

Идентификация аллелей гена *Cf-9* устойчивости к кладоспориозу у гибридов томата F_1 селекции Агрофирмы «Поиск»

Identification of *Cf-9* gene alleles of resistance to leaf mold in F_1 tomato hybrids bred by Poisk Agrofirm

Ерошевская А.С., Егорова А.А., Милюкова Н.А., Пырсигов А.С.

Eroshevskaya A.S., Egorova A.A., Milyukova N.A., Pysrikov A.S.

Аннотация

Abstract

В статье представлены результаты молекулярно-генетического анализа F_1 гибридов томата разных товарных групп на наличие аллелей гена устойчивости *Cf-9* к кладоспориозу. Молекулярно-генетический анализ проводили в лаборатории маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ в 2019 году. В качестве объекта исследования использованы 16 F_1 гибридов томата, в том числе 10 крупноплодных, 1 кистевой, 1 коктейль и 4 черри. Повторность исследования двухкратная (одна повторность – одно растение). Для идентификации аллелей гена *Cf-9* устойчивости к кладоспориозу применяли SCAR-маркер со следующими праймерами: CS5 (TTTCCAACCTTACAATCCCTTC), DS1 (GAGAGCTCAACCTTTACGAA), CS1 (GCCGTTCAAGTTGGGTGTT). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 50–100 нг ДНК, 2,5 мМ dNTP, 3 мМ $MgSO_4$, 10 пМ каждого праймера, 2 ед. Taq-полимеразы (ООО «НПФ Синтол») и 2х стандартный ПЦР буфер. Реакцию проводили в амплификаторе Termal Cyler Bio-Rad T 100 по программе 95 °C – 5 мин, 35 циклов 95 °C – 20 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с, финальная элонгация в течение 5 мин при 72 °C. Визуализацию результатов ПЦР проводили путем электрофореза в 1,7%-ном агарозном геле с 1х TAE буфером, результаты анализировали с помощью системы Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). При идентификации гена устойчивости *Cf-9* к кладоспориозу у изучаемых гибридов томата F_1 были выявлены фрагменты размером 378 п.н. (аллель *Cf-9*) и 507 п.н. (аллель 9DC), что указывает на их устойчивость к этому заболеванию. Согласно результатам исследований, из 16 F_1 гибридов томата 13 устойчивы к кладоспориозу, причем у 12 из них выявлено наличие только аллелей *Cf-9*, 1 гибрид имеет в генотипе оба аллеля устойчивости – *Cf-9* и 9DC. Доминантные гомозиготы по гену *Cf-9* будут использованы в селекционных программах Агрофирмы «Поиск» для создания линий-доноров устойчивости к кладоспориозу.

The article presents the results of molecular genetic analysis of F_1 tomato hybrids of different commodity groups for presence of *Cf-9* gene alleles of resistance to leaf mold. The molecular genetic analysis was carried out in the laboratory of marker and genomic plant breeding of FSBSI VNIISB in 2019. 16 F_1 tomato hybrids were used as the object of the study, including 10 large-fruited, 1 brush, 1 cocktail and 4 cherry. The repetition of studies is two-fold (one frequency – one plant). To identify alleles of the *Cf-9* gene for cladosporiosis resistance, a SCAR marker with the following primers was used: CS5 (TTTCCAACCTTACAATCCCTTC), DS1 (GAGAGCTCAACCTTTACGAA), CS1 (GCCGTTCAAGTTGGGTGTT). The reaction mixture for PCR with a volume of 25 μ l contained 50–100 ng of DNA, 2.5 mM dNTP, 3 mM $MgSO_4$, 10 pM of each primer, 2 units. Taq-polymerase (LLC NPF Synthol) and 2x standard PCR buffer. The reaction was carried out in the Termal Cyler Bio-Rad T 100 amplifier according to the program 95 °C – 5 min, 35 cycles 95 °C – 20 s, 60 °C – 30 s, 72 °C – 30 s, the final elongation for 5 minutes at 72 °C. The PCR results were visualized by electrophoresis in a 1.7% agarose gel with 1x TAE buffer, the results were analyzed using the Gel Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The identification of the *Cf-9* resistance gene to cladosporiosis in the studied tomato F_1 hybrids revealed fragments of 378 bp (*Cf-9* allele) and 507 bp (9DC allele), which indicates their resistance to this disease. According to the research results, 13 out of 16 tomato F_1 hybrids are resistant to cladosporiosis, and 12 of them have only *Cf-9* alleles, 1 hybrid has both *Cf-9* and 9DC resistance alleles in the genotype. Dominant homozygotes for the *Cf-9* gene will be used in breeding programs of Poisk Agrofirm to create donor lines for resistance to cladosporiosis.

Key words: tomato, leaf mold, molecular genetic analysis, resistance, donor.

For citing: Identification of *Cf-9* gene alleles of resistance to leaf mold in F_1 tomato hybrids bred by Poisk Agrofirm. A.S. Eroshevskaya, A.A. Egorova, N.A. Milyukova, A.S. Pysrikov. Potato and vegetables. 2021. No3. Pp. 35-37. <https://doi.org/10.25630/PAV.2021.55.18.004> (In Russ.).

Ключевые слова: томат, кладоспориоз, молекулярно-генетический анализ, устойчивость, донор.

Для цитирования: Идентификация аллелей гена *Cf-9* устойчивости к кладоспориозу у гибридов томата F_1 селекции Агрофирмы «Поиск» / А.С. Ерошевская, А.А. Егорова, Н.А. Милюкова, А.С. Пырсигов // Картофель и овощи. 2021. №3. С. 35-37. <https://doi.org/10.25630/PAV.2021.55.18.004>

В современных теплицах проблема защиты томата от болезней остается актуальной, несмотря на улучшение технологии выращивания культуры. Одна из распространенных болезней томата – кладоспориоз, или бурая пятнистость листьев томата (*leaf mold*), возбудитель – патогенный гриб *Passalora fulva* (син.: *Cladosporium fulvum*, *Fulvia fulva*). Известно много физиологических рас патогена *P. fulva*,

причем в России идентифицировано 8 рас. Болезнь наиболее вредоносна при выращивании томата в защищенном грунте, но встречается и в полевых условиях. Наибольшего развития кладоспориоз достигает при температуре 24–26 °C и относительной влажности воздуха более 75% [1]. Патогенный гриб может поражать листья (пораженные участки с окраской от светло-зеленой до желтоватой; оливково-зе-

леные массы конидий гриба на нижней поверхности листьев – рис.), плоды (кожистая гниль черного цвета со стороны чашечки), цветки, стебли [2]. Неустойчивые растения могут потерять большую часть плодов и листового аппарата, в результате чего урожайность значительно снижается. Один из методов борьбы с этой болезнью – выращивание устойчивых к кладоспориозу сортов и гибридов томата [1].



Симптомы поражения листьев томата грибом *P. fulva*

Многие селекционные компании (Seminis, Syngenta, Harris Moran, Sakata, Asgrow и др.) в процессе селекции томата используют молекулярные маркеры на устойчивость к болезням различного происхождения [3]. Успешное внедрение маркер-ориентированной селекции (MAS) в селекционные программы объясняется многими преимуществами отбора по генотипу по сравнению с классическим отбором по фенотипу: высокая точность отбора, значительное ускорение селекционного процесса, сокращение площадей, занятых селекционным материалом, экономия трудовых и материальных ресурсов; независимость генотипа от изменений условий окружающей среды [4, 5, 6, 7].

Устойчивость томата к кладоспориозу наследуется как полностью доминантный признак. Генетический механизм устойчивости томата к этому заболеванию сложен и контролируется 24 доминантными генами [1]. В России наиболее эффективные гены устойчивости – *Cf-2*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, дающие устойчивость к расам гриба 1, 3 и 4 [8].

Цель исследования: ДНК-типирование аллелей гена устойчивости *Cf-9* к кладоспориозу у F_1 гибридов томата разных товарных групп (черри, коктейль, кистевые, крупноплодные) селекции Агрофирмы «Поиск».

Условия, материалы и методы исследований

Молекулярно-генетический анализ проводили в лаборатории маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ в 2019 году.

В качестве объекта исследования использованы 16 F_1 гибридов томата, в том числе 10 крупноплодных, 1 кистевой, 1 коктейль и 4 черри. Повторность исследований двукратная (одна повторность – одно растение).

Для идентификации аллелей гена *Cf-9* устойчивости к кладос-

Результаты ДНК-типирования аллелей гена устойчивости *Cf-9* к кладоспориозу, 2019 год

№	Гибрид		Товарная группа	№ образца	Наличие целевых фрагментов*
	название				
1	F ₁ 603/19		Крупноплодный	603–1	378 (R)
				603–2	378 (R)
2	F ₁ 604/19		Крупноплодный	604–1	378 (R)
				604–2	378 (R)
3	F ₁ 605/19		Крупноплодный	605–2	– (S)
				605–5	– (S)
4	F ₁ 606/19		Крупноплодный	606–1	– (S)
				606–2	– (S)
5	F ₁ 608/19		Крупноплодный	608–1	– (S)
				608–2	– (S)
6	F ₁ 609/19		Крупноплодный	609–1	378 (R)
				609–2	378 (R)
7	F ₁ 612/19		Крупноплодный	612–1	378+507 (R)
				612–3	378+507 (R)
8	F ₁ 623/19		Крупноплодный	623–2	378 (R)
				623–4	378 (R)
9	F ₁ 624/19		Крупноплодный	624–1	378 (R)
				624–3	378 (R)
10	F ₁ 625/19		Крупноплодный	625–2	378 (R)
				625–3	378 (R)
11	F ₁ 614/19		Кистевой	614–1	378 (R)
				614–2	378 (R)
12	F ₁ 797/19		Коктейль	797–2	378 (R)
				797–3	378 (R)
13	F ₁ 835/19		Черри	835–1	378 (R)
				835–4	378 (R)
14	F ₁ 704/19		Черри	704–1	378 (R)
				704–2	378 (R)
15	F ₁ 798/19		Черри	798–1	378 (R)
				798–4	378 (R)
16	F ₁ 800/19		Черри	800–1	378 (R)
				800–2	378 (R)

*R – устойчивый (resistance), S – восприимчивый (susceptible)

пориозу применяли SCAR-маркер (sequence characterized amplified region, характерная последовательность амплифицируемого участка) со следующими праймерами: CS5 (TTTCCAACCTTACAATCCCTTC), DS1 (GAGAGCTCAACCTTTACGAA), CS1 (GCCGTTCAAGTTGGGTGTT). Выделение ДНК проводили из молодых листьев по методике, описанной J. Plaschke et al. [9] с модификациями [10]. Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 50–100 нг ДНК, 2,5 мМ dNTP, 3 мМ MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 2 ед. Taq-полимеразы (ООО «НПФ Синтол», г. Москва) и 2х стандартный ПЦР бу-

фер. Реакцию проводили в амплификаторе Termal Cycler Bio-Rad T 100 по программе 95 °С – 5 мин, 35 циклов 95 °С – 20 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с, финальная элонгация в течение 5 мин при 72 °С. Визуализацию результатов ПЦР проводили путем электрофореза в 1,7%-ном агарозном геле с 1x TAE буфером, результаты анализировали с помощью системы Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Результаты исследований

Выбранные нами праймеры при заданных параметрах ПЦР позволяют амплифицировать фрагменты размером 378 п.н. (аллель *Cf-9*) и 507 п.н. (аллель *9DC*), свидетельст-

твующие о наличии аллелей устойчивости. Восприимчивые генотипы не содержат данных фрагментов. Всего было проанализировано 32 образца (табл.).

Установлено, что из 10 крупноплодных F_1 гибридов томата 7 устойчивы к кладоспориозу, из них 6 несут доминантные аллели *Cf-9* (F_1 603/19, F_1 604/19 и др.), 1 гибрид – аллели *Cf-9* и *9DC* (F_1 612/19). У крупноплодных гибридов F_1 605/19, F_1 606/19 и F_1 608/19 не выявлено фрагментов 378 и 507 п.н., следовательно, они восприимчивы к кладоспориозу.

Кистевой гибрид F_1 614/19 содержит ген *Cf-9* в гомозиготном состоянии.

Среди 5 F_1 гибридов томата групп черри и коктейль (F_1 797/19, F_1 835/19, F_1 704/19, F_1 798/19, F_1 800/19) все были доминантными гомозиготами по гену *Cf-9*, так как имеют фрагмент 378 п.н.

Выводы

Таким образом, из 16 гибридов томата разных товарных групп 13 оказались устойчивыми к кладоспориозу, причем у 12 из них выявлено только наличие аллелей *Cf-9*, лишь 1 гибрид имеет в геноти-

пе оба аллеля устойчивости – *Cf-9* и *9DC*. Планируется оценка устойчивости изученных гибридов томата F_1 к кладоспориозу в условиях пленочных грунтовых теплиц с целью проверки эффективности исследуемого гена *Cf-9*. Доминантные гомозиготы по гену *Cf-9*, устойчивые в пленочных грунтовых теплицах, будут использованы в селекционных программах Агрофирмы «Поиск» для создания линий-доноров устойчивости к кладоспориозу.

Библиографический список

1. Ахатов А.К. Мир томата глазами фитопатолога. М.: Тов-во науч. изданий «КМК», 2016. 292 с.
2. Руководство по болезням томата. Практическое пособие для семеноводов, овощеводов и консультантов по сельскому хозяйству / под ред. Б. Габора. Seminis, 1997. 81 с.
3. Игнатова С.И., Терешонкова Т.А., Багирова С.Ф. Молекулярные исследования в области селекции томата на устойчивость к заболечиванию: краткий обзор последних достижений и приоритетных направлений // Гавриш. 2008. №3. С. 44–47.
4. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. №4-2. С. 1044–1054.
5. Чесноков Ю.В., Косолапов В.М. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса. М.: ООО «Угрешская типография», 2016. 172 с.
6. Barone A. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato // A paper presented during the FAO international workshop on «Marker assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?». 2003. Pp. 29–34.
7. Moose St.P., Mumm R.H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. Plant Physiol. 2008. Vol. 147. Pp. 969–977. DOI: 10.1104/pp.108.118232.
8. Игнатова С.И. Роль наследственного потенциала по устойчивости у томата в системе комплексной защиты в закрытом грунте // Гавриш. 2001. №6. С. 18–20.
9. Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1995. Vol. 91. Pp. 1001–1007. DOI: 10.1007/BF00223912.
10. Шамшин И.Н., Кудрявцев А.М., Савельев Н.И. Создание генетических паспортов сортов яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов генома: методика. Мичуринск, 2013. 44 с.

References

1. Akhatov A.K. The world of tomato through the eyes of a phytopathologist. Moscow. KMK Scientific Press Ltd. 2016. 292 p. (In Russ.).
2. Manual of the tomato diseases. Practical guide for seed growers, vegetable growers and agricultural consultants. Ed. B. Gabor. Seminis. 1997. 81 p. (In Russ.).
3. Ignatova S.I., Tereshonkova T.A., Bagirova S.F. Molecular studies in the field of tomato breeding for disease resistance: a brief overview of recent achievements and priority areas. Gavrish. 2008. No3. Pp. 44–47 (In Russ.).
4. Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. Vavilov journal of genetics and breeding. 2013. Vol. 17. No4-2. Pp. 1044–1054 (In Russ.).
5. Chesnokov Yu.V., Kosolapov V.M. Genetic resources of plants and acceleration of the breeding process. Moscow. Ugresh Printing House LLC. 2016. 172 p. (In Russ.).
6. Barone A. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. A paper presented during the FAO international workshop on «Marker assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?». 2003. Pp. 29–34.
7. Moose St.P., Mumm R.H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. Plant Physiol. 2008. Vol. 147. Pp. 969–977. DOI: 10.1104/pp.108.118232.
8. Ignatova S.I. The role of the hereditary potential of tomato resistance in the system of complex protection in protected ground. Gavrish. 2001. No6. Pp. 18–20. (In Russ.).
9. Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995. Vol. 91. Pp. 1001–1007. DOI: 10.1007/BF00223912.
10. Shamshin I.N., Kudryavtsev A.M., Saveliev N.I. Creation of genetic passports of apple varieties based on the analysis of polymorphism of microsatellite loci of the genome: methodology. Michurinsk. 2013. 44 p. (in Russ.).

Об авторах

Ерошевская Анастасия Сергеевна, аспирант, м.н.с., ВНИИО – филиал ФГБНУ ФНЦО. E-mail: eroshnast@yandex.ru
 Егорова Анна Анатольевна, канд. с.-х. наук, с.н.с., ВНИИО – филиал ФГБНУ ФНЦО. E-mail: edvaed@rambler.ru
 Милукова Наталья Александровна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории маркерной и геномной селекции растений, ФГБНУ ВНИИСБ, доцент кафедры генетики, селекции и семеноводства, РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. E-mail: milyukovan@gmail.com
 Пырников Андрей Сергеевич, канд. с.-х. наук, н.с. лаборатории маркерной и геномной селекции растений, ФГБНУ ВНИИСБ. E-mail: andrey.pyrsikov@yandex.ru

Author details

Eroshevskaya A.S., post-graduate student, junior research fellow, ARRIVG – branch of FSBSI FSVС
 Egorova A.A., Cand. Sci. (Agr.), senior research fellow, ARRIVG – branch of FSBSI FSVС. E-mail: edvaed@rambler.ru
 Milyukova N.A., Cand. Sci. (Biol.), senior research fellow of Laboratory of Marker and Genomic Plant Breeding, FSBSI All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (ARRIAB), Associate Professor of the Department of Genetics, Selection and Seed Production, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RSAU – MTAA). E-mail: milyukovan@gmail.com
 Pyrsikov A.S., Cand. Sci. (Agr.), research fellow of the laboratory of genomic and marker-assisted plant breeding, ARRIAB. E-mail: andrey.pyrsikov@yandex.ru