

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ГЕНОТИПІВ ТОМАТА З РІЗНИМ СТУПЕНЕМ СТІЙКОСТІ ДО ФУЗАРІОЗУ

С. І. Кондратенко, Н. О. Баштан, С. А. Лисак, Г. І. Яровий

*Інститут овочівництва і баштанництва НААН України
Україна, 62478, п/в Селекційне, Харківської обл., вул. Інститутська, 1
E-mail: ovoch-iob@online.ua*

Оцінено інформативні можливості 5 пар прямих та зворотних SSR праймерів (SSR14, SSR105, SSR111, SSR266, SSR295) щодо їх придатності детектувати як внутрішньовидовий, так міжвидовий поліморфізм томата. Проведено аналіз 9 форм томата з різним ступенем стійкості до збудника фузаріозного в'янення (*Fusariumoxysporum*) за 5 мікросателітними локусами. В результаті молекулярних досліджень, виявлено 19 алельних варіантів від 2 до 5 на один локус, що в середньому складає 3,8 алеля на один мікросателітний локус. Серед вибірки мікросателітних локусів, найбільш поліморфними виявилися SSR14 та SSR105, які містили 5 алелів на один локус. Створено генетичні паспорти двох генотипів-стандартів за стійкістю до фузаріозного в'янення (*Fusariumoxysporum*) – лінії La 4026 та F₇ Orko (*Lycopersiconesculentum* (Mill.)), проведено генетичну ідентифікацію чотирьох напівкультурних форм томата (*L. esculentum* var. *pimpinellifolium* (Mill.) Brezh., *L. esculentum* var. *cerasiforme* (A. Gray) Brezh., *L. cheesmanii* var. *typicus* Riley, *L. esculentum* var. *racemigerum* (Lange)Brezh.), які є донорами стійкості до абіотичних та біотичних чинників та є перспективними для інтрогресії зародкової плазми в генофонд культурних форм томата.

Ключові слова: томат, поліморфізм, геном, мікросателітні локуси, SSR праймери, генетична паспортизація.

Томат (*Lycopersiconesculentum* (Mill.)) є однією з найбільш розповсюджених і продуктивних овочевих рослин у світовому рослинництві. З іншого боку, томат – це модельний класичний генетичний об'єкт. Генетичні дослідження томата сприяли корінному поліпшенню даної культури і стали основою для розвитку теоретичної і прикладної генетики рослин [1, 2]. Цей вид овочевої рослини уражається більше ніж 20 видами патогенних мікроорганізмів, з яких одними з найбільш шкідливих є гриби роду *Fusarium* [3, 4, 5]. Протягом 2005-2008 рр. в Інституті овочівництва і баштанництва НААН проводилися дослідження з пошуку генетичних джерел стійкості до негативної дії на рослини томата патогенного виду гриба *Fusariumoxysporum*. За результатами проведених імунологічних досліджень створена робоча колекція селекційно-цінних форм, які як на природному, так і штучному інфекційних фонах виявили однотипну реакцію щодо ступеня стійкості. Для подальшого використання робочої колекції в селекційному процесі виникла необхідність генетичної ідентифікації генотипів томата з метою встановлення рівня їхньої типовості та генетичної чистоти. Генотип у сучасному розумінні молекулярної генетики характеризується набором унікальних алелей. У зв'язку з тим, що SSR-аналіз дозволяє виявити поліморфізм (алелізм) певного локусу, тому оптимальним для характеристики та ідентифікації генотипів є аналіз мікросателітних повторів [6, 7]. Для удосконалення методики проведення молекулярного аналізу теоретичний і практичний інтерес становить розробка оптимальної ідентифікаційної системи мікросателітних маркерів для характеристики генотипів різних видів томата, які використовуються для удосконалення генофонду культурного томата (*L. esculentum* (Mill.)) методами трансгресивної і інтрогресивної селекції. Для покращення імунологічних та селекційних досліджень в інституті актуальним є подальше впровадження методів генетичного маркування локусів

генів, які забезпечують стійкість томата до різних патогенів. За нашими даними на теперішній час розроблені генетичні маркери на локуси генів стійкості до кладоспоріозу [8], альтернаріозу [9] та до інших хвороб [10].

Виходячи з вищенаведеного мета проведених досліджень полягала в аналізі молекулярно-генетичного поліморфізму геному томата і проведенні на основі випробуваних SSR маркерів генетичної паспортизації ліній, сортів і гібридів культурного (*L. esculentum* (Mill.)) та напівкультурних форм томата з різним ступенем стійкості до фузаріозу.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.

У дослідженнях використовували контрастні за стійкістю до збудника фузаріозного в'янення лінії і сорти та напівкультурні форми томата з колекцій Інституту овочівництва і баштанництва НААН (табл. 1). Добір стійких форм проводили згідно методичних рекомендацій [11].

Таблиця 1

Форми томата з різних ступенем стійкості до фузаріозу, для яких проводилася генетична ідентифікація

Назва форми	Ступінь стійкості до фузаріозу *	Науковий центр або країна, з яких було одержано форми
1	2	3
La 4026 (лінія, st) (<i>L. esculentum</i> (Mill.))	R	Центр генетичних ресурсів томата США (TGRC)
F ₇ Orko (лінія, st)	R	Селекція ІОБ НААН
Сорт Apricot (<i>L. esculentum</i> (Mill.))	S'	Нідерланди (робоча колекція ІОБ НААН)
<i>L. esculentum</i> var. <i>pimpinellifolium</i> (Mill.) Brezh.. (напівкультурна форма томата)	S'	Всеросійський інститут рослинництва ім. М.І. Вавілова (ВІР, Росія)
<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> (A. Gray) Bezh. (напівкультурна форма томата)	S	Всеросійський інститут рослинництва ім. М.І. Вавілова (ВІР, Росія)
<i>L. cheesmanii typicus</i> Riley (напівкультурна форма томата)	S	Всеросійський інститут рослинництва ім. М.І. Вавілова (ВІР, Росія)
<i>L. esculentum</i> var. <i>racemigerum</i> (lange) Brezh. (напівкультурна форма)	S	Всеросійський інститут рослинництва ім. М.І. Вавілова (ВІР, Росія)
CLN 2037 B (лінія) (<i>L. esculentum</i> (Mill.))	S ⁺	Центр генетичних ресурсів рослин Тайваню (AVRDC)
Сорт Goldcrone (<i>L. esculentum</i> (Mill.))	S ⁺	Чехія (робоча колекція ІОБ НААН)

Примітки. R – імунні форми; S' – форми із середньою стійкістю;

S – сприйнятливі форми; S⁺ – надто сприйнятливі форми.

Виділення ДНК з рослинної тканини. ДНК виділяли з етіологованих паростків. Паростки розтирали в епендорфі з 0,5 мл лізуючого буфера (1,4 М NaCl; 20 mM Na₃EDTA; 100 mM трис-HCl pH 8,0 (25 °C), 2 % СТАВ). Інкубували на водяній бані протягом 50-60 хв. при 60 °C. Депротейнізацію проводили рівним об'ємом суміші хлороформу та ізоамілового спирту (24:1). Центрифугували протягом 4 хв. у центрифугі "Eppendorf 5415" при 12000 об/хв., водну фазу (не зачіпаючи інтерфазу) переносили у новий епендорф. ДНК екстрагували рівним об'ємом ізопропанолу з наступним центрифугуванням протягом 5 хв. при 14000 об/хв. Надосадову рідину обережно зливали. Осад промивали двічі 0,3 мл та

додатково 0,2 мл 70 % етанолу. Отриманий осад ДНК розчиняли в 300 мкл розчину TE (10 mM трис-НСl, рН 8,0; 1 mM Na₃EDTA) див.[7].

Флуориметричне визначення концентрації ДНК. Концентрацію ДНК визначали на флуориметрі ТКО Hoefler-100 (виробництва фірми "Hoefler Scientific Instruments", США) з використанням TNE-буфера (0,01 M трис-НСl рН 7,4; 0,2 M NaCl; 0,001 M Na₃EDTA) у присутності 0,1 мкг/мл флуоресцентного барвника Hoechst 33258 згідно інструкції до приладу.

Ампліфікація мікросателітної ДНК за допомогою ПЛР. ПЛР проводили в 0,5 мкл-епендорфах в ДНК ампліфікаторі "Amplify_2-25П" (виробництва фірми "Біоком", Росія). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила буфер (0,05 M KCl; 0,02 M трис-НСl рН 8,4; 0,002 M MgCl₂; 0,01 % Твін-20); по 0,2 mM кожного dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 2 одиниці ДНК-полімерази Taq. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінерального масла. Температурний режим ампліфікації: перша денатурація 94 °C 2 хв.; фінальна елонгація 72 °C 3 хв.; 30 основних циклів: денатурація 94 °C 1 хв.; відпалювання праймерів 55-60 °C 1 хв. (залежно від праймерів); елонгація 72 °C 2 хв.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації. Продукти ПЛР з парами праймерів (5 мкл аліквоти ПЛР-суміші) фракціонували в 10,0 % поліакриламідному гелі в TBE-буфері (0,089 M трис-НСl рН 8,0; 0,089 M борна кислота; 0,002 M Na₃EDTA) при постійній напрузі 500 В і температурі 60 °C 2-3 год. залежно від довжини фрагментів ампліфікації в апараті для вертикального гелі-електрофорезу (виробництва фірми "Хелікон", Росія).

Візуалізація продуктів ампліфікації. Для фарбування продуктів ампліфікації, розділених в поліакриламідових гелях, останній промивали деіонізованою водою 1 хв. і проводили фіксацію ДНК в гелі 10,0 % етанолом протягом 5 хв. Переносили гель в 1,0 % азотну кислоту на 6 хв. і промивали кілька разів деіонізованою водою при інтенсивному струшуванні. Гель витримували 20 хв. в 0,012 M AgNO₃ у темряві, промивали двічі деіонізованою водою при інтенсивному струшуванні. Інкубували гель в холодному (+4 °C) оновлюючому розчині (0,28 M Na₂CO₃, 0,019 % формалін), замінюючи розчин після кожного його потемніння до появи забарвлення фрагментів ампліфікації. Фіксували гель в 10,0 % оцтовій кислоті 5 хв., промивали 2 хв. деіонізованою водою і зберігали між двома шарами прозорої поліетиленової плівки.

Статистична обробка результатів ДНК аналізу генотипів томата за допомогою комп'ютерних програм.

Визначення генетичних дистанцій і кластерний аналіз. Встановлення генетичних дистанцій згідно мірі схожості NL, графічну побудову дендрограм генотипів за незваженим парно-груповим методом із арифметичним усереднюванням (Unweighted Pair-Group Method, UPGMA) на основі даних електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "TREES 4.0" [12]. Програма дозволяє визначити генетичні відстані (D), виходячи зі співвідношення:

$$D_{xy} = - \ln F,$$

де D_{xy} – генетична дистанція між зразками X і Y, F – коефіцієнт подібності (міра схожості). У даному випадку використовували коефіцієнт подібності Nl_{xy} [13]:

$$F(Nl_{xy}) = 2 * n_{xy} / (n_x + n_y),$$

де $F(Nl_{xy})$ – коефіцієнт подібності Nei і Li , n_{xy} – загальна сума смуг для двох зразків, n_x і n_y – кількість смуг у зразках X і Y.

Математичний аналіз. Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках як відношення поліморфних ПЛР-локусів до загального числа детектованих ПЛР-локусів: $P = n_p / n_p + n_{np} \times 100 \%$, де n_p - число поліморфних і неполіморфних ПЛР-локусів, n_{np} - число неполіморфних ПЛР-локусів [7].

Значення частот появи алелів кожного локусу розраховували як відношення числа даного алеля до загального числа алелів, відмічених для даного локуса в даній вибірці генотипів.

Індекси поліморфності (Polymorphic Index Content, PIC) досліджених локусів розраховували за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2,$$

де f_i – частота i -того алеля.

Складання генетичних формул. Для реєстрації генотипу використовувати 5 мікросателітних локусів, які були локалізованими на першій, другій і третій хромосомах генома томата *L. esculentum* (Mill.). Реєстрацію генотипу здійснювали шляхом запису формули, в якій відображено алельний склад варіабельних мікросателітних локусів, згідно методичних рекомендацій Південного біотехнологічного центру в рослинництві УААН [14, 15]. Для цього отримані розміри фрагментів ампліфікації кожного мікросателітного локусу, тобто розміри алелів у парах нуклеотидів (п. н.), записували у вигляді ідентифікаційної формули, в якій літерою латинського алфавіту позначали код локусу, нижнім індексом – розмір алеля в п.н. У випадку гомозиготного стану локусу вказували тільки один алель.

Записували ідентифікаційні формули на основі аналізу сумішей ДНК з п'яти рослин кожного лінійного, сортового генотипу, який аналізували. У разі виявлення декількох варіантів формул вважали, що сорт, лінія або напівкультурна форма томата складалася з біотипів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Програма досліджень передбачала вирішення таких питань: проведення диференціації та ідентифікації генотипів томата; аналіз алельного складу відібраних мікросателітних локусів генотипів томата; реєстрацію генотипів у вигляді генетичних формул; порівняння генетичних дистанцій між генотипами за алельним складом SSR-локусів.

В табл. 2 наведено інформацію про мікросателітні локуси геному томата та послідовності прямих і зворотних праймерів для ампліфікації ДНК за даними локусами. Відбір вибірки праймерів був здійснений згідно опублікованої в Інтернеті електронної бази даних різних типів молекулярно-генетичних маркерів, які використовувалися для генетичного картування геному видів рослин родини Пасльонових, згідно міжнародних наукових проектів, присвячених цьому питанню. Даний інформаційний сайт – <http://www.sgn.cornell.edu> представлений

Таблиця 2

Мікросателітні локуси томата та послідовність праймерів для їх аналізу

Локус	Хромосомна локалізація*	Нуклеотидна послідовність прямого (П) та зворотного (З) праймерів (5'-3')
SSR14	3	П* TCTGCATCTGGTGAAGCAAG
		З** CTGGATTGCCTGGTTGATTT
SSR105	1	П* GAGCGGCTTCGAATTCATC
		З** CATTTGAGCAGAAGCGAACA
SSR111	3	П* TTCTTCCCTTCCATCAGTTCT
		З** TTTGCTGCTATACTGCTGACA
SSR266	1	П* CAAGTTCACSTCATTTGACCC
		З** TGTGTGAGCACTAAAGGACGA
SSR295	2	П* CTCCAGAAGGAACTCGATGC
		З** CAATTCCTTTCACCTGCCAC

Примітка. * – Локалізація на хромосомах SSR-локусів вказана для *L. esculentum* (Mill.) (n=12).

Корнельським університетом (США). Зокрема, в табл. 2 наведені SSR-праймери, які використовувалися в двох проектах по складанню генетичних карт різних видів томата – Tomato-EXPEN 2000 [16] та Tomato-EXPIMP 2008 [17]. Вибір цих праймерів був обумовлений тим, що вони детектують мікросателітні локуси ДНК, які локалізовані на різних хромосомах томата, тим самим нами передбачалося забезпечити найкращий прояв молекулярно-генетичного поліморфізму, що є необхідною умовою для генетичної паспортизації генотипів.

Для кожного генотипу були визначені розміри алелей мікросателітного локусу в парах нуклеотидів (п. н.). За результатами проведених досліджень було оцінено інформативні можливості використаних SSR-маркерів щодо їх придатності детектувати як внутрішньовидовий, так міжвидовий поліморфізм томата. Основні статистичні показники інформативності праймерів наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Характеристика досліджених SSR-локусів томата

Локус	Повтор	Всього алелей	Алелі, п.н. (частота появи алеля)	PIC
SSR14	(ATA)	5	125 (0,111), 227 (0,278), 235 (0,167), 431 (0,333), 450 (0,111)	0,759
SSR105	(TC)	5	215 (0,143), 230 (0,238), 240 (0,095), 247 (0,095), 289 (0,429)	0,721
SSR111	(TCTG)	4	247 (0,167), 263 (0,333), 501 (0,387), 549 (0,111)	0,699
SSR266	(TGTA)	2	600 (0,222), 612 (0,778)	0,345
SSR295	(AAT)	3	263 (0,471), 279 (0,059), 289 (0,471)	0,553

Як свідчать представлені дані всього було проаналізовано 9 форм томата з різним ступенем стійкості до збудника хвороби фузаріозне в'янення по 5 мікросателітним локусам. В результаті було виявлено 19 алельних варіантів від 2 до 5 на один локус, що в середньому складає 3,8 алеля на один мікросателітний локус. Серед вибірки мікросателітних локусів, найбільш поліморфними виявилися SSR14 та SSR105, які містили 5 алелів на один локус.

Для оцінки інформативності SSR-локусів використовували два статистичних показника – частота появи алелей локуса та PIC (індекс поліморфності локуса). Для кожного проаналізованого локуса підраховано значення PIC, яке варіювало в межах від 0,345 до 0,759. Усі з вище вказаних локусів, окрім локусу SSR266, оптимально відповідають вимогам щодо їх придатності для генетичної паспортизації генотипів оскільки частота їх появи варіювала в значних межах від 0,095 до 0,778. Було визначено, що локус SSR266 з чотирьохнуклеотидною послідовністю має низький рівень алельного поліморфізму, високу частоту появу алеля розміром 612 п.н. (0,778) у генотипах видів томата з різною філогенетичною віддаленістю та саме низьке з досліджених локусів значенням показника PIC – 0,345 (дані табл. 3).

Генетичні формули досліджуваних генотипів томата представлені в таблиці 4. SSR-локуси кодували буквами латинського алфавіту у такій послідовності А – SSR14; В – SSR105; С – SSR111; D – SSR266; Е – SSR295. На основі генетичних формул генотипів створена комп'ютерна база даних ДНК-типуювання гібридів томата. Необхідність такої бази пов'язана як зі збереженням і порівняльним пошуком інформації про генотипи, так і з постійним поповненням результатами аналізу нових генотипів і нових мікросателітних локусів.

Генетичні формули ліній томата з різним ступенем стійкості до фузаріозу, задіяних в селекційному процесі

Генотип томата	Формула
La 4026 (лінія, st)	A _{227,431} B _{240,289} C _{263,501} D ₆₁₂ E _{263,289}
F7 Orko (лінія, st)	A _{125,235} B _{215,289} C ₂₆₃ D ₆₀₀ E _{263,279}
Apricot (сорт)	A _{235,450} B _{230,289} C _{247,501} D ₆₁₂ E _{263,289}
<i>L. esculentum</i> var. <i>pimpinellifolium</i> (Mill.) Brezh.	A _{227,431} B _{215,247,289} C _{263,501} D ₆₁₂ E _{263,289}
<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> (A. Gray) Brezh.	A _{227,431} B _{230,289} C _{247,501} D ₆₀₀ E _{263,270,289}
<i>L. cheesmanii typicus</i> Riley	A _{125,227,431} B _{215,240,289} C _{263,501} D ₆₁₂ E ₂₈₉
<i>L. esculentum</i> var. <i>racemigerum</i> (Lange)Brezh.	A _{227,431} B _{230,247,289} C _{263,501} D _{263,289} E ₂₈₉
CLN 2037 B (лінія)	A _{235,450} B _{230,289} C _{247,549} D ₆₁₂ E _{263,289}
Goldcrone (сорт)	A _{227,431} B _{230,289} C _{263,501} D ₆₁₂ E _{263,289}

За допомогою кластерного аналізу – UPGMA побудовано дендрограму (рис. 1), яка відображає генетичні відстані між генотипами томата на основі даних SSR-аналізу 5 мікросателітних локусів SSR14, SSR105, SSR111, SSR266 і SSR295. Кластерний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної програми “TREES”. У якості міри генетичного різноманіття використовували генетичну відстань по M. Nei і W.-H. Li. Цифровий запис результатів електрофорезу представлений в таблиці 5.

На представленій дендрограмі частина досліджених форм томата об'єдналася у 2 кластери, окремою гілкою виділилася напівкультурна форма томата *L. esculentum* var. *cerasiforme*. Один кластер утворився з 2-х культурних форм томата – сорту Apricot та лінії CLN 2037 B. Другий кластер має більш складну структуру, в його складі знаходиться два субкластера і дві окремі гілки, утворені “відокремленням” напівкультурної форми томата *L. cheesmanii* var. *typicus* та лінії F7 Orko. Один з субкластерів утворився філогенетично наближеними генотипами культурного томата – лінією La 4026 та сортом Goldcrone, другий поєднує дві напівкультурні форми – *L. esculentum* var. *pimpinellifolium* і *L. esculentum* var. *racemigerum*.

Таким чином, кластерний аналіз підтвердив чітке розмежування по групуванню на кластери культурних форм і філогенетично віддалених до них інших видів томата. Найбільш філогенетично віддаленою від усіх досліджених форм виявився вид *L. esculentum* var. *cerasiforme*. Зокрема, найбільшу генетичну дистанцію зафіксовано між *L. esculentum* var. *cerasiforme*. та лінією F7 Orko ($d = 0,73$), найменшу – між генотипами томата різновидів *L. esculentum* var. *pimpinellifolium* та *L. esculentum* var. *racemigerum* ($d = 0,10$).

Одержані нами дані по філогенетичним відносинам між проаналізованими видами томата будуть використані в селекційному процесі для систематизації генотипів у процесі їх генетичної паспортизації.

ВИСНОВКИ

За результатами проведених досліджень створено генетичні паспорти на два генотипи-стандарти за стійкістю до збудника хвороби фузаріозне в'янення (лінії La 4026 та F7 Orko). Проведено генетичну ідентифікацію чотирьох напівкультурних форм томата (*L. esculentum* var. *pimpinellifolium* (Mill.) Brezh., *L. esculentum* var. *cerasiforme* (A. Gray) Brezh., *L. cheesmanii typicus* Riley, *L. esculentum* var. *racemigerum* (Lange)Brezh.), які є донорами абіотичної та біотичної стійкості і є перспективними формами для інтрогресії зародкової плазми в генофонд культурних форм томата. Відібрано 5 перспективних SSR пар праймерів SSR14, SSR105, SSR111, SSR266, SSR295, які планується використовувати для генетичної паспортизації селекційно-цінних генотипів томата селекції ІОБ УААН.

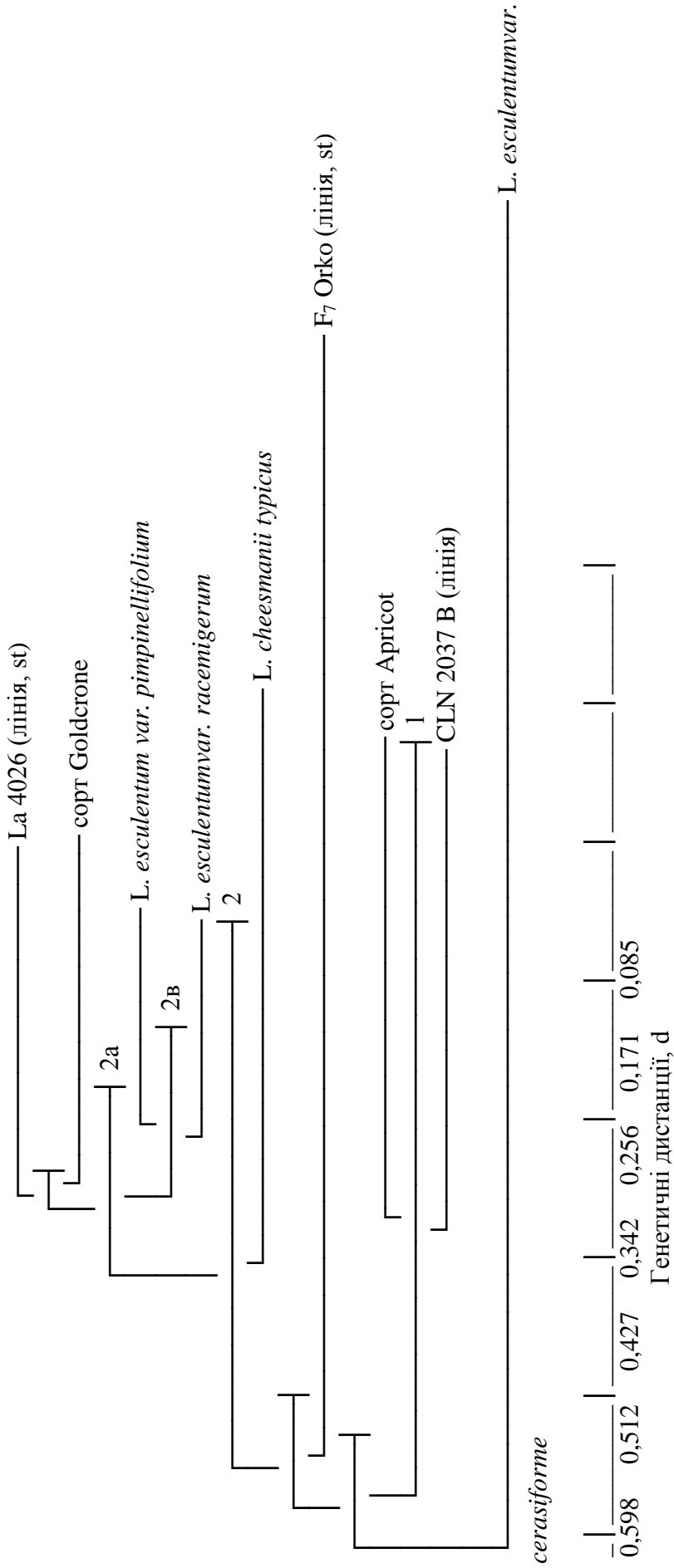


Рис. 1. UPGMA-дендрограма генетичних взаємовідносин між генотипами томата, побудована за даними аналізу SSR-локусів генотипів томата при застосуванні 5 пар праймерів SSR14, SSR105, SSR111, SSR266 і SSR295.

**Цифровий запис результатів електрофоретичного розділення продуктів
ампліфікації***

Зразок томата	Продукти ампліфікації SSR-ПЛР після застосування праймерів:				
	SSR14	SSR105	SSR111	SSR266	SSR295
La 4026 (лінія, st)	01010	00101	0110	01	101
F ₇ Orko (лінія, st)	10100	10001	0101	10	101
Apricot (сорт)	00101	01001	1010	01	101
<i>L. esculentum</i> var. <i>pimpinellifolium</i> (Mill.) Brezh.	01010	10011	0110	01	101
<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> (A. Gray) Brezh.	01010	01001	1010	10	110
<i>L. cheesmanii</i> <i>typicus</i> Riley	10010	10101	0110	01	001
<i>L. esculentum</i> var. <i>racemigerum</i> (Lange)Brezh.	01010	01011	0110	01	101
CLN 2037 B (лінія)	00101	01001	1001	01	101
Goldcrone (сорт)	01010	01001	0110	01	101

Примітка. * – Позначення “1” – означає наявність смуги у електрофоретичному спектрі, “0” – її відсутність.

Розроблену систему SSR маркерів рекомендується використовувати для реєстрації генотипів томата у вигляді генетичних формул, що відображають алейний склад мікросателітних локусів, і отримання генетичного паспорта лінії, сорту або гібриду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Храпалова И.А. Томат – *Lycopersicon* (Tournef.) Mill. // Генетические коллекции овощных растений. Ч. 3 / Под ред. Дроганова В.А. СПб.: ВНИИР, 2001. – С. 18–93.
2. Жученко А.А., Глущенко Е.Я., Андрищенко В.К. и др. Дикие виды и полукультурные разновидности томатов и использование их в селекции. // Кишинев: Картя молдавеняскэ, 1974. – 139 с.
3. Charmley L. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs / L. Charmley, A. Rosenberg, H. Trenholm - Paul, MN: Eagan Press, 1994. - P. 471-487.
4. Nienhuis J. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato / J. Nienhuis, T. Helentjaris, B. Slocum // Crop Sci. - 1987. - Vol. 27, N 2. - P. 797-803.
5. Schilling A. Polymerase Chain Reaction-Based Assays for Species-Specific Detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum* / A. Schilling, E. Moller, H. Geiger // Pythopathology. - 1996. – Vol. 86, N 5. – P. 515-522.
6. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers / D. Tautz // Nucl. Acids Res. - 1989. - Vol. 17, N 16. - P. 6463-6471.
7. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Научно-методическое руководство; Под ред. Ю.М. Сиволапа. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.
8. Thomas C. Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in Cf-4 and Cf-9 /

- C.Thomas, D. Jones, M. Parniske // *The Plant Cell*. – 1997. – Vol. 9, N 12. – P. 2209–2224.
9. Foolad MR, Zhang LP, Khan AA, Nino-Liu D, Lin GY. Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – Vol. 104. – P. 945-958.
 10. Grube RC, Radwanski ER, Jahn M. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155. – P. 873-887.
 11. Скляревська В.В. Методи визначення стійкості овочевих і баштанних культур проти основних хвороб і шкідників / В.В. Скляревська, В.М. Ковбасенко та ін. // *Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур* – Харків: Д.П. Харківська друкарня № 2. – 2001. – С. 114-188.
 12. Календарь Р. Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков / Р. Н. Календарь // *Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Международная конференция*. Киев, 1994. - Киев, 1994. - С. 25-26.
 13. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetics variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1979. – V.76. – P.5269-5273.
 14. Сиволап Ю. М. ДНК-технології в реєстрації і охороні прав на сорти рослин / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова // *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*. - 2005. - № 1. - С. 66-74.
 15. Сиволап Ю.М., Вовкодав В.В., Бальвінська М.С., Кожухова Н.Е., Солоденько А.С., Чоботар С.В. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів. Методичні рекомендації // *Південний біотехнологічний центр у рослинництві*. – Одеса, 2004. – 14 с.
 16. Tanksley et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes // *Genetics*. – 1992. – V.132, P.1141-1160.
 17. Gonzalo and van der Knaap. The Tomato-EXPIMP map was generated from an F2 population derived from a cross between *S. lycopersicum* accession Rio Grande and *S. pimpinellifolium* accession LA1589 // *Theor. Appl. Genet.* – 2008. – V.116, P. 647-656

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОТИПОВ ТОМАТА С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ

С.И. Кондратенко, Н.А. Баштан, С.А. Лисак, Г.И. Яровой

Институт овощеводства и бахчеводства НААН Украины

В результате проведенных исследований были оценены 5 пар прямых и обратных SSR праймеров (SSR14, SSR105, SSR111, SSR266, SSR295) относительно их способности детектировать как внутривидовой, так и межвидовой полиморфизм томата. Проведен анализ 9 форм томата с разной степенью устойчивости к возбудителю заболевания фузариозное увядание по 5 микросателитным локусам. В результате молекулярных исследований выявлены 19 алельных вариантов от 2 до 5 на один локус, что в среднем составляет 3,8 алеля на один микросателитный локус. Среди выборки микросателитных локусов, наиболее полиморфными оказались SSR14 и SSR105, которые содержали 5 аллелей на один локус. Созданы генетические паспорта двух генотипов-стандартов устойчивых к возбудителю заболевания фузариозное увядание – линии La 4026 и F₇ Orko

(*L. esculentum* (Mill.)), проведена генетическая идентификация четырех полукультурных форм томата (*L. esculentum* var. *pimpinellifolium* (Mill.) Brezh., *L. esculentum* var. *cerasiforme* (A. Gray) Brezh., *L. cheesmanii* var. *typicus* Riley, *L. esculentum* var. *racemigerum* (Lange)Brezh.), которые являются донорами абиотической и биотической устойчивости и перспективными формами для интрогрессии зародышевой плазмы в генофонд культурных форм томата.

Ключевые слова: томат, полиморфизм, геном, микросателлитные локусы, SSR праймеры, генетическая паспортизация.

ANALYSIS OF MICROSATELLITE LOCI POLIMORPHISM OF TOMATO GENOTYPES WITH DIFFERENT RESISTANCE LEVEL TO FUSARIUM WILT OF TOMATO

S.I. Kondratenko, N.A. Bashtan, S.A. Lisak, G.I. Yarovoj

Institute of vegetable and Melon NAAS of Ukraine

As result of conducted researches 5 pair of direct and reverse SSR primers (SSR14, SSR105, SSR111, SSR266, SSR295) were evaluated to detect both intraspecific and intraspecific polymorphism of tomato. An analysis of 9 forms tomato with different resistance to Fusarium of tomato were conducted using 5 microsatellite loci. As a results of molecular investigation 19 allelic variants (from 2 to 5 per locus) were determined that equal 3.8 alleles per microsatellite locus. Among researched microsatellite loci SSR14 and SSR105 had most polymorphic potential, because consist 5 alleles per locus. Genetic passports of two genotypes-standards (La4026 and F₇Orko lines (*L. esculentum* (Mill.))) of resistance to Fusarium wilt of tomato were created. Genetic identification of four semicultural form of tomato (*L. esculentum* var. *pimpinellifolium* (Mill.) Brezh., *L. esculentum* var. *cerasiforme* (A. Gray) Brezh., *L. cheesmanii* var. *typicus* Riley, *L. esculentum* var. *racemigerum* (Lange) Brezh.), which are donors of abiotic and biotic resistance and perspective forms for introgression of embryonic plasma into gene pool cultural form of tomato, were conducted.

Key words: tomato, polymorphism, genome, microsatellite loci, SSR primers, genetic passports.