анализ ДНК нескольких близкородственных линий томата с использованием зонда к 5'

концу *Cf-9* выявил полиморфный мультигенный кластер в исследуемой области – *Hcr-9* (homologues of *C. fulvum* resistance gene *Cf-9*), который включает пять гомологичных последовательностей. Сходная картина описана и для растений с генотипом *Cf-4*, в геноме которых найдено пять гомологичных последовательностей от *Hcr9-4A* до *Hcr9-4E*, из которых *Hcr9-4D* является функциональным геном *Cf-4* [12]. Таким образом, гены *Cf-4*, *Cf-4A* и *Cf-9*, пять *Hcr-9* последовательностей и позднее картированный слабый ген *Cf-1* принадлежат одному кластеру, названному Milky Way.

Гены *Cf-2* и *Cf-5* были картированы на коротком плече хромосомы 6, на интервале в 4–5 сМ между RFLP-маркерами СТ119 (проксимальнее *Cf-2/Cf-5*) и GP79 (дистальнее *Cf-2/Cf-5*) [10, 17]. Было обнаружено, что некоторые тест-линии *Cf-2* растений содержат два функционирующих *Cf* гена – *Cf-2.1* и *Cf-2.2*, а также нефункциональную гомологичную последовательность *Hcr2-2A* (homologues of *C. fulvum* resistance gene *Cf-9*) [10, 18]. В составе генома *Cf-5* растений также были найдены помимо работающего *Cf-5* три дополнительные гомологичные последовательности – *Hcr2-5A*, *B*, и *D* [11].

Фитопатологический мониторинг распространенности и вредоносности кладоспориоза томата свидетельствует о том, что, как и в начале 70-х годов XX в., когда были начаты систематические исследования этого заболевания в Беларуси, кладоспориоз продолжает встречаться во всех типах теплиц и во всех культуурооборотах. Многолетняя ритмика развития болезни в теплицах имеет волнообразный характер, наиболее значительные вспышки кладоспориоза совпадают с появлением

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных SSR-праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера	Литературный источник
EST253712F	5'-Cy5GAAATGAAGCTCTGACATCAAA-3'	Areshchenkova et al., 1999 [22]
EST253712R	5'-TCATGCTTGCATATGTTTCATG-3'	То же
TMS63F	5'-Cy5GCAGGTACGCACGCATATAT-3'	»
TMS63R	5'-GCTCCGTCAGGAATTCTCTC-3'	»
SSR48F	5'-Cy5ATCTCCTTGGCCTCCTGTTT-3'	[23]
SSR48R	5'-GTCATGGCCACATGAATACG-3'	[23]
SSR128F	5'-Cy5GGTCCAGTTCAATCAACCGA-3'	[24]
SSR128R	5'-TGAAGTCGTCTCATGGTTCG-3'	[24]

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера	Литературный источник
2-5CF	5'-GCTATCTTTGGGTATCAAAATCTT-3'	Dixon et al., 1998 [11]
2-5CR	5'-AGATGACATCGACAAAATGTG-3'	То же
CF5F2	5'-GTAATATCAGTGACCTTCACA-3'	»
CF5R2	5'-ATTTTCCAAACTGAAAAG-3'	»
2-2CR	5'-TTAGATCACATCGACAAAACC-3'	Сконструирован авторами

новых физиологических рас возбудителя заболевания *S. fulvum* с расширенным спектром вирулентности. Общая фитопатологическая ситуация свидетельствует о высокой адаптивной способности возбудителя кладоспориоза.

Определение расового состава изолятов *S. fulvum*, выделенных из различных сортов томата в пленочных и остекленных теплицах, проводилось нами в 2002, 2003 и 2004 гг. [19]. Результаты оценки, которая осуществлялась на двух наборах тест-сортов, предоставленных Нидерландским центром генетических ресурсов (Centre of Genetic Resource, Netherlands, CGN), позволяют утверждать, что раса возбудителя с широким спектром вирулентности – 1.2.3.4.5.9 способна преодолевать устойчивость, определяемую большинством известных генов томата. В качестве одного из перспективных источников устойчивости наше внимание привлек ген *Cf-6*, который длительное время обеспечивает устойчивость к популяции возбудителя кладоспориоза, однако до сих пор не картирован [1–3].

Целью данной работы являлась локализация гена *Cf-6* устойчивости к кладоспориозу на генетической карте томата с помощью молекулярных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили образцы F₂ популяций томата, расщепляющихся по признаку устойчивости к кладоспориозу:

1) популяция, полученная от скрещивания восприимчивого сорта белорусской селекции Перамога 165, не содержащего генов устойчивости к кладоспориозу, и линии F77-38 с геном *Cf-6* (Перамога 165(*Cf-0*) × F77-38 (*Cf-6*)).

2) популяция, полученная от скрещивания близкоизогенных линий томата CGN15339 с геном *Cf-2*, и CGN15839 с геном *Cf-6* (CGN15339(*Cf-2*) × CGN15839(*Cf-6*)).

В качестве отрицательного контроля использовали восприимчивую линию томата CGN14330 и сорт белорусской селекции Перамога 165. Линии томата предоставлены Нидерландским центром генетических ресурсов.

Оценка томатов на устойчивость к кладоспориозу осуществлялась по методике, адаптированной В.Д. Поликсеновой [20], и проводилась на жестком инфекционном фоне при искусственном заражении предварительно идентифицированной расой возбудителя заболевания. Для заражения расщепляющейся популяции отбирали такой генотип патогена, который обеспечивал бы отбор растений томата с геном *Cf-6*. В качестве источника для приготовления инокулюма применялись чистые культуры гриба 10–14-дневного возраста. Оптимальная плотность инокулюма составляла 2 × 10⁵ конидий/мл, температура на момент заражения – 20°C, влажность – около 80%. Заражение растений проводилось путем нанесения конидиальной суспензии мелкого распыла. Учет заболевших растений проводился после того, как контрольный восприимчивый сорт поразится на 100%. Выделяли

два типа реакции: R (Resistant) – признаки заражения отсутствуют либо на листьях образуются мелкие некрозы, отмечаются единичные споры патогена; S (Susceptible) – на листьях образуются хлоротичные пятна с хорошо заметным спороношением.

Изоляция штаммов *C. fulvum* осуществлялась в различных областях Беларуси с разных сортов томата зимних остекленных и весенних пленочных теплиц. Идентификацию рас проводили на двух наборах тест-сортов, содержащих известные гены устойчивости. Заражение растений осуществляли путем инфицирования растений в фазе 3–4 настоящих листьев, реакцию линий-дифференциаторов учитывали через 5–7 дней после появления типичных симптомов поражения на восприимчивой линии CGN14330 и сорте Перамога 165. Выводы о расовой принадлежности изолята делались на основе реакции восприимчивости, т.е. способности поражать определенный генотип томата.

ДНК выделяли из листьев индивидуальных образцов томата весом от 100 до 300 мг по методике Plaschke [21]. Концентрация ДНК в рабочем растворе составляла приблизительно 50–150 нг/мкл, реакционная смесь включала по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, от 1.5 до 2.5 mM MgCl₂ и 1 ед. *Taq*-полимеразы в инкубационном буфере. Для SSR-анализа использовали праймеры, локализованные на 1-й и 6-й хромосомах томата (табл. 1).

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе MyCycler (BioRad). Условия проведения реакции были следующими: денатурация – 4 мин при 94°C; циклы 2 – 45: 1 мин при 94°C, 1 мин при 50–60°C в зависимости от праймера и 2 мин при 72°C; цикл 46 – 10 мин при 72°C. Амплификационные фрагменты анализировали в 6%-ном полиакриламидном денатурирующем геле на секвенаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech).

Определение сцепления между локусом устойчивости к кладоспориозу томата и молекулярными маркерами осуществляли при помощи компьютерной программы MAPMAKER v.3.0 [25].

Для анализа *Cf*-локусов были использованы праймеры 2-5CF и CF5 [11], дающие при амплификации продукты определенного молекулярного веса. Праймер 2-2CR сконструирован нами на основании данных о нуклеотидной последовательности гена *Cf-2* [18] (табл. 2).

Условия проведения реакции: денатурация – 4 мин при 94°C; циклы 2 – 35: 1 мин при 94°C, 1 мин при 50–60°C и 2 мин при 72°C; цикл 36 – 10 мин при 72°C.

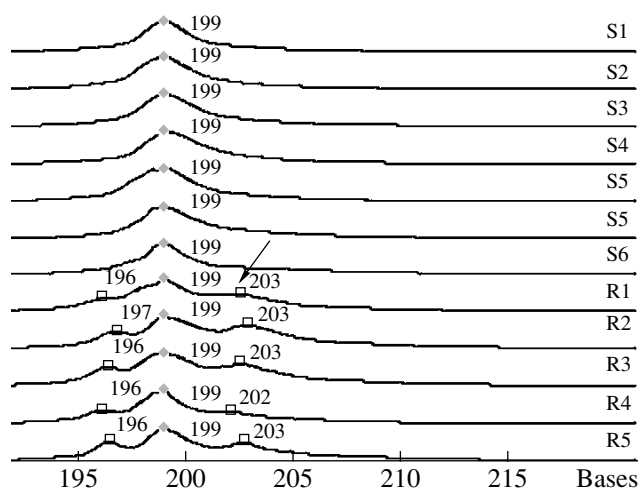


Рис. 1. Фрагменты, полученные в результате амплификации с праймерами SSR48. Стрелкой отмечен маркер, полиморфный между устойчивой и восприимчивой формами. Образцы R – устойчивые, S – восприимчивые.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образцы расщепляющихся по признаку устойчивости к кладоспориозу F₂ популяций Перамога 165 (*Cf-0*) × F77-38 (*Cf-6*) и CGN15339 (*Cf-2*) × CGN15839 (*Cf-6*) были оценены на устойчивость к возбудителю заболевания [20]. Определение расового состава изолятов *C. fulvum*, выделенных из различных сортов томата в пленочных и остекленных теплицах, показало, что расы, выделенные в 2002 г. не содержат генов авирулентности 1.2,3,4; а в 2003 г. – генов 1.2,3,4,5,9 соответственно. Поэтому в обеих F₂ популяциях следует ожидать расщепление по признаку устойчивости к кладоспориозу, обусловленное геном *Cf-6*, так как локус *Cf-2* от родительской формы CGN15339 должен преодолевать патогеном, и растения с таким геном будут вести себя как восприимчивые. Действительно, предварительное тестирование F₁ гибридов, как и отцовских линий с геном *Cf-6*, показало, что они проявляли устойчивость в отличие от материнских форм Перамога 165 и CGN15339, что свидетельствует о доминантном характере гена устойчивости. Расщепление F₂ популяций соответствует ожидаемому при моногибридном наследовании: Перамога 165 × F77-38 – 73 устойчивых : 27 восприимчивых образцов ($\chi^2 = 0.21$, $P = 0.6$), CGN15339 × CGN15839 – 48 устойчивых : 20 восприимчивых, ($\chi^2 = 0.71$, $P = 0.4$).

Для определения возможного сцепления микросателлитных маркеров 1-й и 6-й хромосом томата с геном устойчивости к кладоспориозу *Cf-6* было проведено сравнение электрофоретических спектров родительских форм томата, использованных для скрещивания, и образцов расщепляющейся популяции F₂. Для предварительного скри-

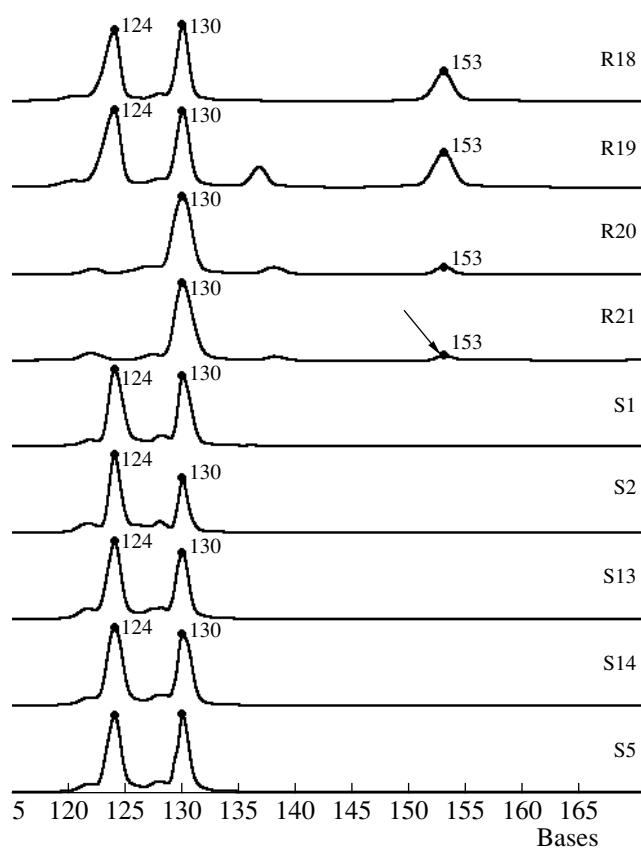


Рис. 2. Фрагменты, полученные в результате амплификации с праймерами SSR128. Стрелкой отмечен маркер, полиморфный между устойчивой и восприимчивой формами. Образцы R – устойчивые, S – восприимчивые.

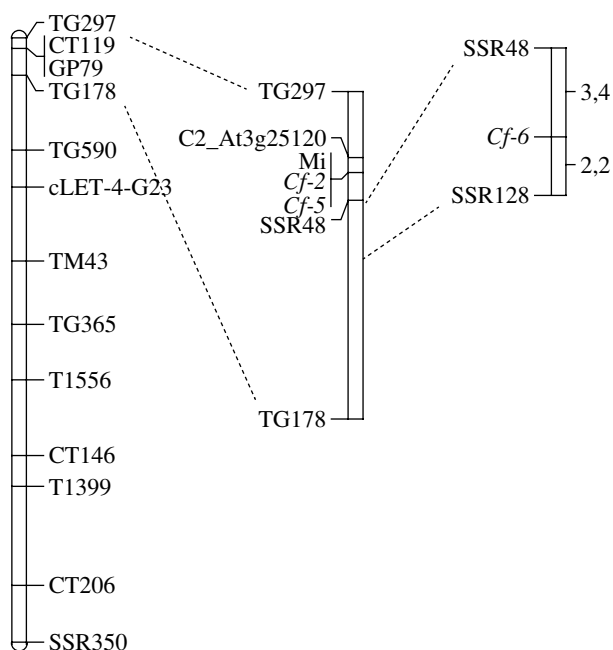


Рис. 3. Локализация гена *Cf-6* на генетической карте томата Tomato-EXPEN 2000 [26].

нинга были случайным образом отобраны 10 устойчивых (содержащих ген *Cf-6*) и 10 восприимчивых (содержащих ген *Cf-2*) растений томата.

В результате анализа полученных амплификационных фрагментов было найдено три SSR-праймера, продукты амплификации которых обнаруживали полиморфизм между устойчивыми и восприимчивыми формами: SSR48, SSR128 и EST253. Маркеры SSR48 и SSR128, локализованные на 6-й хромосоме томата, продемонстрировали наиболее тесное сцепление с признаком устойчивости (рис 1, 2).

Данные микросателлитного анализа образцов F_2 популяций сопоставляли с результатами фитопатологической оценки индивидуальных образцов на устойчивость к кладоспориозу. Количество рекомбинационных событий между молекулярным маркером и признаком устойчивости составляло 3 для маркера SSR48 и 2 для для маркера SSR128, причем в одном случае рекомбинация присутствует по обоим молекулярным маркерам.

Анализ расщепления маркеров и признака устойчивости на индивидуальных образцах F_2 популяции с помощью программы MAPMAKER показал, что маркеры SSR48 и SSR128, локализованные на 6-й хромосоме томата, демонстрировали сцепление с признаком устойчивости к кладоспориозу на дистанции 3.4 и 2.2 cM соответственно.

Согласно данным о расположении маркеров SSR48 и SSR128 на микросателлитной карте томата и на основании генетических дистанций между маркерами и признаком устойчивости к кладоспориозу на образцах F_2 популяции, нами установлено, что исследуемый локус *Cf-6*, как и кластер *Cf-2/Cf-5*, локализован на коротком плече хромосомы 6 томата (рис. 3).

Для анализа *Cf*-локусов были использованы праймеры 2-5C и CF5, разработанные Dixon et al. [11] на основании нуклеотидной последовательности гена *Cf-5* и дающие при амплификации продукты определенного молекулярного веса.

В результате амплификации праймеров 2-5C с набором линий-дифференциаторов были получены молекулярные маркеры ожидаемого размера в случае амплификации с индивидуальными растениями, содержащими локусы *Cf-2* (1600 пн) и *Cf-5* (800 пн). Для растений с геном *Cf-6* получен спектр продуктов амплификации того же веса (дорожки 4–5), который не позволяет достоверно различить гены *Cf-5* и *Cf-6* (рис. 4). Амплификация праймеров с ДНК линий томата, содержащих другие локусы устойчивости, а также восприимчивых форм отсутствовала. Таким образом, полученные маркеры выявляют кластер генов *Cf-2/5*, однако непригодны для выявления локуса *Cf-6* (рис. 4). Амплификация ДНК томатов с праймерами CF5 давала маркер ожидаемого молекулярного веса только у растений, содержащих локус

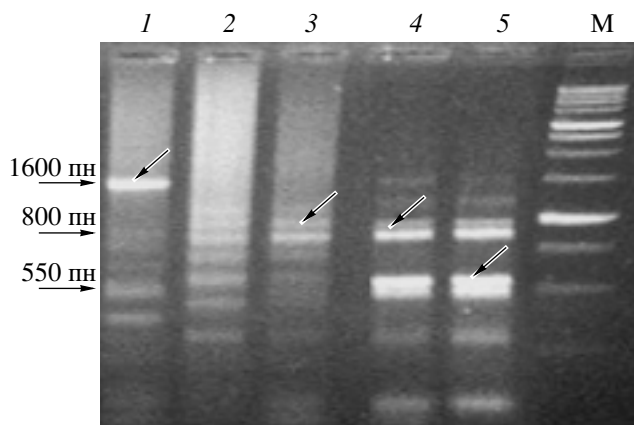


Рис. 4. Амплификация ДНК томата с праймерами 2-5С. ДНК томатов содержит локусы: 1 – *Cf-2*, 2, 3 – *Cf-5*, 4, 5 – *Cf-6*. М – маркер молекулярной массы (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелкой обозначены уникальные маркеры.

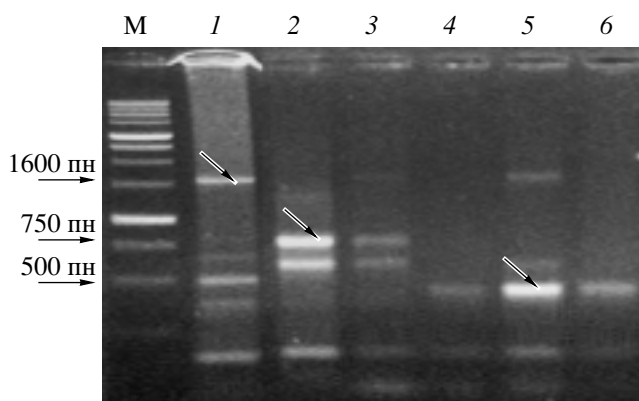


Рис. 5. Амплификация ДНК томата с праймерами 2-5CF и 2-2CR. ДНК томатов содержит локусы: 1 – *Cf-2*; 2, 3 – *Cf-5*; 4–6 – *Cf-6*. М – маркер молекулярной массы (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелкой обозначены уникальные маркеры.

Cf-5, в других случаях амплификация отсутствовала.

На основании данных о нуклеотидной последовательности гена *Cf-2* нами был сконструирован праймер 2-2CR. Мы предположили, что использование его вместо 2-5CR повышает специфичность амплификации как кластера *Cf-2/5*, так и гена *Cf-6*. Действительно, при амплификации ДНК линий томата с праймерами 2-5CF/2-2CR полученный спектр фрагментов позволяет выявить как локусы *Cf-2* (1600 пн) и *Cf-5* (750 пн), так и *Cf-6* (550 пн), в то время как с ДНК прочих линий-дифференциаторов амплификация отсутствует (рис. 5).

Таким образом, нами установлено, что ген *Cf-6* устойчивости к кладоспориозу томатов локализован на коротком плече хромосомы 6 на дистанции

2.2 и 3.4 сМ от микросателлитных маркеров SSR128 и SSR48 соответственно. На основании полученных нами данных по локализации гена *Cf-6* 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Многолетняя динамика гриба *Cladosporium fulvum* Ске. (syn. *Fulvia fulva* (Cre.) Cur-ruli), паразитирующего на культуре томата в Беларуси // Актуальные проблемы изучения фито- и микобиоты: Сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. 25–27 октября 2004г. Минск, 2004. С. 180–182.
3. Lindhout P., Cislak M., Korta W. et al. Further identification of races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato originated from the Netherlands, France and Poland // Neth. J. Plant Pathol. 1989. V. 95. P. 43–48.
4. Жученко А.А., Глуценко Е.Я., Андриященко В.К. и др. Дикие виды и полукультурные разновидности томатов и использование их в селекции. Кишинев: Картя молдавеныскэ, 1974. 139 с.
5. Tichelaar E.C. Report Tomato Genetic Cooperative. 1984. V. 34. P. 55–57.
6. Храпалова И.А. Томат – *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. // Генетические коллекции овощных растений. Ч. 3. СПб., 2001. С. 18–93.
7. Jones D.A., Dickinson M.J., Balint-Kurti P.J. et al. Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum* // Mol. Plant Microbe Interact. 1993. V. 6. P. 348–357.
8. Kerr E.A., Bailey D.L. Resistance to *Cladosporium fulvum* Cke. obtained from wild species of tomato // Can. J. Bot. 1964. V. 42. P. 1541–1553.
9. Kanwar J.S., Kerr E.A., Harney K.M. Linkage studies in tomato - *Cf* genes determining resistance to tomato leaf mold, *Cladosporium fulvum* Cke. // Can. J. Genet. and Cytol. 1980. V. 22. P. 4.
10. Dixon M.S., Jones D.A., Hatzixanthis K. et al. High-resolution mapping of the physical location of the tomato *Cf-2* gene // Mol. Plant Microbe Interact. 1995. V. 8. P. 200–206.
11. Dixon M.S., Hatzixanthis K., Jones D.A. et al. The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 1915–1925.
12. Haanstra J.P.W., Meijer-Dekens F., Lauge R. et al. Mapping strategy for resistance genes against *Cladosporium fulvum* on the short arm of Chromosome 1 of tomato: *Cf-Ecp5* near the *Hcr* Milky Way cluster // Theor. Appl. Genet. 2000. P. 661–668.

13. Haanstra J.P., Lauge R., Meijer-Dekens F. et al. The Cf-ECP2 gene is linked to, but not part of, the Cf-4/Cf-9 cluster on the short arm of chromosome 1 in tomato // Mol. Gen. Genet. 1999. V. 262. P. 839–845.
14. Balint-Kurti P.J., Dixon M.S., Jones D.A. et al. RFLP linkage analysis of the Cf-4 and Cf-9 genes for resistance to *Cladosporium fulvum* in tomato // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 88. P. 691–700.
15. Bonnema G., Schipper D., van Heusden S. et al. Tomato chromosome 1: high resolution genetic and physical mapping of the short arm in an interspecific *Lycopersicon esculentum* × *L. peruvianum* cross // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 253. P. 455–462.
16. De Wit P.J., Joosten M.H. Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum* - tomato interaction // Curr. Opinion in Microbiol. 1999. V. 2. P. 368–373.
17. Dickinson M.J., Jones D.A., Jones J.D. Close linkage between the Cf-2/Cf-5 and Mi resistance loci in tomato // Mol. Plant Microbe Interact. 1993. V. 6. P. 341–347.
18. Dixon M.S., Jones D.A., Keddie J.S. et al. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins // Cell. 1996. V. 84. P. 451–459.
19. Поликсенова В.Д., Грушецкая Э.Е. Идентификация внутривидового полиморфизма гриба *Cladosporium fulvum* Cooke по признаку вирулентности // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2. 2004. С. 21–25.
20. Поликсенова В.Д. Комплекс методов оценки томата при селекции на болезнеустойчивость // Овощеводство на рубеже третьего тысячелетия: Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 75-летию со дня организации Белорусского НИИ овощеводства. 6–7 мая 2000 г. Минск, 2000. С. 165–169.
21. Plaschke J., Ganal M.W., Ruder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 1001–1007.
22. Areshchenkova T., Ganal M.W. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions // Genome. 1999. V. 42. P. 536–544.
23. <http://www.sgn.cornell.edu/search/markers/marker-info.pl?marker-id=721>
24. <http://www.sgn.cornell.edu/search/markers/marker-info.pl?marker-id=801>
25. Lander E.S., Green P., Abrahamson J. et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // Genomics. 1987. V. 1. P. 174–181.
26. <http://www.sgn.cornell.edu/cview/map.pl?map-id>