

Молекулярно-генетический скрининг маркеров генов устойчивости в генетической коллекции томатов

В. Н. ХУНИВНУ, С. Г. МОНАХОС

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127434, Российская Федерация

Резюме. Исследования проводили с целью выявления наличия маркеров генов устойчивости томатов к основным заболеваниям и оценки пригодности доступных молекулярных маркеров для реализации маркер-опосредованного отбора. Выполняли молекулярно-генетический скрининг 19 линий из генетической коллекции томатов ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева» с использованием 13 молекулярных ДНК-маркеров локусов устойчивости к 8 заболеваниям томатов. В 12 линиях растения несли по 6 маркеров генов устойчивости к таким распространённым заболеваниям томата, как фузариоз (возбудитель *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen), бронзовость томатов (возбудитель тосповирус бронзовости томата, TSWV), желтая курчавость листьев томатов (возбудитель бегомовирус желтой курчавости листьев томата, TYLCV), галловая нематода (возбудитель *Meloidogyne incognita* Kofoid & White) и мучнистая роса (возбудитель *Oidium neolyopersici* L. Kiss). Маркеры генов устойчивости к фитофторозу (возбудитель *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) и кладоспориозу (возбудитель *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous) отсутствуют. Использование 12 генетических маркеров возможно для маркер-опосредованной селекции томатов на устойчивость. Маркер 2-5Cf (аллель устойчивости к кладоспориозу) и CAPS-маркер для выявления присутствия гена *I2C-1* (ген частичной устойчивости к фузариозу) признаны неспецифичными. В результате проверки растений на наличие в геноме гена устойчивости к вертициллезу (возбудитель *Verticillium dahliae* Kleb.) получены ампликоны больше ожидаемой длины, что ставит под вопрос возможность использования SCAR маркера на основе пары праймеров VF и VR в маркер-опосредованной селекции томатов.

Ключевые слова: томат, ген устойчивости, молекулярный маркер, стерильные линии, фертильные линии.

Сведения об авторах: В. Н. Хунивну, аспирант; С. Г. Монахос, доктор сельскохозяйственных наук, зав. кафедрой (e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru).

Для цитирования: Хунивну В. Н., Монахос С. Г. Молекулярно-генетический скрининг маркеров генов устойчивости в генетической коллекции томатов // Достижения науки и техники АПК. 2024. Т. 38. № 12. С. 4–10. doi: 10.53859/02352451_2024_38_12_4

Molecular genetic screening of resistance gene markers in a tomato genetic collection

V. N. Khunivnu, S. G. Monakhos

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, ul. Timiryazevskaya, 49, Moskva, 127550, Russian Federation

Abstract. The studies were conducted to identify markers of tomato resistance genes to major diseases and to assess the suitability of available molecular markers for marker-assisted selection. Molecular genetic screening of 19 lines from the genetic collection of tomatoes of the N.N. Timofeev Breeding Station LLC was performed using 13 molecular DNA markers of resistance loci to 8 tomato diseases. In 12 lines, the plants carried 6 markers of genes encoding resistance to such common tomato diseases as fusarium wilt (pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen), tomato spotted wilt (pathogen tomato leaf spot tospovirus, TSWV), tomato yellow leaf curl (pathogen tomato yellow leaf curl begomovirus, TYLCV), root-knot nematode (pathogen *Meloidogyne incognita* Kofoid & White), and powdery mildew (pathogen *Oidium neolyopersici* L. Kiss). Markers of genes encoding resistance to late blight (pathogen *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) and cladosporiosis (pathogen *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous) were absent. The use of 12 genetic markers is possible for marker-assisted breeding of tomatoes for resistance. The 2-5Cf marker (allele of resistance to cladosporiosis) and the CAPS marker for detecting the presence of the *I2C-1* gene (gene of partial resistance to fusarium) are recognised as non-specific. As a result of testing plants for the presence of the gene of resistance to verticillium wilt (pathogen *Verticillium dahliae* Kleb.) in the genome, amplicons longer than expected were obtained, which calls into question the possibility of using the SCAR marker based on the pair of primers VF and VR in marker-assisted breeding of tomatoes.

Keywords: tomato; resistance gene; molecular marker; sterile lines; fertile lines.

Author Details: V. N. Khunivnu, post graduate student; S. G. Monakhos, D. Sc. (Agr.), head of department (e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru).

For citation: Khunivnu VN, Monakhos SG. [Molecular genetic screening of resistance gene markers in a tomato genetic collection]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2024;38(12):4–10. Russian. doi: 10.53859/02352451_2024_38_12_4

Поражение растений томата (*Solanum lycopersicum* L.) бактериальными, грибковыми, вирусными инфекциями и нематодами приводит к существенным потерям урожая, снижая продуктивность растений на 10...100 % [1]. В общей сложности томаты могут поражать более 200 видов патогенов – бактерий, грибов и вирусов [2]. Сегодня подверженность томатов большому количеству заболеваний представляет собой один из важнейших факторов, сдерживающих рост производства его плодов в мире и препятствующих эффективному и устойчивому возделыванию этой культуры. Несмотря на расширение представлений о механизмах поражения растений патогенами, методах защиты растений и современные агротехнические приёмы выращивания растений, направленные на их за-

щиту, ежегодные потери урожая томатов остаются существенными [3].

Современные экологические подходы в сельском хозяйстве подразумевают не просто достижение максимальной продуктивности растений, но и увеличение урожайности, качества продукции, усиление экологической безопасности и повышения эффективности хозяйств благодаря реализации стратегий, учитывающих возможности устойчивости растений к патогенам, механизмов избегания, элиминации патогенов и использования средств защиты [3]. Несмотря на большое разнообразие путей профилактики заболеваний томатов в разных регионах, например, осуществления прививок [4], краеугольным камнем в обеспечении защиты томатов от патогенов во многом остаётся создание устойчивых к широко-

му спектру вредителей сортов и гибридов. Тем не менее, для многих возбудителей заболеваний известно сравнительно небольшое количество генов устойчивости [5], а их распространённость может требовать привнесения важных генов устойчивости от других известных сортов, в том числе иностранной селекции [6].

Большинство патогенов способны со временем преодолевать существующие механизмы устойчивости растений, что вынуждает учёных постоянно проводить исследования новых потенциальных генов устойчивости и запускать селекционные программы, направленные на создание новых сортов, устойчивых к новым разновидностям патогенов [7]. При этом механизмы, обеспечивающие преодоление устойчивости, остаются сравнительно слабо изучены, хотя в последнее время технологии секвенирования позволили пролить свет на этот процесс у ряда патогенов [8].

Методы ускоренной селекции, такие как маркер-опосредованная селекция, позволяют значительно ускорить процесс селекции растений, в том числе и на устойчивость к основным патогенам. Для важ-

нейших заболеваний томата, таких как фузариоз (возбудитель почвенный гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) [9], вертициллез (возбудитель *Verticillium dahliae*) [10], фитофтороз (возбудитель оомицет *Phytophthora infestans*) [11], бронзовость томатов (возбудитель тосповирус бронзовости томата, TSWV) [12], кладоспориоз (возбудитель высококонтагиозный, факультативный сапротроф *Passalora fulva*) [13], желтая курчавость томатов (возбудитель бегомовирус желтой курчавости листьев томата, TYLCV) [14], галловая нематода (возбудитель *Meloidogyne incognita*) [15] и мучнистая роса (возбудитель *Oidium neolycopersici*) [16], известны ключевые гены устойчивости и разработаны генетические маркеры, позволяющие вести эффективный отбор растений в ходе селекционной работы на устойчивость.

Цель исследования – молекулярно-генетический скрининг коллекции томатов на наличие маркеров, ассоциированных с генами устойчивости к основным заболеваниям этой культуры, для отбора растений в селекционные программы по созданию устойчивых сортов, и проверка пригодности используемых

Таблица 1. Список использованных в работе генетических маркеров, их соответствие локусам устойчивости, заболеваниям

Заболевание / возбудитель	Локус устойчивости	Название праймера (прямой/обратный)	Последовательность праймеров (прямой/обратный)	Тип маркера	Ожидаемые размеры ампликонов (п.н.)	Литературный источник
Фузариоз / <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen	I2C-1	U78/UP78	ACTCGATAAAGTATTGGTTACCCG / TGTATTGATTATATGGTAGGCCCC	CAPS	340, 390	[9]
	I2	U127/UN127	GTTGAGGACATTGCTTCCGATACG / AACAACTGGACAATCACTAACTTC	CAPS	900, 100, 200, 800	
Вертициллез / <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	Ve	VF/VR	AGCTTATTCATTCCACCCA / CTGAATAGCAAGACAACGTGGC	SCAR	164, 200	[10]
Фитофтороз / <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary	Ph-3	TG328F/ TG328R	GGTGATCTGCTTATAGACTTGGG / AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC	CAPS	500, 260, 240	[11]
	R1	R1-1400:76-F/ R1-1400:76-R	CACCTCGTGACATATCCTCACTA / CAACCCCTGGCATGCCACG	SCAR	1400	
		R1-1250:76-F/ R1-1250:76-R	CACCTCGTGACATATCCTCACTA / GTAGTACCTATCTTATTTCTGCAAGAAT	SCAR	1250	
	R3a	RT-R3a-F/ RT-R3a-R	ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT / CTTC AAGGTAGTGGGCAGTAGCTT	SCAR	1000	
Бронзовость томатов / тосповирус бронзовости томата (TSWV)	Sw5	Sw5-f2/ Sw5-r2	CGGAACCTGTAACCTTGACTG / GAGCTCTCATCCATTTTCCG	SCAR	541	[12]
		Sw421-1/ Sw421-2	GACTTGTTGCCATAGGTTCC / GCCCACCCCGAAGTTAATCC	SCAR	940	
Кладоспориоз / <i>Passalora fulva</i> (Cooke) U. Braun & Crous	Cf-2 и Cf-5	2-5Cf	GCTATCTTTGGGTATCAAAATCTT / AGATGACATCGACAAAATGTG	специфичная последовательность	1600, 800	[13]
Желтая курчавость листьев томатов / бегомовирус желтой курчавости листьев томата, TYLCV	Ty-3	FLUW-25 F/ FLUW-25 R	CAAGTGTGCATATACTTCATA(T/G)TCACC / CCATATATAACCTCTGTTTCTATTTGAC	SCAR	450, 640	[14]
Галловая нематода / <i>Meloidogyne incognita</i> Kofoid & White)		Mi23F/ Mi23R	TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG / GCATACTATATGGCTTGTTCACCC	SCAR	380, 430	[15]
Мучнистая роса / <i>Oidium neolycopersici</i> L. Kiss	OI-1	SCAE16F/ SCAE16R	TCCGTGCTGAATGAAGATTCAAAC / TCCGTGCTGATAAACTGTTAGAC	SCAR	780	[16]

маркеров для проведения маркер-опосредованного отбора применительно к исследованному генетическому материалу.

Условия, материалы и методы. Семенной материал для проведения исследования предоставлен ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева». Материалом для исследования служили 19 линий индетерминантных томатов: Поз St 0-1, Поз St 1-3, Поз St 2(2), Поз St 3(3), Поз St 4-431, Поз St 5(1), Поз St 6(3), Поз St 7(3), Поз St 9(121), Поз St 12(1), Поз St 13(2), Поз St 15(1), Поз St 16(3), Поз St 20(3), Поз St 22(3), РБК1251, Клубка куба (КК), 518-11338, Поз St 8-64.

Линия Поз St 0-1 выступала в качестве положительного контроля устойчивости к фузариозу (возбудитель *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), вертициллезу (возбудитель *Verticillium dahliae*), фитофторозу (возбудитель *Phytophthora infestans*), бронзовости томатов (возбудитель тосповирус бронзовости томата, TSWV), кладоспориозу (возбудитель *Passalora fulva*); линия Поз St 1-3 – в качестве положительного контроля устойчивости к желтой курчавости томатов (возбудитель бегомовирус желтой курчавости листьев томата, TYLCV), галловой нематоды (возбудитель *Meloidogyne incognita*) и мучнистой росе (возбудитель *Oidium neolycopersici*).

Посев семян, выращивание рассады представленных образцов томата осуществляли в условиях защищенного грунта, рассаду отобранных линий высаживали и выполняли последующий уход в условиях открытого грунта. Для молекулярно-генетического анализа использовали по 3 растения каждой линии на стадии 3...5 настоящих листьев.

Для иллюстративной демонстрации данных молекулярно-генетического анализа использовали смесь ДНК трех растений каждой линии. Это позволило в случае применения кодоминантных маркеров учесть гомогенность исследуемых линий по изучаемым локусам.

С каждого растения отбирали 100...150 мг тканей молодых листьев для выделения ДНК СТАВ-методом (цетилтриметиламмония бромид) согласно стандартному протоколу [17]. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer N50 (Implen, Германия).

Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР в амплификаторе Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 1,2 мкл dNTPs, по 1,0 мкл каждого праймера, 0,25 ед.а. Taq-ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), 1,5 мкл 10×ПЦР-буфер, 2,0 мкл тотальной ДНК (20 нг) и 8,3 мкл H₂O.

Рестрикцию в случае использования CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) маркеров проводили в соответствии с протоколом, приведённым авторами используемого маркера, в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 4 мкг ПЦР-продукта, 20 ед.а. рестриктазы и 1 мкл соответствующего буфера. Остановку реакции рестрикции осуществляли добавлением 2 мкл ЭДТА.

Всего в работе было использовано 13 молекулярных маркеров, ассоциированных с 11 локусами устойчивости к восьми основным заболеваниям культуры томата – фузариоз, вертициллез, фитофтороз, бронзовость томатов, кладоспориоз, желтая курчавость листьев томатов, галловая нематода, мучнистая роса (табл. 1).

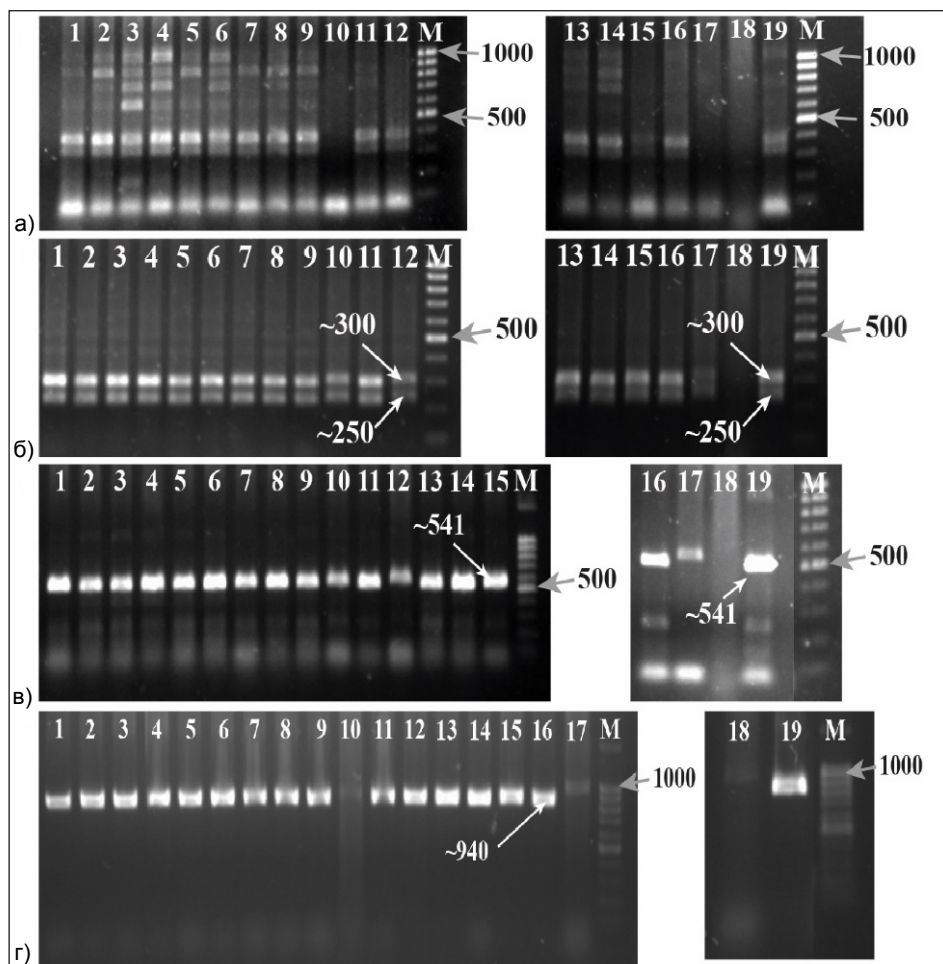


Рис. 1. Результаты молекулярно-генетического скрининга коллекции томатов на наличие генетических маркеров для гена *I2C-1* (а), локуса устойчивости *Ve* (б), гена *Sw5* (в) и маркера *Sw421* (г): 1 – Поз St 0-1, 2 – Поз St 1-3, 3 – Поз St 2(2), 4 – Поз St 3(3), 5 – Поз St 4-431, 6 – Поз St 5(1), 7 – Поз St 6(3), 8 – Поз St 7(3), 9 – Поз St 9(121), 10 – Поз St 12(1), 11 – Поз St 13(2), 12 – Поз St 15(1), 13 – Поз St 16(3), 14 – Поз St 20(3), 15 – Поз St 22(3), 16 – РБК1251, 17 – Клубка куба (КК), 18 – 518-11338, 19 – Поз st 8-64. М – маркер длин фрагментов ДНК (здесь и на рис. 2 белыми стрелками указаны амплифицированные маркеры с ожидаемыми размерами; серой стрелкой указаны «бенды» 500 и 1000 п.н. маркера длин ДНК-фрагментов; каждая линия была представлена тремя растениями, для ПЦР-анализа использовали смесь ДНК трех растений).

Продукты амплификации окрашивали интеркалирующим красителем GelRed и разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле по стандартной методике. В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК маркер Step100 (Биолаб-микс, Россия), содержащий фрагменты ДНК длиной от 100 до 1000 п.н.

Результаты и обсуждение. Для генетической оценки устойчивости исследуемой коллекции растений к фузариозу был использован набор маркеров для выявления гена *I2* и его гомологов, которые обеспечивают частичную или полную устойчивость к заболеванию. Для выявления гена *I2C-1*, обеспечивающего частичную устойчивость к фузариозу, был использован CAPS-маркер на основе пары праймеров U78-UP78 [9]. При анализе фрагментов амплифицированной последовательности после обработки рестриктазой *Acc I* выявляли как два целевых фрагмента с длинами около 340 п.н. и 390 п.н, так и фрагменты с длинами около 190 п.н, 600 п.н., 700 п.н., 850 п.н. и 1000 п.н. (рис. 1а). Целевые продукты были выявлены у всех исследованных растений за исключением растений из трёх линий – Роз St12; «Клибка Куба» и 518-11338. Обнаружение целевых продуктов позволяет предположить наличие аллеля *I2C-1*.

Наличие неизвестных фрагментов разных длин после рестрикционного анализа указывает, вероятно, на низкую специфичность маркера. Лocus устойчивости к фузариозу *I2* содержит порядка 6 гомологичных генов, часть из которых, вероятно, не функциональна [9]. Поскольку гомологи имеют высокую степень гомологичности последовательностей, то, вероятно, в данном случае имеет место амплификация не только целевого гена *I2C-1*, но и его гомологов.

Для проверки присутствия в геномах исследованных растений аллеля гена *I2*, обеспечивающего полную устойчивость к фузариозу, был использован CAPS-маркер на основе пары праймеров U127 и UN127. При анализе результатов после рестрикции

были обнаружены фрагменты длиной около 1000 п.н., что указывает на отсутствие аллеля *I2*, обеспечивающего полную устойчивость к фузариозу во всех исследованных линиях.

Генетическое исследование коллекции растений на наличие делеции 36 п.н. в локусе *Ve*, ассоциированной с устойчивостью томатов к вертициллезу, при помощи SCAR-маркера на основе пары праймеров VF и VR [10], позволила обнаружить у всех исследованных растений два фрагмента, длиной около 250 п.н. и 300 п.н. (рис. 1б, табл. 2).

Хотя наличие двух продуктов ПЦР указывает на то, что все исследованные растения (за исключением линии 518-11338) представляют собой гетерозиготы по этому локусу, однако длины фрагментов оказались больше, чем ожидалось (около 164 п.н. и 200 п.н. соответственно). Полученные результаты не позволяют однозначно сделать вывод о наличии маркеров гена устойчивости к вертициллезу у изученных растений, а возможность использования этого маркера в маркер-опосредованной селекции томатов этой генетической коллекции на устойчивость к вертициллезу требует дополнительной проверки. Использование для амплификации смеси ДНК трех растений в пределах линии позволило подтвердить гомогенность исследуемых линий по изучаемым локусам.

Результаты ПЦР-анализа изученных линий томата присутствия в их геномах маркеров генов устойчивости к фитофторозу показали отсутствие у всех исследованных растений как маркеров устойчивого аллеля гена *Ph-3*, так и соответствующих маркеров *R*-генов. При этом наличие гена *Ph-3* было выявлено во всех линиях, кроме «Клибка куба», 518-11338 и Роз St 8-64, однако он не содержал сайт рестрикции *Acc I*.

Для выявления наличия гена устойчивости к вирусу бронзовости томатов *Sw5* у исследованных растений было использовано два SCAR-маркера: на основе пар праймеров Sw5-f2 и Sw5-r2, Sw421-1 и Sw421-2 [12]. При анализе длин фрагментов,

Таблица 2. Результаты молекулярно-генетического анализа генетической коллекции линий томата с использованием маркеров генов устойчивости *I2C-1*, *Ve*, *Sw5*, *Sw421*, *Cf-2* и *Cf-5*, *Ty-3*, *Mi23*, *OI-1*

Линия	Локус устойчивости к заболеванию (название прямого и обратного праймеров его маркера)							
	<i>I2C-1</i> (U78 и UP78)	<i>Ve</i> (VF и VR)	<i>Sw5</i> (Sw5-f2 и Sw5-r2)	<i>Sw5</i> (Sw421-1 и Sw421-2)	<i>Cf-2</i> и <i>Cf-5</i> (2 и 5Cf)	<i>Ty-3</i> (FLUW-25 F и FLUW-25 R)	<i>Mi23</i> (Mi23F и Mi23R)	<i>OI-1</i> (SCAE16F и SCAE16R)
Роз St 0-1	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 1-3	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 2	+	+	+	+	+	+	+/-	+
Роз St 3	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 4-431	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 5	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 6	+	+	+	+	+	+	-	+
Роз St7	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 9	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 12	-	+	+	-	+	+	+	+
Роз St 13	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 15	+	+	+	+	+	+	н/а	-
Роз St 16	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 20	+	+	+	+	+	+	+	+
Роз St 22	+	+	+	+	+	+	-	+
РБК1251	+	+	+	+	-	+	+	+
Клибка куба	-	+	+	-	-	-	+	-
518-11338	-	-	-	-	-	-	+/-	-
Роз st 8-64	+	+	+	+	-	+	н/а	+

«+» – наличие маркера локуса устойчивости, «-» – отсутствие маркера локуса устойчивости, «+/-» – наличие маркера аллеля устойчивости / аллеля восприимчивости, характерных для гетерозиготного состояния, н/а – нет амплификации.

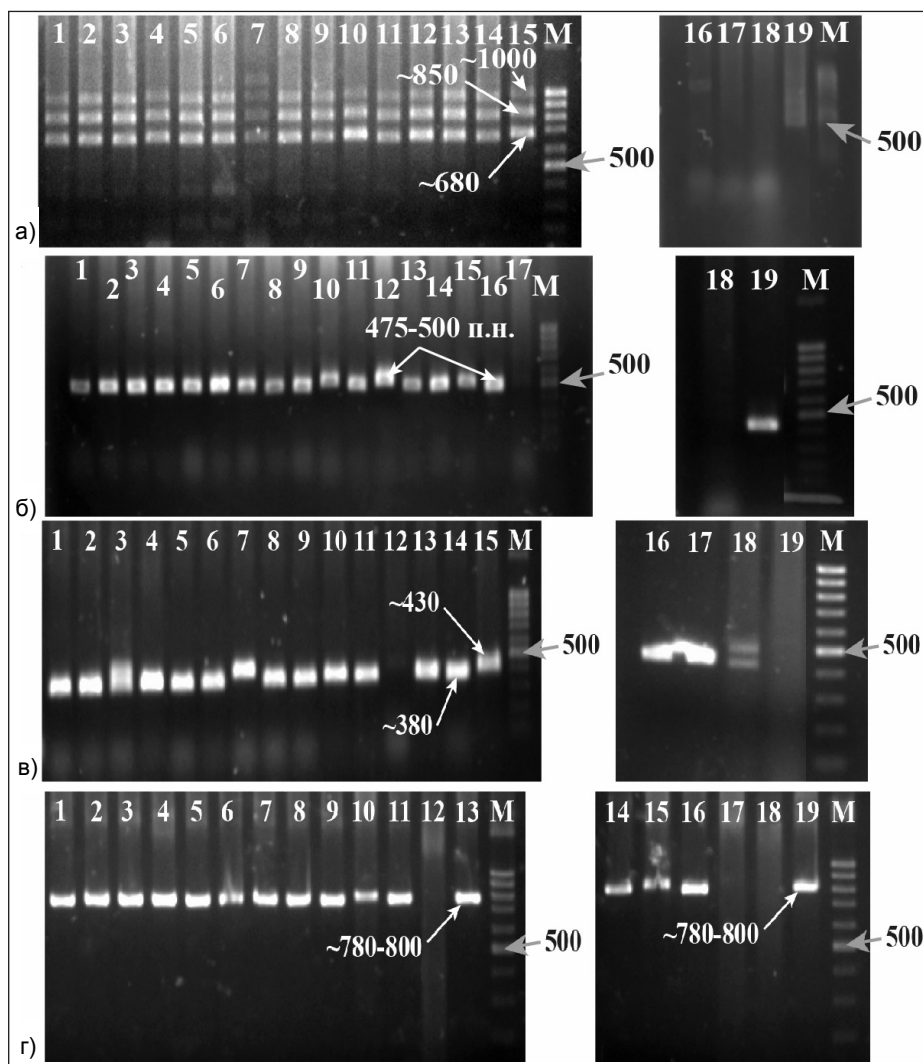


Рис. 2. Результаты молекулярно-генетического скрининга коллекции томатов на наличие генетических маркеров для генов *Cf-2* и *Cf-5* (а), гена *Ty-3* (б), гена *Mi23* (в) и гена *Ol-1* (г): 1 – Поз St 0-1, 2 – Поз St 1-3, 3 – Поз St 2(2), 4 – Поз St 3(3), 5 – Поз St 4-431, 6 – Поз St 5(1), 7 – Поз St 6(3), 8 – Поз St 7(3), 9 – Поз St 9(121), 10 – Поз St 12(1), 11 – Поз St 13(2), 12 – Поз St 15(1), 13 – Поз St 16(3), 14 – Поз St 20(3), 15 – Поз St 22(3), 16 – РБК1251, 17 – Клубка куба (КК), 18 – 518-11338, 19 – Поз st 8-64. М – маркер длин фрагментов ДНК.

образовавшихся в результате ПЦР с парой праймеров Sw5-f2 и Sw5-r2, целевой последовательности длиной 541 п.н. не было обнаружено только у линии 518-11338 (рис. 1в). Наличие ампликона указанной длины подтверждает присутствие в геноме исследованных растений аллеля гена *Sw5b*, который обеспечивает устойчивость к вирусу бронзовости томатов. Маркер на основе праймеров Sw421-1 и Sw421-2 был обнаружен у растений всех линий, за исключением Поз St 12(1), «Клубка куба» и 518-11338 (рис. 1г). В линии «Клубка куба» был обнаружен ампликон большей длины – около 1000 п.н. вместо ожидаемых 940 п.н.

Данные молекулярного генотипирования при использовании маркера на основе пары праймеров Sw5-f2 и Sw5-r2 и маркера на основе пары праймеров Sw421-1 и Sw421-2 сопоставимы. Однако в случае двух линий, Поз St 12(1) и «Клубка куба», требуется дополнительное исследование, так как один маркер показывает наличие аллеля гена *Sw5b*, который придаёт устойчивость растениям, тогда как второй маркер показывает отсутствие такого аллеля.

Для выявления устойчивых к кладоспориозу растений использовали генетический маркер на ос-

новании пары праймеров 2-5Cf. Эта пара праймеров фланкирует области генов, кодирующие LRR (Leucine-Rich Repeat – обогащённые лейцином повторы) в гомологичных генах *Cf-2* и *Cf-5*, отличающихся количеством повторов [13]. Соответственно, этот маркер должен позволять проверить присутствие генов *Cf-2* и *Cf-5* в геноме и одновременно различать их на основании разницы в размерах ампликонов – 1600 п.н. и 800 п.н. соответственно. Результаты ПЦР с парой праймеров 2-5Cf показали, что ампликоны выявили во всех линиях, кроме РБК1251, «Клубка куба», 518-11338 и Поз st 8-64. Однако размеры ампликонов отличались от ожидаемых – у растений во всех линиях, где после ПЦР присутствовал продукт реакции – выявили три фрагмента с длиной около 680 п.н., 850 п.н. и 1000 п.н. (рис. 2а). Основываясь на полученном результате нельзя сделать вывод о присутствии в их геномах генов *Cf-2* и *Cf-5*. Возможно, в этом случае были амплифицированы фрагменты родственных им генов семейства *Hcr* [13].

Для поиска линий, устойчивых к вирусу желтой курчавости листьев томатов, использовался SCAR маркер на основе пары праймеров FLUW-25 F и FLUW-25 R [14], ассоциированный с геном устойчивости *Ty-3*. Были получены фрагменты длиной около 475...500 п.н. (кроме линий «Клубка куба» и 518-11338), что соответствует восприимчивому к заболеванию варианту аллеля [14] (рис. 2б, см. табл. 2).

Линии, устойчивые к галловой нематоды, выявляли путём генетического скрининга на наличие гена *Mi23* при помощи SCAR маркера на основе пары праймеров *Mi23F* и *Mi23R* [15]. Ожидаемая длина ампликонов составляет 380 п.н. у устойчивых гомозигот и 430 п.н. у неустойчивых гомозигот. Среди всех исследованных линий гетерозиготными оказались растения в линиях Поз St 2(2) и 518-11338 (рис. 2в). Линии Поз St 6(3) и Поз St 22(3) – неустойчивые гомозиготы. В линиях Поз St 15(1) и Поз St 8-64 маркер не был обнаружен. Остальные линии – устойчивые гомозиготы.

Молекулярный скрининг исследуемой коллекции томатов на устойчивость к мучнистой росе проводили при помощи SCAR-маркера, тесно ассоциированного с геном устойчивости *Ol-1*, на основе пары

праймеров SCAE16F и SCAE16R [16]. Во всех линиях томатов из исследуемой коллекции, за исключением линий Роз St 15(1), «Клибка куба» и 518-11338, при анализе результатов ПЦР выявлялись ампликоны размером около 780...800 п.н., что свидетельствует о наличии в геномах исследованных растений маркера гена устойчивости *Ol-1* (рис. 2г).

Выводы. Молекулярно-генетический скрининг генетической коллекции томатов ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева» позволил выявить 12 линий, растения которых несут 6 маркеров генов устойчивости к таким распространённым заболеваниям томатов, как вертициллез, вирус бронзовости томатов, вирус желтой курчавости листьев, галловая нематода и мучнистая роса. Среди них не выявлено растений с маркером гена *I2*, обеспечивающего полную устойчивость к фузариозу. Однако во всех этих линиях отмечен маркер гена *I2C-1* и, вероятно, ряд его гомологов, обеспечивающих частичную устойчивость к заболеванию. Полученные результаты дают возможность использовать 12 линий томатов в дальнейшей селекции, однако для увеличения спектра патогенов, к которым будут устойчивы создаваемые генотипы растений, требуется перенос генов устойчивости от других сортов и линий для обеспечения резистентности к таким заболеваниям, как, например, фузариоз и фитофтороз.

Все использованные в исследовании молекулярные ДНК-маркеры, за исключением маркеров на основе трёх пар праймеров U78/UP78, 2-5Cf и VF/VR можно в дальнейшем применять в рамках реализации программ с маркер-опосредованной

селекцией. CAPS-маркер на основе пары праймеров U78/UP78 не обладает достаточной специфичностью, в результате полимеразной цепной реакции амплифицируются сразу несколько ДНК-последовательностей. Возможность использования маркера генов устойчивости к кладоспориозу (*Cf-2* и *Cf-5*) 2-5Cf для маркер-опосредованной селекции томата изученной генетической коллекции также поставлена под вопрос, поскольку в результате амплификации образовывались неспецифичные продукты, что может быть вызвано наличием в геноме генов семейства *Hcr*, родственного *Cf* и имеющих схожий по структуре трансмембранный домен из LRR. В результате ПЦР с парой праймеров VF/VR получены фрагменты большей длины, чем ожидалось. Это ставит под сомнение возможность использования такого маркера для маркер-опосредованной селекции, однако причины увеличения длины ампликонов требуют дополнительного изучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением 075-15-2023-220 на поддержку программы развития университета рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Литература.

1. Singh V. K., Singh A. K., Kumar A. Disease management of tomato through PGPR: Current trends and future perspective // 3 Biotech. 2017. Vol. 7. Article 255. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0896-1> (дата обращения: 08.10.2024). doi: 10.1007/s13205-017-0896-1.
2. Tomato disease resistances in the post-genomics era / Y. Bai, Z. Yan, E. Moriones, et al. // Acta Hort. 2018. Vol. 1207. P. 1–18. URL: https://www.actahort.org/books/1207/1207_1.htm (дата обращения: 29.07.2024). doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1207.1.
3. He D., Zhan J.-S., Xie L.-H. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view // Journal of Integrative Agriculture. 2016. Vol. 15. No. 4. P. 705–715. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61300-4.
4. Keinath A. P., Hajihassani A. Grafting tomato to manage southern blight, prevent yield loss and increase crop value // Plant Disease. 2023. Vol. 107. No. 10. P. 3064–3070. doi: 10.1094/PDIS-10-22-2334-RE.
5. Major soilborne pathogens of field processing tomatoes and management strategies / M. Ma, P. W. J. Taylor, D. Chen, et al. // Microorganisms. 2023. Vol. 11. No. 2. Article 263. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/263> (дата обращения: 29.07.2024). doi: 10.3390/microorganisms11020263.
6. Screening a collection of local and foreign varieties of *Solanum lycopersicum* L. in Kazakhstan for genetic markers of resistance against three tomato viruses / A. Pozharskiy, V. Kostyukova, A. Taskuzhina, et al. // Heliyon. 2022. Vol. 10. No. 8. Article e10095. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022013834?via%3Dihub> (дата обращения: 29.07.2024). doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10095.
7. Late blight in tomato: Insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities / P. Mazumdar, P. Singh, D. Kethiravan, et al. // Planta. 2021. Vol. 253. Article 119. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-021-03636-x> (дата обращения: 29.07.2024). doi: 10.1007/s00425-021-03636-x.
8. Karyotype variation, spontaneous genome rearrangements affecting chemical insensitivity, and expression level polymorphisms in the plant pathogen *Phytophthora infestans* revealed using its first chromosome-scale assembly / M. E. H. Matson, Q. Liang, S. Lonardi, et al. // PLoS Pathog. 2022. Vol. 18. Article e1010869. URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1010869> (дата обращения: 29.07.2024). doi: 10.1371/journal.ppat.1010869.
9. Фесенко И. А., Куклев М. Ю., Карлов Г. И. Создание ДНК-маркера гена устойчивости томата к фузариозному увяданию // Известия ТСХА. 2007. № 1. С. 66–73.
10. Куклев М. Ю., Фесенко И. А., Карлов Г. И. Разработка флуоресцентной тест-системы для выявления устойчивых к вертициллезу форм томата // Известия ТСХА. 2006. № 4. С. 115–120.
11. Хунвану Н. В., Монахос Г. Ф., Монахос С. Г. Фенотипический и молекулярно-генетический скрининг устойчивости образцов томата к фитофторозу // Овощи России. 2024. № 5. С. 12–17. doi: 10.18619/2072-9146-2024-5-12-17.
12. Монахос Г. Ф., Нгуен Т. Л., Нгуен М. Л. Селекция линий томата (*Lycopersicon esculentum*), устойчивых к бронзовости // Овощи России. 2014. № 3. С. 48–53. doi: 10.18619/2072-9146-2014-3-48-53.
13. Mapping of the *Cf-6* tomato leaf mold resistance locus using SSR markers / Z. E. Grushetskaya, V. A. Lemesh, V. D. Poliksenova, et al. // Russ J Genet. 2007. Vol. 43. P. 1266–1270. doi: 10.1134/S1022795407110099.
14. Appraisal for multiple disease resistance in advanced breeding lines of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) / O. Rane, S. K. Jindal, M. S. Dhaliwal, et al. // Genet Resour Crop Evol. 2024. Vol. 71. P. 239–251. doi: 10.1007/s10722-023-01618-4.

15. Identification of resistance in tomato against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and comparison of molecular markers for Mi gene / P. Bhavana, A. K. Singh, R. Kumar, et al. // *Australasian Plant Pathol.* 2019. Vol. 48. P. 93–100. doi: 10.1007/s13313-018-0602-8.
16. Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene Ol-1 on chromosome 6 of tomato / C. Huang, Y. Y. Cui, C. Weng, et al. // *Theor Appl Genet.* 2000. Vol. 101. P. 918–924. doi: 10.1007/s001220051562.
17. Tamari F., Hinkley C. S. Extraction of DNA from plant tissue: Review and protocols // *Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples. Springer Protocols Handbooks.* New York: Humana Press, 2016. P. 245–263. doi: 10.1007/978-1-4939-3185-9_17.

References

1. Singh VK, Singh AK, Kumar A. Disease management of tomato through PGPR: Current trends and future perspective. *3 Biotech [Internet].* 2017 [cited 2024 Oct 8];7: Article 255. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0896-1>. doi: 10.1007/s13205-017-0896-1.
2. Bai Y, Yan Z, Moriones E, et al. Tomato disease resistances in the post-genomics era. *Acta Hort [Internet].* 2018 [cited 2024 Jul 29];1207:1-18. Available from: https://www.actahort.org/books/1207/1207_1.htm. doi: 10.17660/ActaHort.2018.1207.1.
3. He D, Zhan J-S, Xie L-H. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. *Journal of Integrative Agriculture.* 2016;15(4):705-15. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61300-4.
4. Keinath AP, Hajihassani A. Grafting tomato to manage southern blight, prevent yield loss and increase crop value. *Plant Disease.* 2023;107(10):3064-70. doi: 10.1094/PDIS-10-22-2334-RE.
5. Ma M, Taylor PWJ, Chen D, et al. Major soilborne pathogens of field processing tomatoes and management strategies. *Microorganisms [Internet].* 2023 [cited 2024 Jul 29];11(2): Article 263. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/263>. doi: 10.3390/microorganisms11020263.
6. Pozharskiy A, Kostyukova V, Taskuzhina A, et al. Screening a collection of local and foreign varieties of *Solanum lycopersicum* L. in Kazakhstan for genetic markers of resistance against three tomato viruses. *Heliyon [Internet].* 2022 [cited 2024 Jul 29];10(8): Article e10095. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022013834?via%3DiDihub>. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10095.
7. Mazumdar P, Singh P, Kethiravan D, et al. Late blight in tomato: Insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities. *Planta [Internet].* 2021 [cited 2024 Jul 29];253: Article 119. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-021-03636-x>. doi: 10.1007/s00425-021-03636-x.
8. Matson MEH, Liang Q, Lonardi S, et al. Karyotype variation, spontaneous genome rearrangements affecting chemical insensitivity, and expression level polymorphisms in the plant pathogen *Phytophthora infestans* revealed using its first chromosome-scale assembly. *PLoS Pathog [Internet].* 2022 [cited 2024 Jul 29];18: Article e1010869. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1010869>. doi: 10.1371/journal.ppat.1010869.
9. Fesenko IA, Kuklev MYu, Karlov GI. [Development of a DNA marker for the tomato resistance gene to fusarium wilt]. *Izvestiya TSKhA.* 2007;(1):66-73. Russian.
10. Kuklev MYu, Fesenko IA, Karlov GI. [Development of a fluorescent test system for identifying verticillium-resistant tomato forms]. *Izvestiya TSKhA.* 2006;(4):115-20. Russian.
11. Khunvanu NV, Monakhos GF, Monakhos SG. [Phenotypic and molecular genetic screening of tomato samples resistance to late blight]. *Ovoshchi Rossii.* 2024;(5):12-7. Russian. doi: 10.18619/2072-9146-2024-5-12-17.
12. Monakhos GF, Nguen TL, Nguen ML. [Breeding of tomato lines (*Lycopersicon esculentum*) resistant to tomato spotted wilt]. *Ovoshchi Rossii.* 2014;(3):48-53. Russian. doi: 10.18619/2072-9146-2014-3-48-53.
13. Grushetskaya ZE, Lemesh VA, Poliksenova VD, et al. Mapping of the Cf-6 tomato leaf mold resistance locus using SSR markers. *Russ J Genet.* 2007;43:1266-70. doi: 10.1134/S1022795407110099.
14. Rane O, Jindal SK, Dhaliwal MS, et al. Appraisal for multiple disease resistance in advanced breeding lines of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Genet Resour Crop Evol.* 2024;71:239-51. doi: 10.1007/s10722-023-01618-4.
15. Bhavana P, Singh AK, Kumar R, et al. Identification of resistance in tomato against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and comparison of molecular markers for Mi gene. *Australasian Plant Pathol.* 2019;48:93-100. doi: 10.1007/s13313-018-0602-8.
16. Huang C, Cui YY, Weng C, et al. Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene Ol-1 on chromosome 6 of tomato. *Theor Appl Genet.* 2000;101:918-24. doi: 10.1007/s001220051562.
17. Tamari F, Hinkley CS. Extraction of DNA from plant tissue: Review and protocols. In: *Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples. Springer Protocols Handbooks.* New York: Humana Press; 2016. p. 245-63. doi: 10.1007/978-1-4939-3185-9_17.

Поступила в редакцию 03.11.2024 После доработки 22.11.2024 Принята к публикации 18.12.2024

ВНИМАНИЮ СОИСКАТЕЛЕЙ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ И ДРУГИХ ЗАИНТЕРЕСОВАННЫХ ЛИЦ!

Редакция журнала «Достижения науки и техники АПК» издает монографии
и другую книжную продукцию с редактированием и всеми выходными данными.

Цены договорные.

Заявки отправлять по адресу: 101000, г. Москва, Моспочтамт, а/я 166.

Тел.: (963) 758-48-44. E-mail: agroapk@mail.ru