

СОЗДАНИЕ ДНК-МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТА
К ФУЗАРИОЗНОМУ УВЯДАНИЮ

И.А. ФЕСЕНКО, М.Ю. КУКЛЕВ, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии)

С помощью программы GeneDoc на основе известных последовательностей гомологов кластера 12 были определены наиболее полиморфные участки ДНК. Исходя из этой информации были подобраны праймеры для амплификации этих последовательностей. В общей сложности были проанализированы 11 пар праймеров в комбинации с 20 рестриктазами. В одной из комбинаций праймеров и рестриктазы нами были получены результаты, позволяющие различать не только устойчивые и неустойчивые растения, но и выявлять гетерозиготы. На основе этих результатов был создан ДНК-маркер на ген устойчивости томата к фузариозу. Этот маркер может быть использован в селекционной работе для анализа генотипов на устойчивость к фузариозу.

Фузариоз — это заболевание, которому подвержены большинство с.-х. видов растений, наносящее большой экономический ущерб. Устойчивые сорта существуют не для всех культур или устойчивости быстро преодолевается новыми расами патогена.

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici — почвенный гриб, который вызывает у томата болезнь увядания [1]. Гриб инфицирует растения через корни посредством прямого внедрения или через раны. После этого происходит заселение ксилемной ткани растения. Это может вызвать гибель растения уже через неделю после инфекции. На томате к настоящему времени идентифицированы 3 расы гриба и соответствующие им гены устойчивости. Локус 1, который обеспечивает устойчивость к расе 1, локализован на 11-й хромосоме и был перенесен от *Solanum pimpinellifolium* в 1939 г. [2]. Локус 13, перенесенный из хромосомы 7 *L. pinnellii*, придает устойчивость к расам 1, 2, 3 [3]. В селекции гетерозисных гибридов F1 томата наибольшее значение имеет локус 12, который обеспечивает устойчивость к наиболее распространенным 1-й и 2-й расам. Этот локус был пере-

несен от дикого родственника томата *Solanum pimpinellifolium* и картирован на длинном плече в хромосоме 11 [4].

Селекция томата на устойчивость к фузариозу является длительным и трудоемким процессом, так как требует создания искусственных инфекционных фонов. В последнее время в связи с развитием методов молекулярной биологии в селекции с.-х. культур все чаще применяются молекулярные маркеры. Это позволяет значительно сократить затраты труда, ускорить и удешевить селекционный процесс. Селекция, основанная на молекулярных маркерах, получила название MAS-marker assisted selection [5]. Маркер должен быть дешевым и легко применимым, тесно сцепленным с маркируемым признаком и кодоминантным (т.е. способным выявлять скрытые носители рецессивных аллелей). Удовлетворяющими указанным требованиям являются маркеры на основе ПЦР с последующей рестрикцией амплифицированных фрагментов — cleaved amplified polymorphism (CAPS). В этом типе маркеров выявляются различия в нуклеотидных последовательностях, которые затрагивают сайты рестрикции [6].

В конце 90-х гг. были клонированы и охарактеризованы 2 гена *I2C-1* и *I2C-2*, которые относились к кластеру генов *I2*, обеспечивающему устойчивость к фузариозу [2]. Дальнейшие исследования показали, что клонированные гены не обеспечивают полной устойчивости растений томата. Лишь ген *I2C-1* обеспечивал частичную устойчивость. В 1998 г. был клонирован еще 1 ген из этого кластера, обозначенный *I2*, который обеспечивал полную устойчивость растений. Было показано, что продукт гена *I2* был высоко гомологичен клонированным ранее генам. Дальнейшие исследования показали, что локус *I2* состоит из 7 генов-гомологов [7]. Этот локус имеет размер примерно 90 т.п.н. Сложность организации кластера локуса устойчивости *I2*, отсутствие данных о последовательности нуклеотидов всего кластера, наличие большого количества гомологов и отсутствие информации о нуклеотидной последовательности в гомологичных локусах у неустойчивых форм растений сильно затрудняет создание эффективных маркеров гена устойчивости *I2*.

Наши исследования были посвящены разработке эффективных ДНК-маркеров гена устойчивости томата к фузариозу *I2* с целью их дальнейшего использования в селекционном процессе.

Материалы и методы

В работе был использован ряд устойчивых и неустойчивых сортов и гибридов томата. В качестве устойчивых форм использовали — *Amrigo*, *DRW*, *Idico*, *Мегана*, *Durasol*, неустойчивых — *Pitenza*, *Белый налив*, *Bruinsma*, *Г7861*, *Г10610*. Для проверки эффективности созданных маркеров использовали расщепляющиеся популяции* томата по признаку устойчивости к фузариозу, оцениваемые на искусственном инфекционном фоне. Растительный матери-

ал выращивали в пленочной теплице. Семена проращивали в чашках Петри при температуре 24°C.

ДНК выделяли из молодых листьев по методу *Bernatzky* и *Tanksley* с некоторыми модификациями.

Молодые листья растирали в буфере для экстракции (0,35 М сорбитол, 100 мМ трис-НСl, 5мМ ЭДТА, рН 7) на холоде. Центрифугировали 10 мин со скоростью 14000 об/мин. Сливали надосадочную жидкость, 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%-го саркосила. После лизиса 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 одном объеме изопропанола. Центрифугировали со скоростью 14 000 об/мин в течение 10 мин, осадок высушивали и растворяли в MQ-воде. Размер выделенной ДНК и степень загрязненности РНК оценивали методом электрофореза в 1%-м агарозном геле.

В 25 мкл ПЦР смеси содержалось: 70 мМ Трис - НСl, рН 8,6 (25°C), 0,001% Тритон X 100, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ Mg Cl₂, 0,25 мМ каждого dNTP (Силекс М), 0,5 мкМ каждого праймера, 100-150 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы («Силекс М», Москва). В работе использовали следующие подобранные нами праймеры:

LR1: ACT CTA CAA ATC TGG A AT
TTC CTT

LR2: AAA TTC TAG TAG TGG
TGT GA

V127: TGG AAC AAT GTC GGC
ACT TAT CTT

VU127: CAA CCA CAT TTT CCA
ACT TCA CAA

Cl: CCT CCT TTT CTC ACC TCA
CTT CGC

* Предоставлены директором Овощной селекционной станции имени Н.Н.Тимофеева канд. с.-х. наук Г.Ф. Монахосом.

C2: ATT TGT GGC CAG TAT TCC
 CC
 FG1: 5' ATG GAG ATT GGC TTA
 GCA GTT GGT 3'
 LF127: 5' TCG TTG TAA TTT TCA
 TTC C AC ACA 3'
 LF79: 5' CAT TTC TCA ATT CAT
 CCC ACT CGT 3'
 LF78: 5' TCA TTC CAC ACG TCA
 TCA AGG ACA 3'
 F7: 5' CAG TTG TGA AGT TGG
 AAA ATG TGG 3'
 FU7: 5' CAA TTT CAA TTT TGG
 GCA ACG AGA 3'
 L79: 5' ATT TAG GCA ACC AAT
 TCT TTC TCG 3'
 LU79: 5' TGG GCG TAG CTC ATC
 A AG TAT GTA 3'
 M78: 5' TCT TGT TGT CCT TGA
 TGA CGT GTG 3'
 MU78: 5' CTA TTG AAT AGG ACA
 TGT GCC GAC 3'
 U127 5' GTT GAG GAC ATT GCT
 TCC GAT ACG
 UN127 5' AAC AAC TGG ACA ATC
 ACT AAC TTC
 U78 5' ACT CGA TAA AGT ATT
 GGT TAC CCG
 UN78 5' TCA GCT ACA AGT CAA
 ATT GAA GGC
 UP78 5' TGT ATT GAT TAT ATG
 GTA GGC CCC

Рестриксию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 4 мкг ПЦР-продукта, 20 ед. рестриктазы и 1 мкл соответствующего буфера. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл ЭДТА. Образцы смешивали с краской для нанесения (0,25% бромфеноловой синий — 50% глицерин). Геномную ДНК разделяли в 1,5%-м агарозном геле при напряжении 5 В/см в ТВЕ-буфере (45 мМ трис-борат, 4 мМ EDTA pH 8).

Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программное обеспечение — GeneDoc, Clone, Oligo 3.1.

Результаты и их обсуждение

Доминантный ген *12* у томата обеспечивает устойчивость против 1-й и 2-й рас патогена. Этот локус локали-

зован на длинном плече 11-й хромосомы и состоит, по меньшей мере, из 7 генов-гомологов, которые относятся к NBS-LRR классу генов устойчивости [7] (рис.1). Задача по поиску ДНК-маркера, сцепленного с геном, обеспечивающим устойчивость к фузариозу, осложнялась отсутствием данных о последовательности нуклеотидов всего кластера генов устойчивости *12*. Это приводило к сложностям в подборе соответствующих праймеров для анализа только определенных генов кластера и к возможной амплификации не только генов, обеспечивающих устойчивость, но и их гомологов. Затруднение вызывало и отсутствие данных о нуклеотидной последовательности, а также участка ДНК, соответствующего кластеру генов *12* у неустойчивых генотипов. Это, в свою очередь, затрудняло подбор рестрицирующих нуклеаз, которые при анализе обнаруживали бы полиморфизм.

С помощью программы GeneDoc на основе известных последовательностей гомологов кластера *12* были определены наиболее полиморфные участки ДНК. На основе этой информации были подобраны праймеры для амплификации этих последовательностей ДНК (рис 2). В общей сложности проанализированы более 10 пар праймеров в комбинации с 20 рестриктазами. В ре-

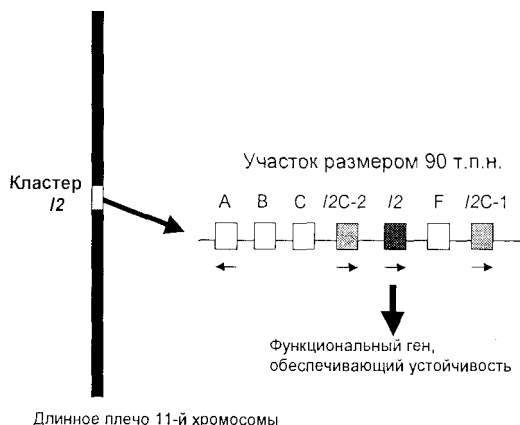


Рис. 1. Кластер генов устойчивости *12*

зультате нашей работы были подобраны праймеры, которые позволяли проанализировать всю последовательность клонированных генов.

Пара праймеров U78-UP78 амплифицирует один из гомологов гена *I2* — J2C-1, обнаруженный у устойчивых генотипов и обеспечивающий частичную устойчивость к фузариозу.

Было проверено 10 рестриктаз, по трем из них (Яеc III, Hind III, Таq I) обнаружен полиморфизм (рис. 3, 4, 5).

Несмотря на то, что наблюдался четкий полиморфизм между устойчивыми и неустойчивыми генотипами, создать ко-доминантный маркер, позволяющий различать гомо- и гетерозиготы с этой парой праймеров не удалось.

Пара праймеров U78-UN78 амплифицирует один из гомологов гена *I2* — J2C-1, обнаруженный у устойчивых генотипов и обеспечивающий частичную устойчивость к фузариозу. Амплифицируемый фрагмент был прове-

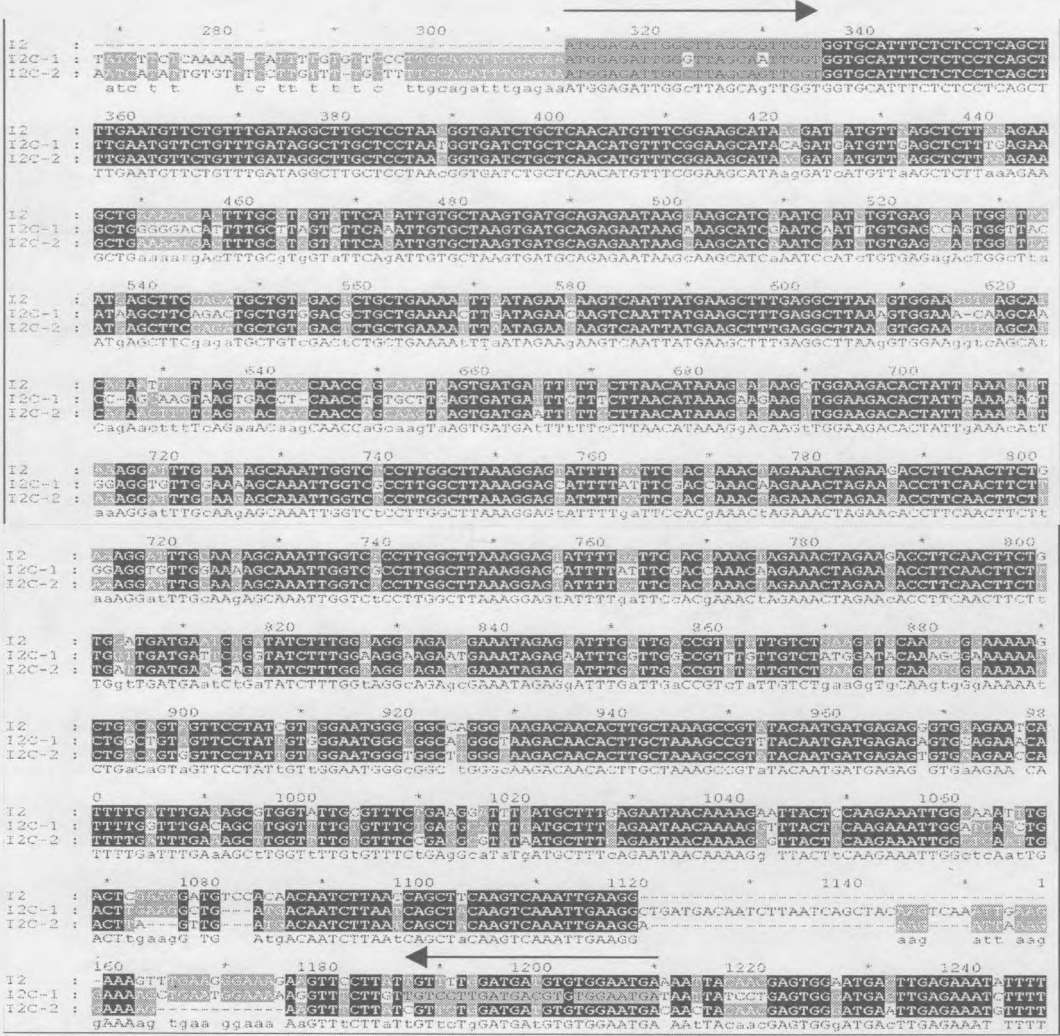


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента амплифицируемого праймерами FG1-LF78. Стрелкой обозначены праймеры

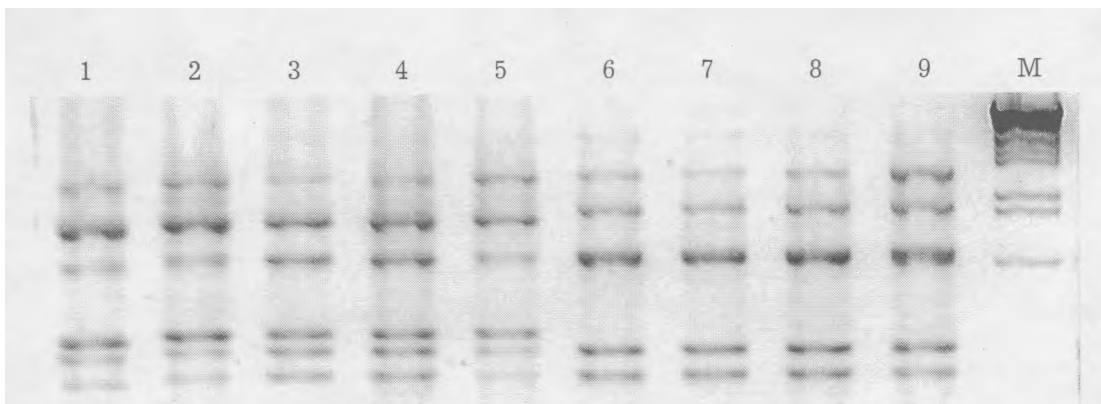


Рис. 3. Рестрикция *Hae III*. 1-5 — устойчивые растения, 6-9 — неустойчивые генотипы

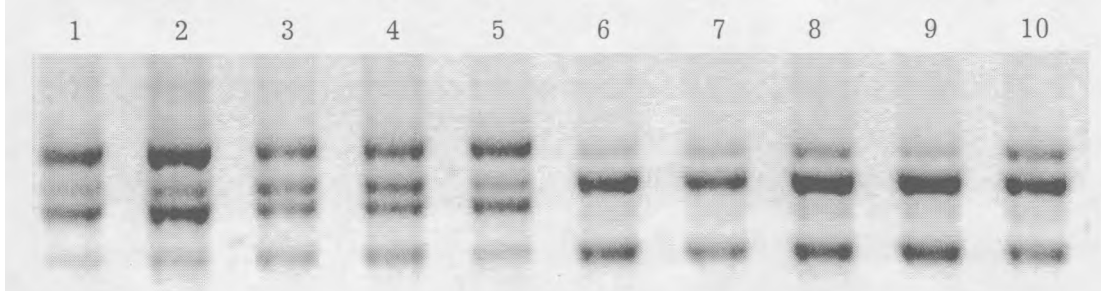


Рис. 4. Рестрикция *Hind III*. 1-5 — устойчивые растения, 6-10 — неустойчивые генотипы

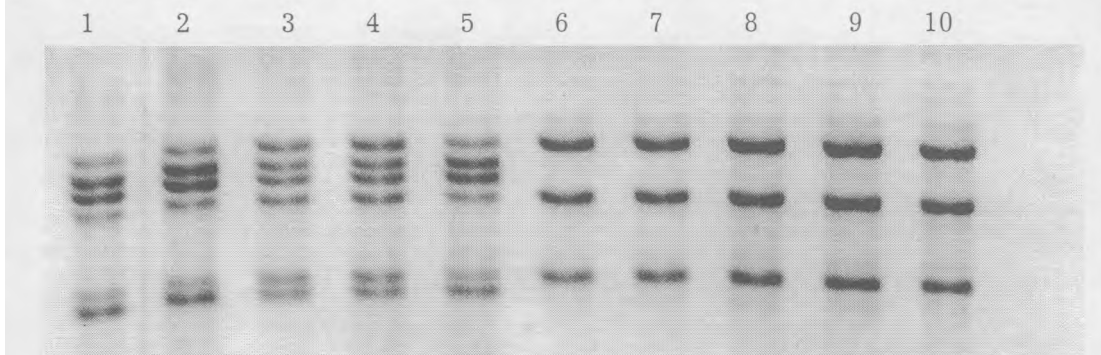


Рис. 5. Рестрикция *Taq I*. 1-5 — устойчивые растения, 6-10 — неустойчивые генотипы

рен 10 рестриктазами, по двум из которых обнаружен полиморфизм (рис. 6, 7).

Несмотря на то, что, как и в предыдущем случае, наблюдался четкий полиморфизм между устойчивыми и неустойчивыми генотипами, создать ко-доминантный маркер, позволяющий

различать гомо- и гетерозиготы с этими праймерами, также не удалось.

Пара праймеров U127-UN127 позволяет специфично амплифицировать последовательность гена *I2*, обеспечивающего устойчивость к фузариозу. Эта последовательность была проанализирована 10 различными рестрикта-

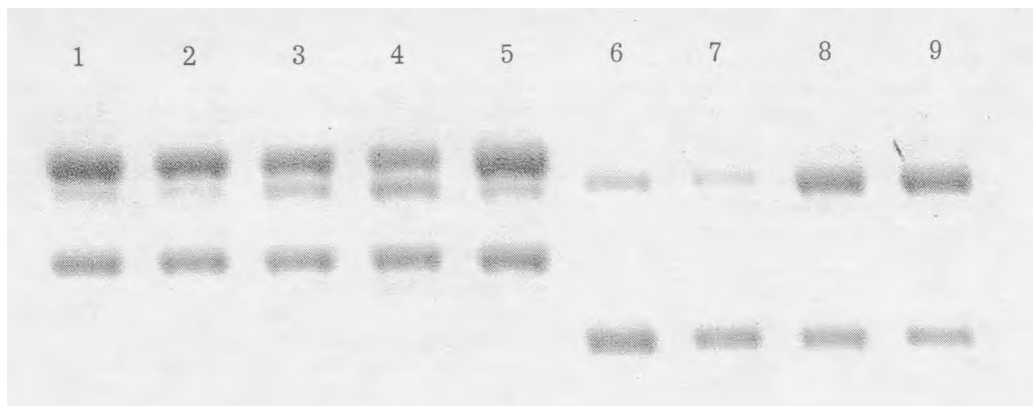


Рис. 6. Рестрикция Dra I. 1-5 — устойчивые растения, 6-9 — неустойчивые генотипы

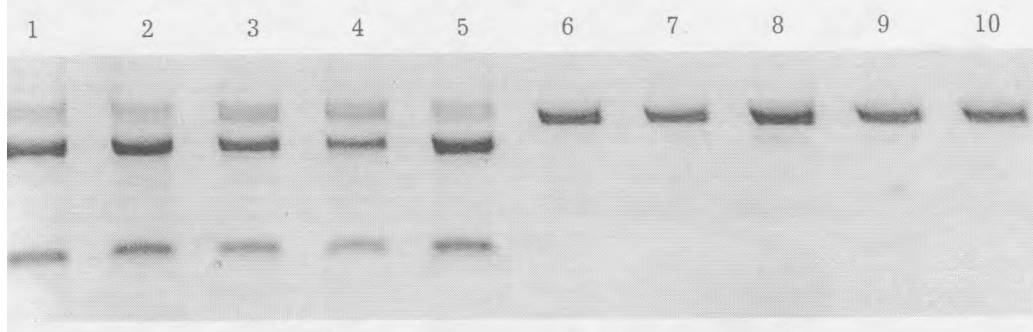


Рис. 7. Рестрикция Nha I. 1-5 — устойчивые растения, 6-10 — неустойчивые генотипы

зами, часть из них показала полиморфизм и одна из комбинаций «праймер-рестриктаза» позволила выявить гетерозиготы (рис. 8).

В комбинации праймера U127-UN127 и рестриктазы Vha 4641 нами были

получены результаты, которые позволили идентифицировать этот маркер как кодоминантный.

Результаты оценки генотипов томата, полученные на искусственном инфекционном фоне (Овощная селек-

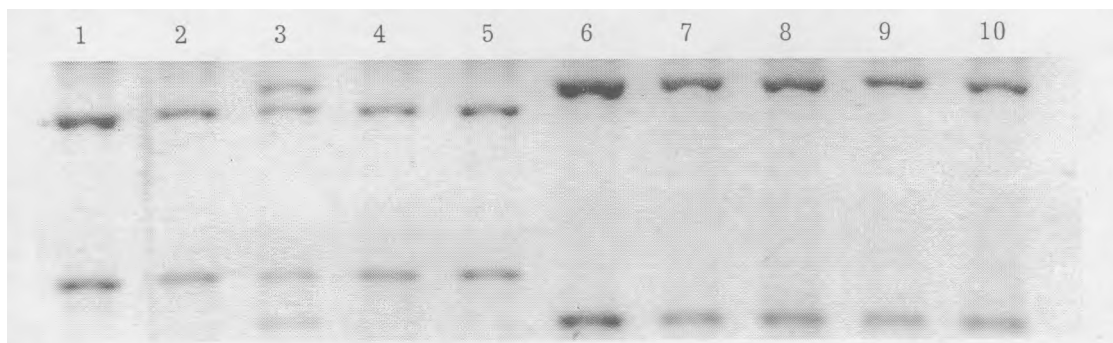


Рис. 8. Рестрикция Vha 4641. 1-5 — устойчивые растения, 6-10 — неустойчивые генотипы. Образец 3 — гетерозиготный генотип.

ционная станция им. Н.Н.Тимофеева РГАУ - МСХА имени К.А.Тимирязева) и с помощью созданного нами ДНК-маркера, совпадали, хотя в линиях, где наблюдалось расщепление, метод молекулярного маркирования позволил разделить устойчивые генотипы на гомозиготы и гетерозиготы и этим самым сократить селекционную работу на один цикл отбора. Таким образом, этот маркер может быть использован в селекционной работе для анализа генотипов на устойчивость к фузариозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson P. E. Edited by Marshall E. Mace, Alois A. Sell & Carl, and H. Beckman Academic press Inc., 1981. 113. —
2. Ori N., Eshed Y., Pciran I. et al. // Plant Cell 9, 1997. 521-532. —
3. Bournival B.L., Vallejos C.E., Scott J.W. // Theoretical-and-Applied-Genetics. 1990. 79(5), 641-645. —
4. Segal G., Sarfatti M., Schaffer M.A. et al. // MOI. Gen. Genet, 1992. 231, 179-185. —
5. Madan Mohan, Suresh Nair A., Bhagwat T.G. et al. // Molecular Breeding, 1997. 3, 87-103. —
6. Lalitha Sunil Kumar // Biotechnology Advances, 1999. 17, 143-182. —
7. Simons, G. et al. // Plant Cell. 1998. 10, 1055-1068.

SUMMARY

With the help of the programme GeneDoc on the basis of known sequences of homologs cluster 12, most polymorphous loci (parts) of DNA were specified. Due to this primers to amplify those sequences have been sorted out. Eleven primers' pairs in combination with twenty restriction enzymes have been analysed all in all. The results produced in one combination allow to differentiate both stable and unstable plants, they can also reveal heterozygotes. The DNA-marker has been created revealing resistance tomato gene to vascular wilt (Fusarium). This very marker can be used in selection work to analyse geno-types to vascular wilt (fusarium) resistance.