

УДК 635.64: 631.527:632.9

**ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЕКЦИОННЫХ ЛИНИЙ ТОМАТА
К ФУЗАРИОЗНОМУ УВЯДАНИЮ**

Д.АМИНИ*, Г.Ф. МОНАХОС

(Селекционная станция им. Н. Н. Тимофеева)

Приведены результаты оценки устойчивости коллекции селекционного материала с использованием искусственного инфекционного фона и сравнение ее с результатами молекулярного маркирования. Анализ спектров ДНК, амплифицированных специфическими праймерами, позволял проводить отбор устойчивых растений томата по генотипу, выявляя гомо- и гетерозиготное состояние гена I_2 . При использовании метода молекулярного маркирования необходимо меньше времени и он дешевле метода искусственного заражения. При использовании инфекционного фона для успешного развития заболевания требуется соблюдение определенных условий окружающей среды.

Фузариозное увядание томата, вызываемое грибом *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder et Hansen, одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний томата, которое приводит к значительным потерям урожая, как в открытом, так и в защищенном грунте [4]. Это заболевание встречается в разных странах мира [5, 13], впервые было описано Masseur [8]. Селекция к патогену затруднена, так как он образует физиологические расы. В настоящее время в мире известны три расы возбудителя *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. В теплицах России было выявлено две расы, причем доминировала (более 90%) раса 1 [1, 2]. Устойчивость к расе 1 определяется доминантным геном I_1 , обнаруженным у линии 160 *Lycopersicon pimpinellifolium*. Межвидовой гибридизацией он передан многим культурным сортам [7, 9, 10, 12]. Известно, что при выращивании устойчивых сор-

тов в природных популяциях возбудителей непрерывно возникают новые расы, способные преодолевать достигнутый селекционерами уровень устойчивости. В начале 60-х годов в США и в Средиземноморье была выявлена раса 2, преодолевающая устойчивость, контролируемую геном I_1 . Доминантный ген I_2 , обеспечивающий устойчивость к расе 2 был обнаружен в *L. peruvianum* и передан межвидовой гибридизацией в культурные сорта [6]. Оба гена — I_1 и I_2 локализованы в 11-й хромосоме.

Выращивание устойчивых сортов и гибридов позволяет резко сократить затраты на пропаривание грунта и дорогостоящие химические средства защиты, кроме того это важнейший фактор производства и поставки потребителю экологически безопасной продукции из защищенного грунта.

Практическая селекционная работа по созданию F₁ гибридов тепличного томата, устойчивого к фу-

* Университет Курдистана, Санандаж, Иран.

зариозному увяданию, предусматривает идентификацию генов устойчивости в коллекционном материале, для чего необходимо знание расового состава используемых изолятов возбудителя.

В задачу нашей работы входила оценка устойчивости к фузариозному увяданию коллекции сортов, гибридов и инбредных линий томата. Также провели оценку коллекции 17 образцов томата методом молекулярного маркирования (SCAR-маркер) и сравнили результаты с оценкой, проводимой при искусственном заражении.

Материал и методика

Опыты проводили на Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева в 2002-2003 гг. Изоляты (FOL и F37) возбудителя фузариозного увядания *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* выращивали на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в чашках Петри. Для получения суспензии спор делали смыв стерильной дистиллированной водой с 2-недельной культуры гриба и доводили до необходимой концентрации спор, пользуясь камерой Горяева.

Оценку проводили при искусственной инокуляции патогенными изолятами F37 и FOL, относящимися к расе 1. Для этого выращивали семена сортов и гибридов и корневую систему растений в фазе 2~3 настоящих листьев погружали в суспензию спор с концентрацией 10^6 в

1 мл на 30 мин и высаживали в вазоны, которые размещали в зимней остекленной теплице. В теплице поддерживали температуру воздуха: ночью +18...23°C, днем +22...30°C. Раз в неделю проводили подкормку удобрениями «Кемира гидро» и кальциевой селитрой. Через 25 дней после инокуляции проводили учеты. Степень увядания оценивали в баллах

[7], высоту растений измеряли линейкой.

Научные исследования по молекулярному маркированию генов устойчивости томата к патогенам (галловой нематоды, фузариозу, вертициллезу, вирусу табачной мозаики, кладоспориозу и др.) интенсивно ведутся на кафедре биотехнологии МСХА им. К.А. Тимирязева. В работе использовали специфические праймеры и методику, предоставленные Г.И. Карловым (лаборатория регуляторов роста и развития с.-х. растений).

Молекулярный анализ состоял из 3 основных процедур:

1. Выделение ДНК у исследуемых растений;
2. Амплификация участка ДНК-маркера (собственно полимеразная цепная реакция — ПЦР);
3. Расщепление продуктов ПЦР специфическими рестриктазами.

ДНК выделяли из молодых листьев по методу Bernatzky и Tanksley (1986 г.) с некоторыми модификациями. Молодые листья растирали в буфере для экстракции (0,35 М сорбитол, 100 мМ трис-НСl, 5мМ ЭДТА, рН 7) охлажденном до +3...5°C. Центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Добавляли буфер для экстракции, интенсивно встряхивали. Лизировали при 65°C в буфере для лизиса (1 М Трис-НСl рН 7,5; 0,5 ЭДТА, 5 М NaCl, 2% СТАВ) с добавлением 5% саркосила. Производили очистку смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24:1) и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость и осаждали ДНК в равном объеме изопропанола. Центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 10 мин., осадок высушивали и растворяли в бидистиллированной воде. Размер выделенной ДНК и степень загрязненности оценивали

электрофорезом в 1% агарозном геле. Выделенную геномную ДНК использовали для ПЦР.

Для амплификации маркера использовали ПЦР. В 25 мкл смеси для ПЦР содержалось: 0,2 мМ каждого нуклеотида, 1 x буфер для ПЦР, 100 нг ДНК-матрицы, 20 нг каждого праймера (Fus1 и Fus2), 2,5 U ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили в амплификаторе «Герцик» («ДНК-технология», Москва) при следующих параметрах: 94°C — 2 мин; 30 циклов — 94°C — 30 с, 65°C — 30 с, 72°C — 30 с; 72°C — 7 мин. Рестрикцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 4 мкг ПЦР-продукта, 20 единиц рестриктазы и 1 мкл соответствующего буфера. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл ЭДТА. Образцы смешивали с краской для нанесения (0,25% бромфеноловый синий — 50% глицерин). Геномную ДНК разделяли в 1,5% агарозном геле при напряжении 5 В/см в ТВЕ-буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA pH 8).

Результаты

В результате оценки 69 образцов томата установлено, что большинство из них устойчивы к обоим изо-

лятам. Сорт Белый налив 241 и линии До3ст1, До3ст (14), До3стЮ, До3ст (21), До3стО x До3 и Ма1-45 оказались восприимчивыми к обоим изолятам и выбракованы из дальнейшей селекционной работы.

В поколении F₂: Аврора, Маисса, Камерон, Каисса и 01/02-1 наблюдалось расщепление. Растения без симптомов поражения были отобраны и размножены. Следует отметить, что в категорию устойчивых растений попали как доминантные гомозиготы, так и гетерозиготы, так как они не различаются по фенотипическому проявлению устойчивости (табл. 1).

Особое положение занимают родительские линии Сф04 и Ялф (первого российского гибрида для открытого грунта Fj Юниор), которые показали умеренную устойчивость, т.е. были толерантными (см. табл. 1). На наличие генотипов с полигенной горизонтальной устойчивостью к фузариозному увяданию томата указывали также Ванегее и др. [3]. В результате оценки 40 линий, сортов и диких разновидностей в условиях искусственного инфекционного фона в теплицах Индии установлено, что 2 образца были иммунными, 4 высо-

Т а б л и ц а 1

Результаты оценки коллекции образцов томата на устойчивость к фузариозному увяданию на искусственном инфекционном фоне, 2002 г.

Устойчивые	Благовест F ₁ , Алт 1-1, Алт 1-0, Алт 1-2, Алт 1-(12), А1-бст, А1-8ст, Ампаро 3 (F ₂), До3ст2, До3ст6, До3ст7, До3, До3-22, Де-1 (F ₂), Дф 1-2, Дф1-7, DRW1, Ил1ст1-1, Ил1ст1-2, Ил1-1ст1-3, Ил1-1ст1-4, Ил2-11, Ил2-14, Ил1ст1Pal-2)-1 (F ₂), Ма1-47, Ма2-44, Ма1-4, Мв1-56, Кун1-3, Кун3-2, Кун3-3, Ра1-13, Ра1-14, Ра1-21, Ра1-22, Ра1-23, Ра1-81, Ра1-82, Ра1-(15)9, Рин-1, Сан1-7, Сан1-71, Сан1-72, Сан1-76, Сан1-77, Сан1-78, Сан2-77, №1, №2, 3-55ст, 4-24ст1, 4-24ст2, 16-2ст, 10/10
Восприимчивые	Белый налив-241, До3ст1, До3ст (10), До3ст (14), До3ст (21), До3ст0xДо3, Ма1-45
Расщепление	Аврора (F ₂), Маисса-1 (F ₂), Камерон-1 (F ₂), Каисса-1 (F ₂), 01/02-1
Толерантность	Сф04, Ялф

коустойчивыми, 3 устойчивыми, 3 умеренно устойчивыми, 15 восприимчивыми и 13 высоковосприимчивыми.

Необходимо отметить, что нам в этом эксперименте не удалось установить генетическую природу устойчивости изученных генотипов из-за отсутствия изолятов расы 2. Как известно к расе 1, использованной нами, проявляют устойчивость генотипы как с геном I_1 , так и I_2 . По наличию или отсутствию восприимчивых растений в оцениваемых образцах можно судить о состоянии генов устойчивости у родительского растения. Исходя из результатов можно констатировать, что у 54 устойчивых линий ген устойчивости был в гомозиготном состоянии; у 5 потомств, где наблюдалось расщепление, родительские растения являлись гетерозиготами, а отобранные из этих потомств устойчивые растения могут быть доминантными гомозиготами или гетерозиготами. Для идентификации генотипа необходимо потомство каждого отобранного растения вновь инокулировать и оценить, при этом в потомстве гомозиготы расщепления не будет, а в потомстве гетерозиготы будут выщепляться восприимчивые растения (рецессивные гомозиготы) в количестве 25% от инокулированных растений.

Таким образом методы классической селекции — отбора по фенотипу, несмотря на их общепринятость и отработанность, обладают и существенными недостатками. Во-первых, они требуют наличия всех рас патогена, во-вторых, не позволяют в одном поколении разделить доминантные гомозиготы от гетерозигот. Помимо этого при использовании инфекционного фона для успешного развития заболевания требуется соблюдение определенных условий ок-

ружающей среды (в случае фузариозного увядания томата — поддержание температуры на уровне 25-28°C). Этих недостатков позволяет избежать метод молекулярно-генетических маркеров. С его помощью можно определить как наличие гена устойчивости в генотипе каждого растения, так и его состояние, то есть гомо- или гетерозиготность. При этом нет необходимости в оценке на инфекционном фоне.

В другом опыте в результате оценки при искусственной инокуляции 17 образцов томата установлено, что сорт Белый налив-241 был восприимчив, образцы Fj Sultan, F₁ Benito, Fj Благовест, F, EB-1, F₂ Rapsodia-1, F₁ DRW-1, F₂~01/01-1 были устойчивыми, а у F₂ Cameron-1, F₂ 01/02-1, F₂ 01/02-2, F₂ 01/02-3, F₂ Maissa-1, F₂ Caissa-1, Pal-228 наблюдалось расщепление, линии СФ04 и Ялф показали умеренную устойчивость, т.е. были толерантными. Результаты, полученные методом молекулярно-генетических маркеров, показали, что Белый налив-241, Fj Благовест, СФ04 и Ялф были рецессивными гомозиготами, F, Benito, F₂ EB-1, F₂ Rapsodia-1, Б\ DRW-1, F₂ 01/01-1 были доминантными гомозиготами, Fj Sultan был гетерозиготой, а в F₂ Cameron-1, F₂ 01/02-1, F₂ 01/02-2, F₂ 01/02-3, F₂ Maissa-1, F₂ Caissa-1, Pal-228 наблюдалось расщепление по гену I_2 (табл. 2).

Анализ спектров ДНК, амплифицированных специфическими праймерами, позволял легко различить гомозиготы доминантные, гетерозиготы и гомозиготы рецессивные (рис. 1, 2 и 3). Как видно из этих рисунков и электрофореграмм стандартных сортов, различающихся по наличию и состоянию гена устойчивости I_2 , доминантные гомозиготы и гетерозиготы четко отличаются от рецессивных гомозигот наличием бендов

Сравнение результатов оценки устойчивости образцов томата к *F. o. f. sp* *lysoopersici* методом инокуляции и молекулярным маркированием, 2003 г.

Селекционный номер образца	Устойчивость при инокуляции патогеном	Генотип, установленный молекулярным маркированием
Белый налив-241	Восприимчив	i_2i_2
Sultan F_1	Устойчив	I_2i_2
Cameron-1 (F_2)	Расщепление	Расщепление
Benito F_1	Устойчив	I_2I_2
Благовест F_1	Устойчив	i_2i_2
01/02-1 (F_2)	Расщепление	Расщепление
Сф 04	Толерантность	i_2i_2
Ев-1 (F_2)	Устойчив	I_2I_2
01/02-2 (F_2)	Расщепление	Расщепление
Rapsodia -1 (F_2)	Устойчив	I_2I_2
01/02-3 (F_2)	Расщепление	Расщепление
Maissa-1 (F_2)	Расщепление	Расщепление
Caissa-1 (F_2)	Расщепление	Расщепление
Ялф	Толерантность	i_2i_2
DRW-1	Устойчив	I_2I_2
01/01-1 (F_2)	Устойчив	I_2I_2
Pa1-228	Расщепление	Расщепление

399 и 443 н.п. У рецессивных гомозигот эти бенды полностью отсутствуют. Различия между доминантными гомозиготами и гетерозиготами обнаруживаются наиболее четко наличием у гетерозигот бенда 897 н.п.

Результаты анализа электрофореграмм, представленных на рис. 4, показывают, что растения №16-20, 26, 27, 34-38, 44, 46, 47, 62, 68-78 и 80 являются доминантными

гомозиготами по гену I_2 , растения 6-10, 12, 15, 28, 39, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 55, 57-59 и 79 являются гетерозиготами, а растения 1-5, 11, 13, 14, 21-25, 29-33, 41, 42, 49, 51, 53, 54, 56, 60, 61, 63-67 являются рецессивными гомозиготами. Вместе с тем сравнение результатов анализа устойчивости, полученных с помощью молекулярного маркирования с результатами оценки на искусственном инфек-

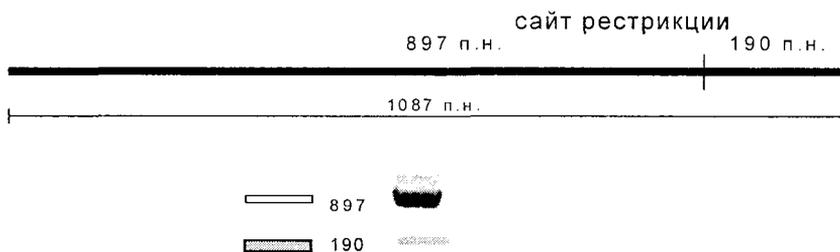


Рис. 1. Сайт рестрикции и результаты электрофореза продуктов ПЦР после рестрикции у рецессивной гомозиготы (восприимчивый генотип)

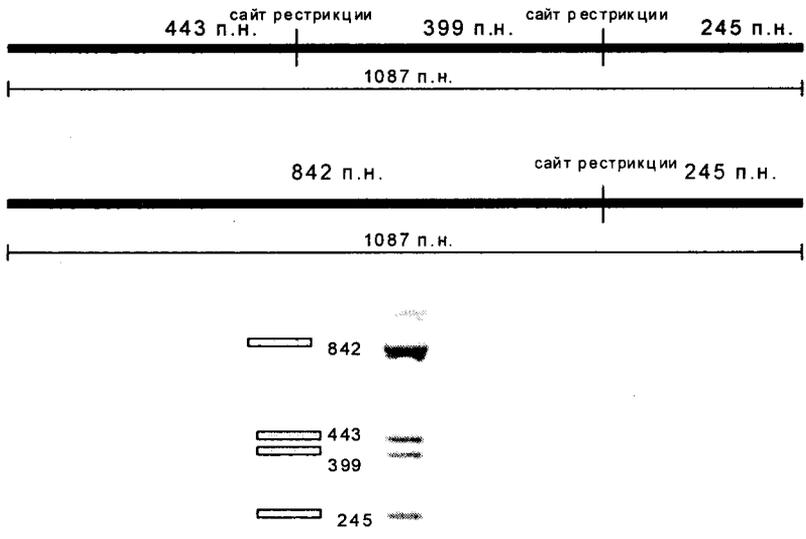


Рис. 2. Сайты рестрикции и результаты электрофореза продуктов ПЦР после рестрикции у доминантной гомозиготы (устойчивый генотип)

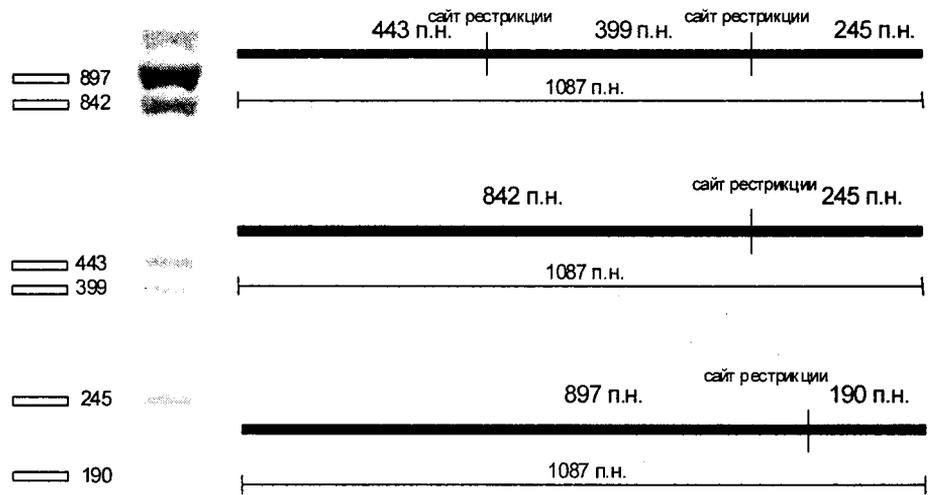


Рис. 3. Сайты рестрикции и результаты электрофореза продуктов ПЦР после рестрикции у гетерозиготы (устойчивый генотип)

ционным фоне (см. табл. 2) показывает, что растения гибрида F₂ Благовест (растения № 21-25) обладают устойчивостью, хотя являются

рецессивными гомозиготами. Это объясняется тем, что устойчивость этого гибрида обусловлена наличием гена I, обеспечивающим устой-

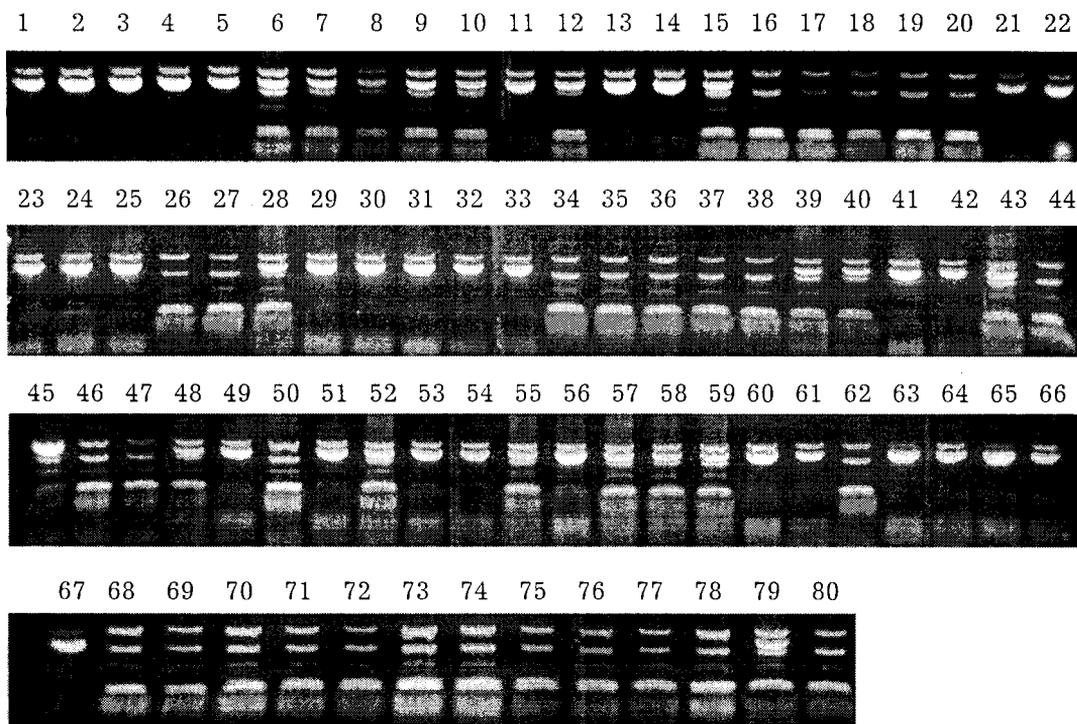


Рис. 4. Электрофореграмма растений изученных образцов томата

чивость лишь к 1-й расе патогена, изоляты которой мы использовали в эксперименте. Результаты по оценке других сортообразцов совпадали. В линиях, где наблюдалось расщепление, метод молекулярного маркирования позволил разделить устойчивые генотипы на гомозиготы и гетерозиготы и тем самым сократить селекционную работу на один цикл отбора. Для дальнейшей селекционной работы в расщепляющихся потомствах нами отобраны только доминантные гомозиготы, с которых получены семена.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что использование метода молекулярного маркирования позволяет сократить селекционный процесс за счет отбора по

генотипу устойчивых к фузариозному увяданию растений. При создании F₂ гибридов тепличного томата, устойчивого к фузариозному увяданию, рекомендуем использовать выделенные нами линии с геном I₂ в гомозиготном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Игнатова С.И. Задачи и методы селекции томата для защищенного грунта. — Сб. селекция овощных культур. М., 1985, с. 65-71. — 2. Игнатова С.И. Роль наследственного потенциала по устойчивости у томата в системе комплексной защиты в закрытом грунте. — Гавриш, 2001, № 6, с. 18—20. — 3. Banerjee M. K. — Vegetable Science, 1990, vol. 17, № 2, p. 167-174. — 4. Benhamou N., Klopper J.W., Tuoun S. — Planta, 1998, vol. 204, № 2, p. 153-168. — 5. Booth C. The Genus Fusarium. — Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England, printed in Great Britain by the Eastern press

- Limited London and Reading. 1971. — 6. *Cirulli M., Alexander L.J.* — *Phytopathology*, 1966, vol. 56, p. 1301 — 1304. — 7. *Grattidge R., O'Brien R.G.* — *Plant Disease*, 1982, vol. 66, p. 165-166. — 8. *Massee G.* — *Gard. Chron*, 1895, vol. 3, № 17, p. 707-705. — 9. *McGrath D. J., Gillespie D., et al.* — *Australian Journal of Agricultural research*. 1987, vol. 38, p. 729-33. — 10. *Rick C.M., Butler L.* — *Adv. In Gen*, 1956, № 8, p. 267-382. — 11. *Sarfatti M and Abu-Abied M.* — *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, vol. 82, № 1, p. 22-26. — 12. *Scott J.W., Harbaugh B.K.* — *HortScience*, 1995, vol. 30, № 3, p. 643-644. — 13. *Walker J.C.* — *The American psychopathological soc*, 1971, Monograph № 6. 56pp (cited by Jones J. P & Woltz S. S. 1981).

Статья поступила
20 июля 2004 г.

SUMMARY

Fusarium wilt caused by the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is known as one of the most devastating diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In the present study, we analyze tomato lines and hybrids to the *Fusarium* wilt disease resistance by DNA amplification methods based on PCR (polymerase chain reactions) and comparison this result with artificial inoculation of plants with the disease causing agent. Comparison results based on the SCAR-marker and artificial inoculation shown the same results. Also, application of the molecular markers need less time and cheaper in comparison with artificial inoculation. In addition, by using this method is possible to determine genotype of plant (homozygote or heterozygote). Therefore, SCAR-marker technique was used in the identification the gene I_2 conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.