

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТА К ВТМ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА СТАДИИ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН

**В.С.П. Кумари, Ю.Л. Гужов, Российский университет дружбы народов,
Н.А. Урсул, Е.Г. Козарь, И.Т. Балашова,
Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур**

Основные стрессовые факторы, ограничивающие урожайность томата — холод, фитофтороз (*Phytophthora infestans* DB) и вирус табачной мозаики (ВТМ). У культивируемых томатов устойчивость к ВТМ контролируется интрогрессированными R-генами: *Tm-1* (синоним *Tm*) и аллелями *Tm-2* / *Tm-2a* (синоним *Tm-2³*) [5, 9]*. Ген *Tm-1* картирован в позиции, близкой к рибосомальным РНК-генам [11]. Кодированный им белок распознает как продукт гена авирулентности (*Avr*-гена) РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса, контролируя устойчивость к патогену на клеточном уровне. Однако единственная аминокислотная замена в структуре данного фермента (Gln-979 на Glu) приводит к преодолению устойчивости, обусловленной данным геном [6]. Считается, что естественная защита гена *Tm-1* недостаточна, и должна дополняться подключением другой системы генов устойчивости [1]. Гены *Tm-2* и *Tm-2a* контролируют устойчивость к ВТМ на тканевом уровне (при передвижении вируса от клетки к клетке по плазматическим мембранам) [8]. В 2004 г. Weber Н. с коллегами установили, что оба гена распознают как продукт *Avr*-гена 30-kDa транспортный белок, отвечающий за распространение вируса по плазматическим мембранам, причем ген *Tm-2* распознает N-концевой локус из 188 аминокислот, а ген *Tm-2a* ответственен за распознавание карбокси-терминального локуса [12]. Несмотря на некоторые характеристики, негативные для селекции [1], предполагается, что аллели *Tm-2* и *Tm-2a* обеспечивают более длительную защиту от ВТМ, чем ген *Tm-1* [7].

Цель работы — изучение эффективности генов устойчивости томата к ВТМ под действием холодного стресса на стадии прорастания семян. Экспериментальную часть работы провели в 2003—2006 гг. в лаборатории молекулярных и гаметных методов селекции ВНИИССОК.

Материалом исследований служили образцы с целевыми генами и формы, мутантные по данным генам, полученные из ВНИИР им. Н.И. Вавилова, а также образцы из коллекции маркерных мутантов, поддерживаемой в лаборатории гаметных и молекулярных методов селекции ВНИИССОК. В качестве стандарта восприимчивости использовали сорт Дубок, восприимчивость которого к ВТМ установлена ранее [2].

Программа исследований включала классификацию штамма ВТМ, полученного из Главного Ботанического сада РАН, с помощью растений-дифференциаторов [по 10], проращивание семян в течение 14 сут. при +10° (опыт) и +25°С (контроль), искусственное заражение штаммом 0 ВТМ, визуальное обследование и диагностика по симптомам [4], DAS-ELISA [3], проводимый с помощью диагностических наборов с антисыворотками к ВТМ, X- и Y-вирусам картофеля, полученных из Биотехнологического центра ИКХ «Коренево», оценку биометрических параметров растений, дисперсионный анализ.

Идентификация штамма ВТМ, полученного из ГБС РАН, проведенная по классификации Pelham [10] (табл. 1), подтвердила его принадлежность к штамму 0 ВТМ (дикого типа).

Таблица 1. Идентификация штамма ВТМ, 2003 г.

Дифференциаторы	Реакция на заражение штаммом ВТМ
Восприимчивый (сорт Дубок) (+/+)	Системная инфекция, подавление роста
Толерантный (Craigella, <i>Tm-1</i> / <i>Tm-1</i>)	Отсутствие симптомов — 0, стимуляция роста
Устойчивый (Craigella, <i>Tm-2a</i> / <i>Tm-2a</i>)	Отсутствие симптомов — 0, стимуляция роста

Эффективность генов устойчивости к ВТМ оценивали, моделируя искусственную эпифитотию диким штаммом ВТМ в популяции, содержащей образцы с целевыми генами. Присутствие вируса в бессимптомных образцах контролировали DAS-ELISA.

Установлено, что генотип, мутантный по гену *Tm-1*, но содержащий ген *Tm-2a*, надежно защищен геном *Tm-2a* и не проявляет симптомов, а генотип, мутантный по гену *Tm-2a*, не может противостоять заражению (табл. 2). Таким образом, еще раз была подтверждена эффективность гена *Tm-2a*.

Таблица 2. Эффективность защиты, обеспечиваемой генами устойчивости к ВТМ, 2003 г.

Вариант (образец)	Симптомы (степень распространения заболевания), %	Снижение		
		высоты сеянца, мм	высоты растения, мм	массы растения, г
Дубок — St восприимчивости (+/+)	100	44,0	121,0	1,78
Мутант по гену <i>Tm-2</i>	100	73,1	63	—
№ 159/99	0	7,3	38,5	2,8
Mobaci (<i>Tm-1</i>)	10	25,7	14,5	—
Craigella (<i>Tm-1</i> / <i>Tm-1</i>)	0	24,9	92,5	0,2
GCR 26779612 (+ / <i>Tm-2</i> , <i>Tm-2</i>)	0	42,0	70,0	0,9
Мутант по гену <i>Tm</i> (<i>Tm-2a</i>)	0	21,8	+ 10,0	—
845/98	0	5,4	47,9	1,36
Craigella (<i>Tm-2a</i> / <i>Tm-2a</i>) — St устойчивости	0	26,0	19,0	+0,04
HCP ₀₅		17,1	46,9	0,9

Главным для селекционеров является длительность защиты, обеспечиваемая генами устойчивости при адаптации растений в открытых системах. В условиях открытого грунта Нечерноземной зоны РФ для томата

* Со списком литературы можно ознакомиться на сайте www.agroxxi.ru

Таблица 3. Изменение эффективности генов устойчивости к ВТМ при холодовом стрессе на стадии прорастания семян, 2006 г.

Вариант (образец)	Симптомы — визуально (степень распространения заболевания), %			
	21 сут. после заражения		36 сут. после заражения	
	+25°C	+10°C	+25°C	+10°C
Дубок — St восприимчивости (+/+)	85,7	91,7	100	100
Mobaci (<i>Tm-1</i>)	33,3	20	0	0
Mo 137 — маркерный мутант	0	0	50	50
Craigella (<i>Tm-1</i> / <i>Tm-1</i>)	0	0	0	0
№ 5173-ВНИИР(<i>Tm-1</i>)	0	0	0	0
Mo 409 — маркерный мутант	0	0	0	0
Craigella (<i>Tm-2a</i> / <i>Tm-2a</i>)	16,7	77,8	20	100

наиболее опасен холодовой стресс в период прорастания семян. Поэтому в 2006 г. мы решили исследовать эффективность генов *Tm-1* и *Tm-2a* при прорастании семян на фоне низкой положительной температуры на уровне +10°C (табл. 3).

Анализ полученного экспериментального материала позволяет сделать вывод, что устойчивость, контролируемая геном *Tm-1*, более длительна, чем устойчивость, контролируемая геном *Tm-2a*: в наших экспериментах она проявлялась в 2003—2006 гг. ежегодно и сохранялась даже при низкотемпературном стрессе. 

Литература

1. Квасников Б.В., Игнатова С.И., Горшкова Н.С., Сухов К.С. и др. Методика селекции сортов и гибридов томата, устойчивых к вирусу табачной мозаики в связи с его вариабельностью. — Москва. — 1984. — 29 с.
2. Шатило В.И., Бочарникова Н.И., Музыкантов В.П., Балашова Н.Н. Использование маркерной коллекции мутантов томата для выявления механизмов устойчивости к вирусам. — В сб.: Генетические коллекции овощных растений. — Санкт-Петербург. — 1999. — С. 5—17.
3. Clark A.F., Adams A.N. General Virology. — 1977. — V. 34, №3. — P. 475—483.
4. European Handbook of Plant Diseases. — Edited I.M. Smith. — 1989. — Blackwell Scientific Publications. — 583 p.
5. Hall T.J. Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to tomato mosaic virus. Euphytica, 1980. — №29. — P. 189—197.
6. Hamamoto H., Watanabe Y., Kamada H., Okada Y. Amino-acid changes in the putative replicase of tomato mosaic tobamovirus, that overcome resistance in *Tm-1* tomato. — J. Gen. Virology — 1997 — №8. — P. 461—464.
7. Lanfermeijer F.C., Dijkhuis J., Sturre M.J.G. et al. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm-22* from *Lycopersicon esculentum*. — Plant Molecular Biology, 2003. — V. 52. — P. 1037—1049.
8. Nishigushi M., Motoyoshi F. Resistance mechanisms of tobacco mosaic virus strains in tomato and tobacco. — Plant resistance to viruses. John Wiley and Sons. — Chichester. — 1987. — P. 38—46.
9. Pelham J. Resistance in tomato to tobacco mosaic virus / J. Pelham // Euphytica. — 1966. — №15. — P. 258—267.
10. Pelham J. Strain-genotype interaction of tobacco mosaic virus in tomato. — Annuals of Applied Biology. — 1972. — №71. — P. 219—228.
11. Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P. et al. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. — Genetics, 1992. — №132. — P. 1141—1160.
12. Weber H., Ohnesorge S., Silber M.V., Pfizner A.J.P. The Tomato mosaic virus 30 kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes *Tm-2* and *Tm-22*. — Archives of Virology. — Published online April 5, 2004.