

И. Г. Пугачева¹, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
доцент кафедры сельскохозяйственной биотехнологии,
экологии и радиологии

А. В. Французенок¹, аспирант

И. Е. Баева¹, заведующий учебно-научно-исследовательской
генетической лабораторией

Н. Ю. Лещина¹, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
доцент кафедры сельскохозяйственной биотехнологии,
экологии и радиологии

М. М. Добродькин¹, кандидат сельскохозяйственных наук,
заведующий кафедрой сельскохозяйственной биотехнологии,
экологии и радиологии

Н. А. Некрашевич², научный сотрудник

О. Г. Бабак², кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный
сотрудник

А. В. Кильчевский², академик НАН Беларуси, доктор биологических
наук, профессор, научный руководитель лаборатории экологической
генетики и биотехнологии

¹ УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Могилевская область

² ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ И ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА ПЛОДОВ В СЕЛЕКЦИИ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) ДЛЯ ОТКРЫТОГО ГРУНТА

РЕЗЮМЕ

*С применением методов молекулярного маркирования на этапах оценки расщепляющихся популяций и подбора пар для скрещиваний созданы линейный материал и гибриды F_1 томата для открытого грунта с комплексом аллелей, обеспечивающих повышенное накопление определенного состава каротиноидов (*tangerine*, *Beta*, *old gold crimson*) и антоцианов (*Ant1*), а также устойчивость к ряду вредителей (*Mi-1.2*), грибным (*I-2*, *Cf-4*, *Cf-9*, *Ph-3*) и вирусным (*Tm-2*, *Sw 5b*, *Sw 421*) инфекциям. Адаптированы методики и проведено ДНК-типирование аллельного состава генов качества плодов и устойчивости. Выделены линии и гибриды F_1 , содержащие аллели ценных признаков в сочетании с высокой урожайностью и скороспелостью.*

Ключевые слова: томат; селекция; ДНК-маркеры; устойчивость к болезням; качество плодов; урожайность; открытый грунт.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях глобального дефицита энергоресурсов актуально создание сортов и гибридов томата для возделывания в открытом грунте. Такая технология не требует расходования энергии для создания микроклимата, использования дорогого оборудования и значительных трудовых затрат по сравнению с технологиями защищенного грунта. При этом условия открытого грунта предполагают действие различных абиотических стрессов и наличие патогенных организмов (вирусы, грибные инфекции, нематода и др.), которые могут вызывать значительные потери урожая. Классические селекционные методы позволяют отбирать наиболее устойчивые формы на естественных или искусственно созданных стрессовых фонах. Работа в естественных условиях осложняется тем, что оценку в поле можно проводить лишь раз в год, ее успешность в значительной степени зависит от фактически сложившихся условий для развития болезней и размножения вредителей [1]. Недостатками лабораторного метода оценки являются необходимость сохранения и поддержания вирулентности возбудителя, контроля за равномерностью нанесения инокулюма, определением оптимальной инфекционной нагрузки, способствующей наибольшему числу поражений, созданием благоприятных условий среды (температура, влажность, освещенность) для развития патогена, а также неполное соответствие результатов естественным условиям заражения [2].

Альтернативным подходом для целенаправленного отбора растений с желательными признаками является использование генетических маркеров, сцепленных с генами, контролирующими интересующий признак (маркер-сопутствующий отбор, MAS). Этот метод позволяет избежать недостатков анализа по морфологическим характеристикам, таких как сильное влияние внешних факторов среды и проявление анализируемых свойств на поздних стадиях онтогенеза, тем самым увеличить его эффективность и уменьшить количество генотипов для фенотипического отбора [3, 4].

В настоящее время разработано большое количество ДНК-маркеров, позволяющих выявлять селекционно значимые признаки у томата [5–9]. Важная роль в практической селекции томата принадлежит генам, обуславливающим устойчивость к болезням. Успешно применяются известные ДНК-маркеры для идентификации аллелей генов устойчивости к вирусу бронзовости томата (*Sw 5*) [10], фузариозному увяданию (*I*) [5, 8, 11], вирусу мозаики томата (*Tm-2*) [12], мелойдогинозу (*Mi*) [13], кладоспориозу (серия генов – *Cf*) [14–16], фитофторозу (серия генов – *Ph*) [17, 18].

Одним из современных направлений селекции на качество плодов томата является создание форм с высоким содержанием каротиноидов и флавоноидов (в частности антоцианов). Сочетание в продуктах двух данных групп пигментов позволяет повысить антиоксидантные свойства плодов, что важно

при их использовании в качестве продуктов для функционального питания. Кроме того, повышенное количество антоцианов в растениях увеличивает их устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам. Для создания форм с различным сочетанием каротиноидных и флавоноидных пигментов применяется ряд маркеров к структурным генам их биосинтеза (*t*, *B*, *og^c* и др.), а также генам, регулирующим накопление пигментов (*hp1*, *hp2^{dg}*, *U*, *Ant1*, *Y* и др.) [19–21].

Среди всех молекулярно-генетических подходов в данном случае целесообразно использование маркеров, разработанных на основе выявленных полиморфизмов последовательностей конкретных генов (SCAR, CAPS и др.) для выявления гомозиготного и гетерозиготного состояния гена.

Целью наших исследований является использование SCAR и CAPS-маркеров для отбора образцов томата с генетической детерминацией устойчивости к наиболее вредоносным болезням и пигментного состава плодов, а также создание на их основе новых гибридов и сортов томата для открытого грунта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследований использовали 30 гибридных комбинаций, 11 родительских форм и 80 линий томата, созданных в результате предварительных экспериментов с применением методов микрогаметофитного отбора и молекулярного маркирования на этапах получения и оценки расщепляющихся популяций, подбора пар для скрещиваний, с учетом проявления морфологических признаков растений, урожайности и скороспелости.

Молекулярно-генетический анализ выполняли в учебно-научно-исследовательской генетической лаборатории Белорусской государственной сельскохозяйственной академии и в лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов для выделения ДНК из растительного материала «Нуклеосорб» в комплектации С компании «Праймтех» согласно протоколу производителя. Для ДНК-типирования аллелей качества плодов и устойчивости к болезням использовали методические указания, разработанные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [22–24]. ПЦР осуществляли с использованием молекулярных маркеров, указанных в таблице 1.

Анализ продуктов амплификации проводили в агарозном геле различной плотности (1,5–3 %), а также в акриламидном геле на генетическом анализаторе *Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems)*. Результаты анализа продуктов амплификации документировали с помощью системы *E-Box-CX5.TS (Vilber Lourmat)*. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя маркеры молекулярного веса (*DNA ladder Evrogen*). Полевые эксперименты выполняли на опытном поле кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии БГСХА в 2021–2022 гг. Почва опытного участка дерново-подзолистая, окультуренная, среднесуглинистая, развивающаяся на лессовидном суглинке. Повторность опыта 3-кратная. Схема

Таблица 1 – Наименование и характеристика маркеров, используемых для ДНК-типирования аллелей устойчивости к болезням и качества плодов

Ген	Литературный источник	Тип и название маркера	Примеры
<i>tangerine (t)</i>	Eckardt N. A., 2002	SCAR, tF/tR	F: ACCAATGCTCCGAATGA R: TGGGCTCCCTGGAAAGT
<i>Anti1 Anthocyanin1</i>	Sapir M. с соавт., 2008	CAPS, Anti1F/Anti1R	F: GAAGGACAGCTAACGATGTG R: GTTGCATGGGKGTAAATTAAG
<i>B (Beta carotene)</i>	Labate J. A. с соавт., 2007	SCAR, ВpromF/ВpromR	F: TATGTTTGTAGTGTGG R: GAAAATTTTCATGTGCC
<i>og^f</i>	Ronep G. с соавт., 2000	SCAR, OgcF/OgcR	F: TAGNLCNATTTTCCAAACA R: AAGACTCTGGCTTTGATG
<i>Ph-3</i>	Panthee D. R. с соавт., 2015	SCAR, NC-6678F/ NC-6678R	F: CCTTAATGCAATAGGCAAAAT R: ATTTGAATGTTCTGGATTGG
<i>I-2</i>	Davis R. M. с соавт., 1988	SCAR, I-2/5F/I-2/5R	F: CAAGGAACTCGGTCTGTCTG R: ATGAGCAATTTGTGGCCAGT
<i>Cf-4</i>	Parniske M. с соавт., 1997; Takken F. L. с соавт., 1998	SCAR, Cf4-158F/ Cf4-974R	F: TTACGACAGAAACCTTTCTTGG R: AGTCCGCTTACGTTGGATGG
<i>Cf-9</i>	Van der Horn R. A. с соавт., 2001	SCAR, CS5/DS1/CS1	CS5: TCCAACTTACAATCCCCTC DS1: GAGAGCTCAACCTTACGAA CS1: GCCGTTCAAGTTGGGTGT
<i>Mi-1.2</i>	Garcia B. E. с соавт., 2007	SCAR, Mi23F/Mi23R	F: TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTG R: GCATACATATGGCTTGTACCC
<i>Sw 5</i>	Shi A. с соавт., 2011	SCAR, Sw5-f2/Sw5-r2	F: GGAACCTGTAACCTTGACTG R: AGCTCTCATCCATTTTCCG
	Nascimento I. R. D. с соавт., 2009	SCAR, Sw421-1/Sw421-2	F: GACTTGTGGCATAAGTTCC R: GCCCACCCCGAAGTAAATCC
<i>Tm-2²</i>	Shi A. с соавт., 2011	CAPS, Tm2RS-β/Tm2RS-γ3	F: TGGAGGGGAATATTTGTGGA R: ACTTCAGACAACCCATTCCG

посадки 70×30 см. В качестве стандартов использовали сорт Ирма и гибрид F₁ Адапт. Сборы урожая проводили через 7 дней. Для оценки достоверности различий использовали метод однофакторного дисперсионного анализа [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выявлении аллелей генов устойчивости к болезням и аллелей генов качества плодов проводилась адаптация состава реакционной смеси и режимов амплификации, рекомендованных авторами литературных источников (табл. 1). При необходимости модифицировали концентрацию *dNTP*, *MgCl₂*, *Tag* полимеразы, температуру отжига. С использованием адаптированных составов ПЦР-смеси и условий амплификации выполнен ДНК-анализ исследуемого материала на наличие аллелей качества плодов (*t*, *Ant1*, *B*, *og^c*) и устойчивости к фитофторозу (*Ph-3*), фузариозному увяданию (*I-2*), кладоспориозу (*Cf-4*, *Cf-9*), мелойдогинозу (*Mi-1.2*), вирусам бронзовости (*Sw 5b*, *Sw 421*) и мозаики томата (*Tm-2²*) (примеры результатов представлены на рис. 1 и 2 соответственно).

При использовании SCAR-маркера к аллелю *t* гена каротиноидной изомеразы (рис. 1А) получены ампликоны размером 508 п. н., свидетельствующие о наличии мутантного аллеля *tangerine*, и 856 п. н. – наличии нормального аллеля [19]. У Линии 19-612, Линии 217, Линии 20-1449, Линии 20-1265 и гибрида Линия 19-612 × Линия 217 выявлено наличие мутантного аллеля в гомозиготном состоянии. В гетерозиготном состоянии данный аллель обнаружен у гибридов с Линией 19-612 и Линией 217.

В результате ПЦР с праймерами к CAPS-маркеру *Ant1* образуется фрагмент длиной 478 п. н. После рестрикции данного фрагмента эндонуклеазой *NcoI* у растений дикого типа образуются два фрагмента размером 271 и 207 п. н., а у растений с *Aft*-фенотипом не происходит уменьшение длины фрагмента (рис. 1Б) [21]. Среди изученных нами образцов выделено пять линий, характеризующихся наличием аллеля гена *Ant1* в доминантном гомозиготном состоянии, и две линии – гетерозиготы с фрагментами размером 271 и 207 п. н. в сочетании с 478 п. н.

Для определения доминантного аллеля *B* (*Beta carotene*) гена хромoplast-специфической ликопин-β-циклазы (CYCB) была проведена амплификация с использованием SCAR-маркера *WpromF/WpromR* [20, 22]. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 3 %-м агарозном геле в течение 4–5 часов. Удалось дифференцировать фрагменты 143 или 152 п. н. – рецессивный и доминантный аллели соответственно (рис. 1В). Доминантный аллель *B* обнаружен у Линии 20-1252, Линии 20-1257/1, Линии 20-1259, Линии 20-1451, Линии 20-1526 и Линии 21-785.

Для выявления ценного аллеля *og^c* гена CYCB использовали SCAR-маркер *OgcF/OgcR* [26]. Полученные с помощью генетического анализатора результаты позволили достоверно выявить наличие мутантного *og^c* (140 п. н.) и дикого (141 п. н.) аллелей (рис. 1Г). Установлено, что в тестируемой коллекции Линия 19-612, Линия 221, Линия 20-1457, Линия 20-1433, Линия 20-1247,

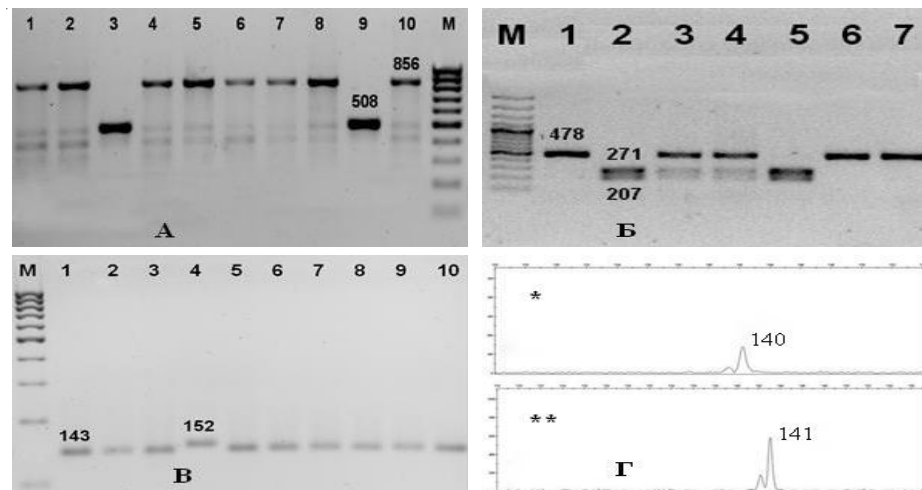


Рисунок 1 – Фрагменты продуктов амплификации/рестрикции ДНК-образцов: М – маркер молекулярного веса (1500 bp); А – tF/tR: 1 – Линия 16-8; 2 – Линия 16-57; 3 – Линия 19-612; 4 – Линия 19-645; 5 – Линия 19-652; 6 – Ирма; 7 – Zafar; 8 – Желтый жемчуг; 9 – Линия 217; 10 – Линия 221; Б – Ant1F/Ant1R: 1 – Линия 20-201 ИГЦ; 2 – Линия 20-1525; 3 – Линия 20-24-1 ИГЦ гетерозигота; 4 – Линия 20-Х ИГЦ гетерозигота; 5 – Линия 20-1510; 6 – Линия 20-25-1 ИГЦ; 7 – Линия 20-166-3 ИГЦ; В – BpromF/BpromR: 1 – Линия 20-1361; 2 – Линия 20-1365; 3 – Линия 21-974; 4 – Линия 20-1451; 5 – Линия 19-621; 6 – Линия 19-628; 7 – Линия 19-635; 8 – Линия 19-645; 9 – Линия 19-624; 10 – Ирма × Линия 19-612; Г – OgcF/OgcR: * – Линия 19-612; ** – Линия 19-645

Линия 20-1262, Линия 20-1266, Линия 20-1274 и Линия 20-1293 содержат мутантный аллель *ogc*.

На рис. 2А показана часть результатов амплификации с маркером NC-6678 (ген *Ph-3*): получены фрагменты размером 900 п. н., свидетельствующие о восприимчивости к фитофторе, и 600 п. н., свидетельствующие о генетической детерминации устойчивости [18, 27]. С помощью данного маркера выявлены источники аллеля устойчивости к фитофторозу в гомозиготном состоянии: Желтый жемчуг, Линия 20-1272/1, Линия 20-1272/2, Линия 20-1272/3, Линия 20-1272/4, Линия 20-1477, Линия 20-1476, Линия 20-1250, Линия 20-1252, Линия 21-974, Линия 19-621. В гетерозиготном состоянии данный ген выявлен у Линии 20-1272/5, Линии 20-1272/5-1, Линии 20-1457, Линии 20-1432, Линии 20-1306, гибридов с сортом Желтый жемчуг в качестве отцовского компонента скрещивания, а также у гибрида Адапт F₁.

Для выявления гена устойчивости к фузариозному увяданию использовался функциональный маркер I-2/5. Ожидались фрагменты размером 566 п. н. (аллель *I-2*) и 633 п. н. (аллель *I-2C*), свидетельствующие о наличии аллеля устойчивости, а также фрагмент размером 693 п. н., иногда амплифицирующийся в паре с фрагментом 760 п. н., определяющий аллель восприимчивости к расам 1 и 2 [7, 11]. Были выявлены разные аллельные варианты гена *I-2* (рис. 2Б).

При изучении генетической детерминации устойчивости образцов томата к кладоспориозу использовалось два SCAR-маркера Cf4/4A [15, 28] и Cf9 [29].

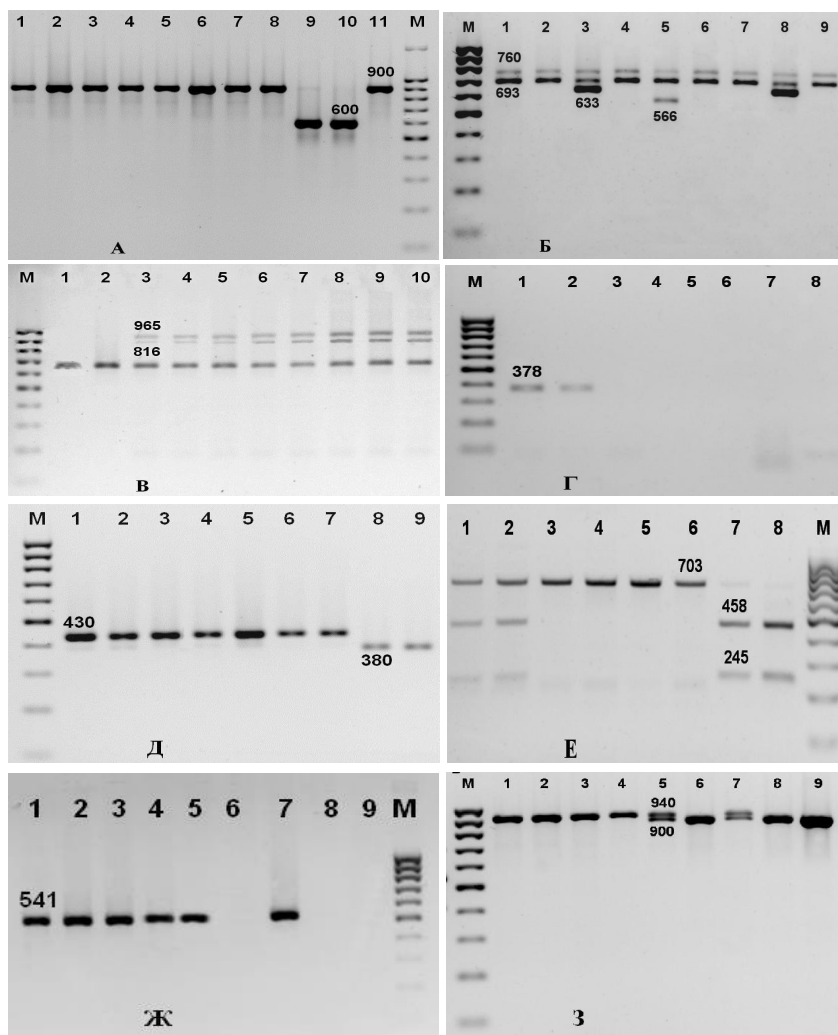


Рисунок 2 – Фрагменты продуктов амплификации/рестрикции ДНК-образцов: М – маркер молекулярного веса (1500 bp); А – NC-6678F/NC-6678R: 1, 2 – Линия 19-645; 3, 4 – Линия 19-652; 5, 6 – Ирма; 7, 8 – Zafar; 9, 10 – Желтый жемчуг; 11 – Линия 217; Б – I-2/5F/I-2/5R: 1 – Линия 16-57 × Ирма; 2 – Линия 16-57 × Линия 217; 3 – Линия 16-57 × Линия 221; 4 – Линия 19-612 × Zafar; 5 – Линия 19-612 × Желтый жемчуг; 6 – Линия 19-612 × Ирма; 7 – Линия 19-612 × Линия 217; 8 – Линия 19-612 × Линия 221; 9 – Линия 19-645 × Zafar; В – Cf4-158F/Cf4-974R: 1 – Линия 20-1272/3; 2 – Линия 20-1272/4; 3 – Линия 20-1272/5; 4 – Линия 20-1272/6; 5 – Линия 20-1272/5-1; 6 – Линия 16-8 × Zafar; 7 – Линия 16-8 × Желтый жемчуг; 8 – Линия 16-8 × Ирма; 9 – Линия 16-8 × Линия 217; 10 – Линия 16-8 × Линия 221; Г – CS5/DS1/CS1: 1, 2 – Линия 16-8; 3 – Линия 16-57; 4 – Линия 19-612; 5 – Линия 19-645; 6 – Линия 19-652; 7 – Ирма; 8 – Zafar; Д – Mi23F/Mi23R: 1 – Линия 19-652; 2 – Ирма; 3 – Zafar; 4 – Желтый жемчуг; 5 – Линия 217; 6 – Линия 221; 7 – Линия № 4; 8 – Линия 20-1272/1; 9 – Линия 20-1272/2; Е – Tm2RS-f3/ Tm2RS-r3 (HpaI): 1, 2 – Линия № 4 × Zafar; 3, 4 – Zafar; 5, 6 – Желтый жемчуг; 7, 8 – Линия № 4; Ж – Sw5-f2/Sw5-r2 и З – Sw421-1/Sw421-2: 1 – Линия 20-1272/1; 2 – Линия 20-1272/2; 3 – Линия 20-1272/3; 4 – Линия 20-1272/4; 5 – Линия 20-1272/5; 6 – Линия 20-1272/6; 7 – Линия 20-1272/5-1; 8 – Линия 20-1247; 9 – Линия 20-1250

При проведении амплификации с праймером Cf4-158F/Cf4-974R синтезируются фрагменты размером 816 п. н. (аллель Cf-4) и 965 п. н. (аллель Cf-4A), которые свидетельствуют о наличии устойчивости (рис. 2B). Аллели устойчивости выявлены у сорта Желтый жемчуг, Линии 16-8 и у гибридов с ними, а также у Линии 20-1272/1, Линии 20-1272/5, Линии 20-1272/6, Линии 20-1272/5-1, Линии 20-1433 и Линии 20-1251.

У гена Cf-9 о наличии аллелей устойчивости свидетельствуют фрагменты размером 378 п. н. (аллель Cf-9) и 507 п. н. (аллель 9DC). Аллель устойчивости Cf-9 обнаружен у Линии 16-8, сорта Желтый жемчуг и у гибридов с участием этих линий (рис. 2Г).

При амплификации с функциональным SCAR-маркером к гену Mi-1.2 (рис. 2Д) ожидался фрагмент размером 430 п. н., свидетельствующий о наличии аллеля восприимчивости, и фрагмент размером 380 п. н., свидетельствующий о наличии доминантного аллеля локуса Mi-1.2 [13]. У Линии 20-1525 обнаружено два фрагмента: 380 и 430 п. н., что указывает на гетерозиготное состояние исследуемого гена. После электрофоретического анализа у Линии 20-1272/1, Линии 20-1272/2, Линии 20-1272/3, Линии 20-1272/4, Линии 20-1272/5, Линии 20-1272/6, Линии 20-1272/5-1, Линии 20-1457 и Линии 20-1432 выявлен аллель устойчивости в доминантном гомозиготном состоянии.

Использование CAPS-маркера Tm2RS-f3/Tm2RS-r3 позволяет амплифицировать фрагмент ДНК размером 703 п. н. У образцов, несущих аллели устойчивости к вирусу мозаики томата (Tm-2 или Tm-2²), продукт амплификации разрезается эндонуклеазами HpaI (458 и 245 п. н.) и BsiHKai (358 и 353 п. н.), у восприимчивых образцов рестрикция не проходит [12]. У Линии № 4 и гибридов с ней после рестрикции с эндонуклеазой HpaI образовывались два фрагмента 458 и 245 п. н. (рис. 2Е). Однако фрагмент 703 п. н. в данных образцах не разрезался эндонуклеазой BsiHKai, что свидетельствует о наличии в геноме аллелей Tm-2². У остальных образцов фрагмент 703 п. н. не разрезался ни одной из эндонуклеаз, поэтому они не имеют генетической детерминанты устойчивости к вирусу мозаики томатов. Их аллельный состав – tm-2/tm-2 (рецессивная гомозигота).

Идентификацию гена Sw 5 осуществляли с использованием двух маркеров: Sw-5b и Sw-421 [10, 30]. У образцов, показавших наличие специфического фрагмента длиной 541 п. н. при амплификации с маркером Sw-5b (рис. 2Ж), отмечалось также наличие фрагмента размером 940 п. н. (отдельно или в сочетании с фрагментом 900 п. н.) в результате амплификации с маркером Sw-421 (рис. 2З). Аллель устойчивости (940 п. н.) в гомозиготном состоянии обнаружен у Линии 20-1272/1, Линии 20-1272/2, Линии 20-1272/3, Линии 20-1272/4; в гетерозиготном состоянии – у Линии 20-1272/5, Линии 20-1272/5-1, Линии 20-1457, Линии 20-1432 и Линии 20-1306. Следовательно, оба маркера позволяют идентифицировать образцы с аллелями устойчивости к вирусу бронзовости, маркер Sw-421 дифференцирует их на гомозиготные и гетерозиготные.

Таким образом, выявлен ряд ценных образцов, обладающих аллелями генов устойчивости к болезням и генами качества плодов среди родительских

компонентов скрещивания, гибридов первого поколения, полученных с их участием (табл. 2), а также среди селекционных линий (табл. 3). Учитывая, что в геноме томата насчитывается около 35 000 генов, к настоящему времени известна нуклеотидная последовательность и локализация более 1 300 генов, полученная нами информация о генетической детерминации некоторых признаков в изучаемых образцах позволяет оценить лишь отдельные характеристики, проявление которых обусловлено небольшим количеством локусов. Приоритетным способом оценки достоинств изучаемых образцов остаются классические полевые испытания, в частности по реализованной урожайности.

Таблица 2 – Наличие ценных аллелей и товарная урожайность гибридов F₁

Образец	Ценные аллели	Товарная урожайность, кг/м ²		
		2021 г.	2022 г.	среднее
Адапт F ₁ контроль	<i>b*</i> , <i>Ph-3</i>	3,92	4,09	4,01
Линия 16-8	<i>b</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	2,69	3,53	3,11
Линия 16-57	<i>b</i>	5,21	4,46	4,84
Линия 19-612	<i>t</i> , <i>og^c</i>	6,74	5,03	5,89
Линия 19-645	<i>b</i>	3,62	3,60	3,61
Линия 19-652	<i>b</i>	2,18	3,42	2,80
Zafar	<i>b</i>	3,69	4,33	4,01
Желтый жемчуг	<i>b</i> , <i>Ph-3</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	2,12	1,61	1,87
Ирма	<i>b</i>	3,96	4,06	4,01
Линия 217	<i>t</i> , <i>b</i>	3,18	2,82	3,00
Линия 221	<i>og^c</i> , <i>I-2</i>	5,13	5,84	5,49
Линия № 4	<i>b</i> , <i>Tm-2²</i>	3,03	2,59	2,81
Линия 16-8 × Zafar	<i>b</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	5,98	3,92	4,95
Линия 16-8 × Желтый жемчуг	<i>b</i> , <i>Ph-3</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	5,84	5,37	5,61
Линия 16-8 × Ирма	<i>b</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	3,60	3,44	3,52
Линия 16-8 × Линия 217	<i>t</i> , <i>b</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	4,97	3,66	4,32
Линия 16-8 × Линия 221	<i>b</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	4,44	5,53	4,99
Линия 16-57 × Zafar	<i>b</i>	5,37	4,69	5,03
Линия 16-57 × Желтый жемчуг	<i>b</i> , <i>Ph-3</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	6,50	5,76	6,13
Линия 16-57 × Ирма	<i>b</i>	7,84	6,35	7,10
Линия 16-57 × Линия 217	<i>t</i> , <i>b</i>	4,83	3,72	4,28
Линия 16-57 × Линия 221	<i>b</i> , <i>I-2</i>	6,33	6,29	6,31
Линия 19-612 × Zafar	<i>t</i> , <i>b</i>	7,25	4,14	5,70
Линия 19-612 × Желтый жемчуг	<i>t</i> , <i>b</i> , <i>Ph-3</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	8,70	6,47	7,59
Линия 19-612 × Ирма	<i>t</i> , <i>b</i>	6,57	3,94	5,26
Линия 19-612 × Линия 217	<i>t</i> , <i>b</i>	4,96	3,00	3,98
Линия 19-612 × Линия 221	<i>t</i> , <i>b</i> , <i>I-2</i>	7,41	6,00	6,71
Линия 19-645 × Zafar	<i>b</i>	5,41	3,76	4,59
Линия 19-645 × Желтый жемчуг	<i>b</i> , <i>Ph-3</i> , <i>I-2</i> , <i>Cf-4</i> , <i>Cf-9</i>	5,20	5,39	5,30
Линия 19-645 × Ирма	<i>b</i>	3,79	4,09	3,94
Линия 19-645 × Линия 217	<i>t</i> , <i>b</i>	4,23	2,88	3,56
Линия 19-645 × Линия 221	<i>b</i> , <i>I-2</i>	4,92	4,12	4,52
Линия 19-652 × Zafar	<i>b</i>	4,33	4,39	4,36

Образец	Ценные аллели	Товарная урожайность, кг/м ²		
		2021 г.	2022 г.	среднее
Линия 19-652 × Желтый жемчуг	<i>b, Ph-3, I-2, Cf-4, Cf-9</i>	6,39	4,69	5,54
Линия 19-652 × Ирма	<i>b</i>	4,89	3,67	4,28
Линия 19-652 × Линия 217	<i>t, b</i>	6,18	3,65	4,92
Линия 19-652 × Линия 221	<i>b, I-2</i>	4,73	5,04	4,89
Линия № 4 × Zafar	<i>b, Tm-2²</i>	4,52	3,19	3,86
Линия № 4 × Желтый жемчуг	<i>b, Ph-3, I-2, Cf-4Cf-9, Tm-2²</i>	4,92	5,99	5,46
Линия № 4 × Ирма	<i>b, Tm-2²</i>	4,18	3,03	3,61
Линия № 4 × Линия 217	<i>t, b, Tm-2²</i>	2,66	2,02	2,34
Линия № 4 × Линия 221	<i>b, I-2, Tm-2², I-2</i>	4,99	5,31	5,15
НСР ₀₅		2,049	1,169	

*b** – аллель СУСВ из *S. lycopersicum*.

Таблица 3 – Наличие ценных аллелей и товарная урожайность линий

Образец	Ценные аллели	Товарная урожайность, кг/м ²		
		2021 г.	2022 г.	среднее
Ирма контроль	<i>b*</i>	3,96	4,06	4,01
Линия 20-1477	<i>b, Ph-3</i>	4,64	5,47	5,06
Линия 20-1476	<i>b, Ph-3</i>	3,70	4,51	4,10
Линия 20-1449	<i>t, b</i>	5,30	3,93	4,61
Линия 20-1451	<i>B**</i>	4,23	4,23	4,23
Линия 20-1457	<i>og^c, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, Mi-1.2</i>	5,98	4,25	5,12
Линия 20-1432	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2</i>	3,35	4,16	3,76
Линия 20-1433	<i>og^c, Cf-4</i>	7,58	5,98	6,78
Линия 20-1510	<i>b, I-2</i>	3,71	3,89	3,80
Линия 20-1526	<i>B</i>	4,99	4,69	4,84
Линия 20-1247	<i>og^c</i>	5,89	5,95	5,92
Линия 20-1250	<i>b, Ph-3</i>	3,50	3,27	3,39
Линия 20-1252	<i>B**, Ph-3</i>	3,20	3,95	3,58
Линия 20-1257/1	<i>B</i>	8,46	7,12	7,79
Линия 20-1251	<i>b, Cf-4</i>	5,86	4,81	5,34
Линия 20-1259	<i>B</i>	7,19	6,13	6,66
Линия 20-1263	<i>b, I-2</i>	6,29	3,97	5,13
Линия 20-1264	<i>b, I-2</i>	7,18	4,78	5,98
Линия 20-1265	<i>t, b</i>	6,04	5,09	5,56
Линия 20-1266	<i>og^c, I-2</i>	5,97	3,76	4,87
Линия 20-1268	<i>b, Ph-3</i>	5,46	4,91	5,19
Линия 20-1274	<i>og^c, I-2</i>	6,14	5,55	5,84
Линия 20-1293	<i>og^c</i>	8,34	7,14	7,74
Линия 20-1306	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2</i>	7,10	5,59	6,34
Линия 20-1347	<i>b, I-2</i>	6,11	4,97	5,54
Линия 20-1354	<i>b, I-2</i>	4,70	3,47	4,09

Название образца	Ценные аллели	Товарная урожайность, кг/м ²		
		2021 г.	2022 г.	среднее
Линия 20-1359	<i>b, I-2</i>	5,18	5,54	5,36
Линия 20-1369	<i>b, Ph-3</i>	4,85	5,13	4,99
Линия 20-201 ИГЦ	<i>b, Ant</i>	4,67	4,79	4,73
Линия 20-24-1 ИГЦ	<i>b, Ant</i>	1,98	2,16	2,07
Линия 20-Х ИГЦ	<i>b, Ant</i>	3,08	2,84	2,96
Линия 20-25-1 ИГЦ	<i>b, Ant</i>	2,81	2,66	2,73
Линия 20-166-ЗИГЦ	<i>t, b, Ant</i>	8,88	6,22	7,55
Линия 20-1272/1	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2, Cf-4</i>	3,82	3,23	3,52
Линия 20-1272/2	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2</i>	5,26	5,06	5,16
Линия 20-1272/3	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2</i>	4,16	4,27	4,21
Линия 20-1272/4	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2</i>	3,22	3,11	3,17
Линия 20-1272/5	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2, Cf-4</i>	3,39	3,02	3,21
Линия 20-1272/6	<i>b, I-2, Mi-1.2, Cf-4</i>	3,80	4,33	4,07
Линия 20-1272/5-1	<i>b, Ph-3, Sw 5b, Sw 421, I-2, Mi-1.2, Cf-4</i>	3,04	2,88	2,96
Линия 21-974	<i>b, Ph-3</i>	3,72	3,35	3,53
НСР ₀₅		2,410	1,823	

*b** – аллель *СУСВ* из *S. lycopersicum*; *B*** – аллель *СУСВ* из *S. pennellii*.

По результатам двухлетней полевой оценки урожайности выделены гибриды (Линия 16-8 × Zafar, Линия 16-8 × Желтый жемчуг, Линия 16-57 × Желтый жемчуг, Линия 19-612 × Желтый жемчуг, Линия 19-612 × Линия 221, Линия 19-645 × Желтый жемчуг, Линия № 4 × Желтый жемчуг, Линия № 4 × Линия 221) с высокими значениями товарной урожайности (4,95–7,59 кг/м²) и наличием аллелей ценных признаков.

Выделены образцы с плодами различной окраски, которая зависит от пигментного состава (рис. 3).

По комплексу признаков урожайности в сочетании с генетической детерминацией аллелей устойчивости к болезням и/или качества плода выделены перспективные линии (Линия 20-1433, Линия 20-1247, Линия 20-1257/1, Линия 20-1251, Линия 20-1259, Линия 20-1264, Линия 20-1265, Линия 20-1274, Линия 20-1293, Линия 20-1306, Линия 20-1347, Линия 20-1359, Линия 20-166-ЗИГЦ), сформировавшие товарную урожайность 5,06–7,79 кг/м² в среднем за два года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптированы методики ДНК-типирования образцов томата по аллелям генов качества плодов, определяющих повышенное накопление каротиноидов и антоцианов, а также генов устойчивости к бронзовости, кладоспориозу,



Линия 20-201 ИГЦ (*b, Ant*)

Линия 20-1526 (*B*)

Линия 20-1457 (*og^c*)

Рисунок 3 – Образцы томата с различным сочетанием каротиноидных и флавоноидных пигментов

фитофторозу, мелойдогинозу, фузариозу путем оптимизации концентраций *dNTP*, полимеразы, ионов магния в составе реакционной смеси, а также температуры отжига при проведении амплификации. Установлена высокая эффективность выявления гомозиготных и гетерозиготных форм. Выделены образцы, содержащие аллели ценных признаков.

В результате испытания по комплексу хозяйственно ценных признаков выявлены гибриды F_1 и линии, сочетающие высокую урожайность с генетической детерминацией аллелей устойчивости к болезням и/или содержания каротиноидов и антоцианов в плодах. Созданный новый линейный материал можно использовать с целью получения гибридов томата для открытого грунта с комплексом ценных аллелей.

Список использованных источников

1. Иммуитет растений / В. А. Шкаликков [и др.] ; под ред. проф. В. А. Шкаликкова. – М. : Колосс, 2005. – С. 117–121.
2. Dixon, R. A. Natural products and plant disease resistance / R. A. Dixon // Nature. – 2001. – V. 411, № 6839. – P. 843–847.
3. More on the efficiency of marker-assisted selection / F. Hospital [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1997. – Vol. 95. – P. 1181–1189.
4. Standardization and application of microsatellite markers for variety identification in tomato and wheat / B. Vosman [et al.] // Acta Hort. – 2001. – Vol. 546. – P. 307–316.
5. Карлов, Г. И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23; 03.00.15 / Г. И. Карлов ; Московская с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева. – М., 2009. – 50 с.
6. Кузёменский, А. В. Селекционно-генетические исследования мутантных форм томата / А. В. Кузёменский ; под ред. Т. К. Горовой. – Харьков, 2004. – 392 с.
7. Молекулярные технологии в селекции томата (*Solanum lycopersicum* L.) / А. В. Кильчевский [и др.] // Генетические основы селекции растений : в 4 т. / Нац.

акад. наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии ; науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск : Беларус. навука, 2014. – Т. 4: Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. – Гл. 11. – С. 290–344.

8. Фесенко, И. А. Создание ДНК-маркера гена устойчивости томата к фузариозному увяданию / И. А. Фесенко, М. Ю. Куклев, Г. И. Карлов // Изв. Тимирязевской с.-х. акад. – 2007. – Вып. 1. – С. 66–72.

9. Szczechura, W. Tomato molecular markers / W. Szczechura, M. Staniaszek, H. Habdas // Vegetable crops research bulletin. – 2011. – Vol. 74. – P. 5–23.

10. Identification of molecular markers for Sw-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance / A. Shi [et al.] // Am. J. Biotechnol. Mol. Sci. – 2011. – P. 8–16.

11. Shuan-CanYu. A co-dominant molecular marker of fusarium wilt resistance gene I-2 derived from gene sequence in tomato / Shuan-CanYu, ZOU Yan-Min1, Yan-Min // Hereditas (Beijing). – 2008. – Vol. 30, № 7. – P. 926–932.

12. Molecular Markers for Tm2 Alleles of Tomato Mosaic Virus Resistance in Tomato / A. Shi [et al.] // Am. J. of Plant Science. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 180–189.

13. A co-dominant SCAR marker, Mi23, for detection of the Mi-1.2 gene for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm [Electronic resource] / B. E. Garcia [et al.]. – Mode of access: www.plantpath.wisc.edu. – Date of access: 22.10.2022.

14. Создание молекулярных маркеров генов устойчивости к кладоспориозу томата / З. Е. Грушецкая [и др.] // Изв. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2007. – № 3. – С. 23–27.

15. Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the Cf-4 locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5 / F. L. Takken [et al.] // Plant J. – 1998 – Vol. 14 (4). – P. 401–411.

16. Development of molecular markers linked to *Cladosporium fulvum* resistant gene Cf-6 in tomato by RAPD and SSR methods / A. Wang [et al.] // HortScience. – 2007. – Vol. 42, № 1. – P. 11–15.

17. Genetic mapping of Ph-2, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato / P. Moreau [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1998. – Vol. 11. – P. 259–269.

18. Molecular markers associated with Ph-3 gene conferring late blight resistance in tomato / D. R. Panthee [et al.] // American Journal of Plant Sciences. – 2015. – Vol. 6, № 13. – P. 2144–2150.

19. Eckardt, N. A. Tangerine dreams: cloning of carotenoid isomerase from *Arabidopsis* and tomato / N. A. Eckardt // Plant cell. – 2002. – Vol. 14. – P. 289–292.

20. Tomato / Genome mapping and molecular breeding in plants / J. A. Labate [et al.] // Vegetables. – 2007. – Vol. 5. – P. 1–126.

21. Molecular aspects of Anthocyanin fruit tomato in relation to high pigment-1 / M. Sapir [et al.] // Journal of Heredity. – 2008 May-Jun. – Vol. 99 (3). – P. 292–303.

22. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата : метод. рекомендации / А. В. Кильчевский [и др.] ; Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск : Право и экономика, 2016. – 41 с.

23. Создание гибридов F_1 томата черри на стерильной основе с использованием методов классической и маркер-сопутствующей селекции /

О. Г. Бабак [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред) [и др.]. – Минск : Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2020. – Т. 29. – С. 5–17.

24. Genetic bases of tomato marker-assisted selection in Belarus / O. G. Babak [et al.] // Eurobiotech. J. – 2018. – Vol. 2, № 2. – P. 128–135. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2018-0017>.

25. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – М. : Агропромиздат, 1985. – С. 208–268.

26. An alternative pathway to b-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato / G. Ronen [et al.] // PNAS. – 2000. – Vol. 97 (20). – P. 11102–11107.

27. Оценка и применение молекулярных маркеров в селекции на устойчивость томата (*Solanum lycopersicum* L.) к фитофторе (*Phytophthora infestans*) / О. Г. Бабак [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск : Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2021. – Т. 31. – С. 22–30.

28. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato / M. Parniske [et al.] // Cell. – 1997. – Vol. 91 (6). – P. 821–832.

29. Intragenic recombination generated two distinct Cf genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium* / R. A. Van der Horn [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2001. – Vol. 98 (18). – P. 10493–10498.

30. Marker assisted identification of Tosspovirus resistant tomato genotypes in segregating progenies / I. R. D. Nascimento [et al.] // Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). – 2009. – Vol. 66. – № 3. – P. 298–303.

Поступила в редакцию 28 ноября 2022 г.

**I. G. Pugacheva, A. V. Frantsuzenok, I. E. Baeva, N. Yu. Leschina,
M. M. Dobrodin, N. A. Nekrashevich, O. G. Babak, A. V. Kilchevskiy**

**USING MOLECULAR MARKER TECHNIQUES FOR DISEASE
RESISTANCE TRAITS AND PIGMENT COMPOSITION OF
FRUITS IN TOMATO (*SOLANUM YCOPERSICUM* L.) BREEDING
FOR THE OPEN GROUND**

SUMMARY

Using molecular marking methods at the stages of evaluating splitting populations and selecting pairs for crossings, a linear material and tomato F₁ hybrids for open ground were created with a complex of alleles that provide an increased accumulation of a certain composition of carotenoids (tangerine,

Beta, old gold crimson) and anthocyanins (*Ant1*), as well as resistance to some of pests (*Mi-1.2*), fungal (*I-2*, *Cf-4*, *Cf-9*, *Ph-3*) and viral (*Tm-2*, *Sw 5b*, *Sw 421*) infections. Methods were adapted and DNA typing of alleles of fruit quality genes and resistance genes was carried out. Lines and F_1 hybrids containing alleles of valuable traits in combination with high yield and early maturity have been identified.

Key words: tomato; breeding; DNA markers; disease resistance; fruit quality; productivity; open ground.