

РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К ВЕРТИЦИЛЛЕЗУ ФОРМ ТОМАТА

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

(Российский государственный аграрный университет —
МСХА имени К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии)

На основании различий в нуклеотидных последовательностях ДНК-регионов, тесно сцепленных с геном устойчивости томата к вертициллезу у устойчивых и неустойчивых форм растений томата, был создан кодоминантный ДНК-маркер. С помощью метода флуоресцентного маркирования, основанного на применении молекулярных беконов, был создан зонд, позволяющий детектировать присутствие доминантного аллеля гена устойчивости томата к вертициллезу. Метод флуоресцентного маркирования позволяет избежать контаминации ПЦР-продуктом, так как отпадает необходимость проведения электрофореза, все операции проводятся в одной пробирке, детекция флуоресценции проводится в автоматическом режиме и занимает несколько секунд. Таким образом, данный метод позволяет сэкономить значительную часть рабочего времени и быстро проводить анализ больших объемов селекционного материала.

Вертициллезное увядание — широко распространенное заболевание, вызывающее серьезные потери урожая и ухудшение качества с.-х. продукции многих культур, включая люцерну, хлопок, тыквенные, мяту, картофель, томат, землянику и подсолнечник [2]. Сосудистое увядание растений вызывают различные виды грибов рода *Verticillium*. Заболевание характеризуется следующими симптомами: увядание, изменение окраски листьев, вызванное поражением проводящей системы растения (ксилема становится красноватой, а затем коричневет), отмирание и опадение листьев. Для борьбы с вертициллезом необходимо применение дорогостоящих фунгицидов, которые могут нанести серьезный ущерб окружающей среде. Однако в некоторых случаях растения проявляют расспецифическую устойчивость к вертициллезному увяданию [5].

Устойчивость растений к вирусам, бактериям и грибам зачастую связана со сложными взаимодействиями между хозяином и патогеном, в этом случае продукт гена устойчивости растений специфически распознает продукт гена авирулентности патогена [4]. Отсутствие такой ответной реакции приводит к поражению растения и распространению инфекции.

У томата устойчивость к вертициллезу обусловлена присутствием одного доминантного гена *Ve*, который был картирован в группе сцепления IX [1]. Ранее была определена нуклеотидная последовательность региона, тесно сцепленного с данным геном устойчивости (расстояние от гена $0,67 \pm 0,49$ сМ [3]).

Целью данной работы явилась разработка флуоресцентной тест-системы для детекции доминантного аллеля гена *Ve*. Данный метод позволяет избежать контаминации

продуктов после проведения ПЦР, исключить стадию электрофореза, упростить хранение данных о результатах тестирования образцов.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли по методу, описанному в [6] из свежих листьев томата.

Аmplификация и детекция результатов. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси. В 25 мкл ПЦР смеси содержалось: 70 мМ Трис-НС1, 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, 120 нг зонда, меченного красителем FAM, и 1 ед. Таq-полимеразы («Силекс М», Москва). Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: прямой VF 5'- AGC TTA TTC TTG ATT CCA CCC A -3', обратный VR 5'- CTG AAT AGC AAG ACA ACG TGG C -3'. Флуоресцентный зонд несет краситель FAM (карбоксифлуоресцеин) и гаситель флуоресценции BHQ-1TM (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA), последовательность зонда — FAM-5'-GAT ATA ATA TCG GAG AAG GTA TAT C-3'-BHQ-1. Прай-

меры и зонд синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва. Условия ПЦР: 94,0° — 2 мин, далее 40 циклов 94,0° — 1 мин, 52,0° — 45 с, 72,0° — 30 с, конечная элонгация 72,0° — 7 мин. ПЦР проводили на амплификаторах «Терцик-МЦ2» (ДНК-Технология», Москва). Детекцию флуоресценции проводили после ПЦР (end-point detection) на приборе «Джин» («ДНК-Технология», Москва).

В качестве тестовых образцов использовали растения томата селекционной линии ИС-3 (растения предоставлены директором Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева Г.Ф. Монахосом), расщепляющейся по признаку устойчивости к вертициллезу.

Результаты и их обсуждение

Анализ нуклеотидных последовательностей регионов, тесно сцепленных с устойчивыми и неустойчивыми аллелями гена устойчивости к вертициллезу, выявил полиморфизм в данных участках генома. В случае неустойчивых генотипов была обнаружена делеция размером 36 п.н. (рис. 1) [3].

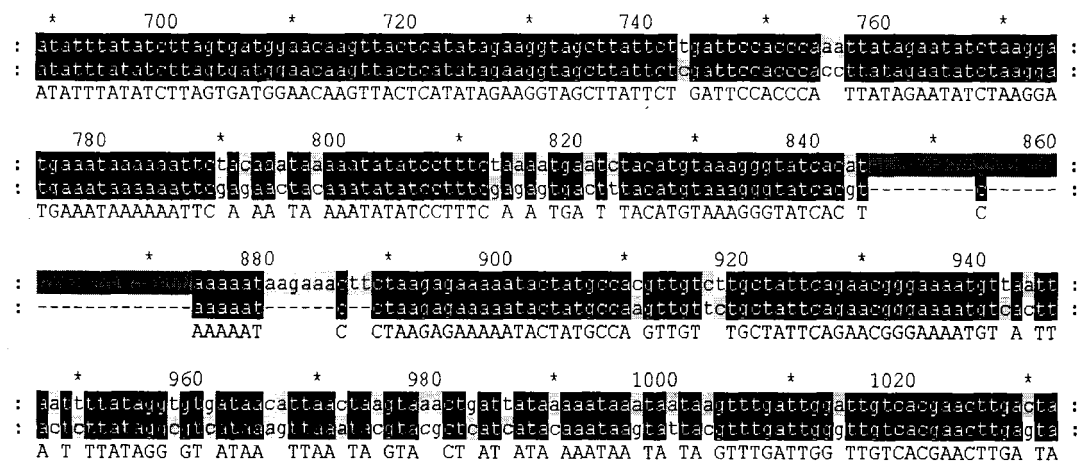


Рис. 1. Структура региона, тесно сцепленного с геном устойчивости томата к вертициллезу

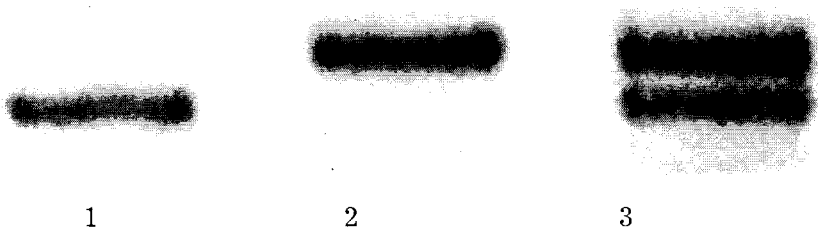


Рис. 2. Результаты ПЦР с праймерами VF и VR. 1 — неустойчивое растение, 2 — устойчивое гомозиготное растение, 3 — устойчивое гетерозиготное растение. Размер продуктов: ~ 190 и 154 п.н.

Основываясь на нуклеотидных последовательностях, мы подобрали праймеры (прямой — VF, обратный — VR), которые позволяют определять устойчивые и неустойчивые гомозиготные, а также гетерозиготные растения томата. Результаты ПЦР с подобранными праймерами представлены на рис. 2.

Таким образом, мы получили кодоминантный молекулярный маркер, тесно сцепленный с геном устойчивости томата к вертициллезу (расстояние от гена $0,67 \pm 0,49$ сМ). Разработанный нами маркер позволяет различать все типы наследования данного признака и значительно ускоряет селекционный процесс, направленный на получение устойчивых к вертициллезу гибридов и сортов томата.

При массовых анализах стадия электрофореза, необходимая для визуализации результатов ПЦР, остается достаточно трудоемкой, занимает до половины времени, необходимого для скрининга популяций, расщепляющихся по признаку устойчивости к вертициллезу. Избежать данную стадию, а также автоматизировать детекцию и хранение результатов и предотвратить контаминацию ПЦР-продуктом позволяет метод флуоресцентного маркирования, основанный на применении молекулярных бекон.

В качестве флуоресцентной пробы применялись так называемые молекулярные «бекон». Молекулярный «бекон» — короткий олигонуклеотид (25-40 п.н.), к одному концу которого «пришит» флуоресцентный краситель, а к другому — гаситель флуоресценции. Центральная часть бекон несет последовательность, комплементарную последовательности-«мишени» в геноме, а последние 4-7 нуклеотидов каждого из концов зонда комплементарны между собой. Таким образом, в свободном состоянии он имеет шпильчатую структуру, и флуоресценция поглощается гасителем. В случае наличия последовательности-мишени зонд становится линейным и мы можем детектировать флуоресценцию [7].

С помощью таких зондов можно детектировать несколько ДНК-мишеней в течение одной полимеразной цепной реакции. Это достигается применением различных флуоресцентных красителей, спектры излучения которых не перекрываются.

Общая структура молекулярного бекон представлена на рис. 3.

Нами был подобран зонд на нуклеотидную последовательность, отсутствующую у неустойчивых форм растений, который используется в комбинации с ранее подо-

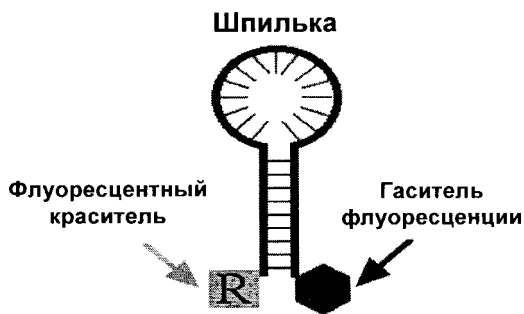


Рис. 3. Структура молекулярного беконна

бренными праймерами. В ходе ПЦР, при наличии устойчивого аллеля, зонд гибридизуется на ДНК-мишени и разрушается Taq-полимеразой, в результате чего флуоресцентная метка освобождается, и мы можем детектировать излучение определенной длины волны.

На рис. 4 представлены результаты детекции флуоресценции на приборе «Джин». Высокий уровень сигнала по каналу FAM («Специфика») указывает на то, что в иссле-

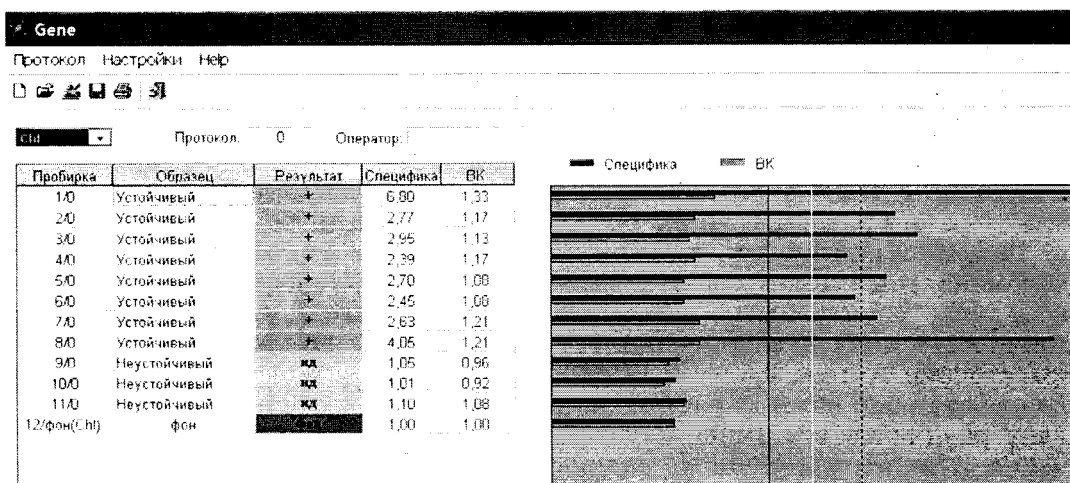


Рис. 4. Результаты скрининга образцов на наличие доминантного аллеля гена устойчивости томата к вертициллезу (Ve)

дуемым образце присутствует доминантный аллель гена устойчивости томата к вертициллезу. Уровни сигнала представлены графически в правой части окна программы. Образцы, несущие признак устойчивости к вертициллезному увяданию, отмечаются знаком «+» в колонке «Результат»; образцы, чувствительные к заболеванию, отмечаются знаком «нд» («нет детекции») в той же колонке. В качестве фоновых по уровню флуоресценции образцов используется та же ре-

акционная смесь, что и для других образцов, но без добавления матричной ДНК. Это позволяет избежать ложных результатов вследствие спонтанного разрушения зонда Taq-полимеразой.

Заключение

С помощью разработанной методики удастся достоверно детектировать наличие доминантного аллеля гена устойчивости томата к вертициллезу в растительном материале. Таким образом, метод позво-

ляет избежать стадию электрофореза, а следовательно, ускорить анализ селекционного материала, облегчить отбор устойчивых к вертициллезу форм томата.

Авторами проводится работа по созданию флуоресцентного зонда на последовательность, тесно сцепленную с рецессивным аллелем гена устойчивости томата к вертициллезу, что позволит получить кодоминантный флуоресцентный маркер.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Diwan N., Fluhr R., Eshed Y. et al.* // *Verticillium dahliae* race 1, 1999. Theor. Appl. Genet. 98, 315-319. — 2. *Domsch K.H., Gams, W., Traute-Heidi A.* Compendium of Soil Fungi. Academic, New York. Vol. 1. PP. 829-845. — 3. *Kawchuk L.M., Hachey J., Lynch, D.R.* // *Genome* 41, 1998. 91—95. — 4. *Leister D., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C.* // *Nat. Genet.* 14, 1996. 421-429. — 5. *Lynch D.R., Kawchuk L.M., Hachey, J. et al.* // *Plant Dis.* 81, 1997. 1011-1014. — 6. *Van der Beek J.G., Verkerk K., Zabel P., Lindhout P.* // *Theor Appl Genet* 84: 106-112. — 7. Материалы сайта www.molecular-beacons.com

SUMMARY

On the basis of DNA-regions distinctions of nucleotated sequence, closely linked to a gene of stability of a tomato to verticilliosis in both stable and unstable tomato forms, codominant DNA-marker has been created. By means of fluorescent marking method, based on application of molecular bacons, a probe has been created that allows to detect presence of dominant gene allele resistance of a tomato plant to verticilliosis. The method of fluorescent marking allows to avoid contamination with PCR product as there is no need of electroporesis, all operations are done in one test tube. Fluorescence detection is done automatically and takes several seconds. Thus this method allows to economize a significant part of working time and quickly analyze a great volume of selection material.