

СОЗДАНИЕ НОВОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ТОМАТА С ВЫСОКИМ НАКОПЛЕНИЕМ БЕТА-КАРОТИНА, КОМПЛЕКСНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БОЛЕЗНЯМ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТЬЮ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ

**Е.В. Дрозд, О.Г. Бабак, Н.А. Некрашевич, Н.В. Анисимова,
К.К. Яцевич, А.В. Кильчевский**

*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
e.drozd@igc.by*

Аннотация. На основе разработанных молекулярных маркеров и адаптированных методик ДНК-типирования аллелей качества плодов *B*, *hp-2^{dg}*, устойчивости к болезням *Ph-3*, *Cf-5*, типа роста главного побега *Sp*, функциональной мужской стерильности пыльников (ФМС) *ps-2* проведен скрининг популяции F_2 гибрида Поспех (С9464 × ЛВРН_д), получен селекционный материал для создания новых материнских линий на основе ФМС с преимущественным накоплением β -каротина и устойчивостью к фитофторе, кладоспориозу. Из расщепляющейся популяции F_2 отобраны стерильные (с аллелем *ps -2*) и фертильные (с аллелем *Ps -2*) образцы с сочетанием аллелей *B/hp2^{dg}/sp/Ph3/Cf5*, *b/hp2^{dg}/Sp/Ph3/Cf5*. Данные формы будут использованы в дальнейшем селекционном процессе, направленном на создание новых форм с высоким качеством плодов и устойчивостью к патогенам.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, ДНК-маркеры

Введение. Современный рынок овощной продукции требует от производителя создания форм с высоким разнообразием по биохимическому составу, форме плодов, их окраске, вкусовым качествам. Вместе с тем для производителя крайне важно получать максимум продукции с минимальными денежными и трудовыми затратами. Выполнение данных задач является основополагающим для современных селекционных программ.

Решение проблемы повышения урожайности и улучшения качества плодов томата возможно лишь на основе создания гибридов F_1 с комплексом признаков качества плодов и устойчивости к патогенам, поскольку повышение устойчивости растения зачастую ведет к ухудшению вкусовых

качеств, а повышенный уровень содержания каротиноидов в плодах томата сопровождается увеличением восприимчивости растений к патогенам [1]. Селекционеры стремятся создать качественно новые сорта и гибриды, отвечающие современным требованиям. Учитывая, что получение гибридных семян томата достаточно трудоемкий процесс, при подборе родительских пар особое внимание следует уделять изучению их генетической составляющей.

Отбор с помощью молекулярных маркеров или маркер-сопутствующий отбор (MAS – Marker Assisted Selection) – сравнительно новый подход в селекции растений, основанный на прямой селекции растений по генам, определяющим хозяйственно-ценный признак. Использование MAS особенно актуально при контроле признаков, фенотипически проявляющихся на поздних стадиях развития растения (биохимический состав, период сохранности плодов) и др. Анализ с помощью ДНК-маркеров не зависит от изменений, связанных с факторами окружающей среды, что важно, например, при отборе устойчивых к патогенам генотипов при отсутствии возбудителя.

В Институте генетики и цитологии разработаны молекулярные маркеры к генам качества плодов, количества и состава каротиноидов (*B*, *hp-2^{dg} t*, *Del*, *og*, *og^c*, *gf*), устойчивости к болезням (*I-2*, *I-2C*, *Mi 1.2*, *Cf-4*, *Cf-4A*; *Cf-5 Cf-9*, *Tm2²*), а также к гену, контролирующему тип роста (*Sp/sp*). Совместно с Белорусской государственной сельскохозяйственной академией и Институтом овощеводства в результате циклической селекции созданы формы, сочетающие в своем генотипе 2-3 гена, определяющих химический состав плодов. Данные формы используются при создании гибридов F₁ как источник аллелей, детерминирующих определенный биохимический состав. Учитывая, что гибридизация является трудоемким процессом, важным способом упрощения и удешевления производства гибридных семян является использование материнских форм на основе функциональной мужской стерильности (ФМС). Ранее Институтом генетики и цитологии совместно с БГСХА создан ряд гибридов на основе ФМС с использованием стерильных форм, отобранных по фенотипу.

Gorguet В. с соавторами описали мутацию томата в гене *ORF4* полигалактуроназы, тесно связанную с фенотипом *positional sterility-2 (ps-2)* [2]. Разработка молекулярных маркеров к данному признаку позволила быстро и эффективно создавать новые стерильные формы томата. Так с использованием молекулярных маркеров создан ряд форм томата-черри на основе ФМС [1].

В связи с вышеизложенным, целью данных исследований было создание нового селекционного материала томата на основе ФМС с использованием молекулярных маркеров к аллелям, определяющим состав каротиноидов *B* и *hp-2^{dg}*, а также генов устойчивости к фитофторе *Ph3* и кладоспориозу *Cf-5*. Аллель *Beta carotene (B)* детерминирует преимущественное накопление β-каротина. Аллель *high pigment 2 dark green (hp-2^{dg})* увеличивает количество накапливаемых в плодах пигментов. Кроме того, поскольку известно, что аллель *B* тесно сцеплен [3, 4, 5] с аллелем *sp (self pruning)*, определяющим детерминантный габитус растения, в задачу исследований входило изучение возможности создания индетерминантных форм с преимущественным накоплением β-каротина

Материалы и методы исследования. Для достижения поставленной цели выполнена гибридизация селекционных линий С9464 и ЛВРН_д коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, БГСХА. Генотип Линии С9464 включает следующие аллели изучаемых хозяйственно-ценных признаков: индетерминантности (неограниченного роста главного побега) *Sp*, функциональной мужской стерильности *ps-2*, устойчивости к фитофторе *Ph-3*, устойчивости к кладоспориозу *Cf-5*. Генотип Линии ЛВРН_д содержит аллели *B* и *hp-2^{dg}*, обеспечивающие высокое накопление β-каротина в плодах, а также аллель детерминантности *sp*. Проведена оценка биометрических признаков гибрида F₁, характеризующих габитус растения. Для отбора новых форм с желаемым комплексом аллелей получены семена гибридов F₁ и выполнен анализ образцов расщепляющегося поколения F₂ с помощью молекулярных маркеров, представленных в таблице 1.

Экстракцию ДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК из растительного материала комплекта С компании Праймтех согласно протоколу производителя. Режим проведения амплификации включал следующие этапы: I-й этап: 92 °С – 15 мин.; II-й этап: 35 циклов: 99 °С – 4 сек.; 58-52 °С – 30 сек.; 72 °С – 1 мин.; III-й этап: 72 °С – 5 мин.; IV-й этап: 16 °С – 2 мин. Оценка продуктов амплификации проводилась методом электрофореза в 2% агарозном геле. Для *B* аллеля разделение продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500.

Результаты и их обсуждение. Для выявления возможности создания индетерминантных форм с аллелем *B*, тесно связанным с детерминантным типом роста, проведена оценка признаков, характеризующих развитие главного побега у гибрида F₁ С9464 × ЛВРН_д высота растения, высота за-

ложения первой кисти, число листьев между кистями. Генотип данного гибрида сочетал аллели гена *СУСВ b* и *B* определяющие типы накапливаемых каротиноидов, аллели *Sr* и *sr*, определяющие тип развития главного побега.

Таблица 1. – Наименование и характеристика маркеров, используемых для ДНК-типирования популяции томатов T40 F₂ C9464 × ЛВРН_д

Аллель	Тип и название маркера	Праймеры для ПЦР	Температура отжига, °С	Литературный источник
<i>Ph-3</i>	SCAR, NCLB-9-6678	F:CCTTAATGCAATAGGCAAAT R:ATTTGAATGTTCTGGATTGG,	52	Chunwongse J. [et al.] [6]
<i>Sp</i>	CAPS, SpF/R_ MvaI	F:CTGTCCAAGTGTTAAGATG R:CTGTAGTGCCTGGAATGT	56	А.В.Кильчевский и др. [6]
<i>hp-2^{dg}</i>	CAPS, <i>hp-2^{dg}</i> AciI	F:TTCTTCGGATTGTCCATGGT R:CACCAATGCTATGTGCCAAA	55	Кильчевский, А.В и др. [7]
<i>Cf5</i>	SCAR, 2-5Cf	F:GCTATCTTTGGGTATCAAAATC TT R:AGATGACATCGACAAAATGTG	58	Кильчевский, А.В и др. [8]
<i>ps-2</i>	CAPS, <i>ps-2</i> _TaiI	F:CAAATTGGATGAGAGTTTGA A R:CATTTTACAAGTGTAACAAC TG	55	Бабак О.Г. и др. [1]
<i>B</i>	SCAR, BpromF/Bprom R	F:CTATGTTTGTAGTGCTTGG R:GAAAATTGTTTCATGTGCC	55	А.В.Кильчевский и др. [7, 9]

Согласно полученным данным, высота растений находилась в пределах 2.80 - 3.15 м, заложение первой кисти на растениях начиналось после 8-9 листа, между кистями закладывалось по 3 листа, что полностью соответствует индетерминантным гибридам для защищенного грунта. Аналогичные данные были получены по формам F₂ с гетерозиготными генотипами. При этом плоды имели оранжевую окраску, что соответствует преимущественному накоплению бета-каротина. Полученные данные показывают, что при использовании детерминантной формы с гомозиготными аллелями *sr* и *B* в качестве одного из родителей возможно получение индетерминантных форм при сочетании с аллелями *Sr* и *b* в другом генотипе.

Для создания новых генотипов томата на основе ФМС с комплексом генов качества и устойчивости с применением функциональных ПЦР маркеров были протестированы 123 генотипа томата поколения F₂ для выявления изучаемых аллелей. В таблице 2 представлен ряд типизируемых образцов с различным сочетанием аллелей.

Типирование *B* аллеля гена *СУСВ* проводилось маркером BpromF/R. При амплификации с данными праймерами у растений, несущих рецессивный аллель данного гена (*b*), образуется фрагмент длиной 141 п.н., тогда как у растений с мутантным аллелем *B* – 150 п.н. (Табл. 2).

С целью выявления аллеля *hp-2^{dg}* (dark green) использован CAPS маркер CAPS *hp-2^{dg}*_AciI. В результате ПЦР с указанным маркером синтезируется ампликон размером 697 п.н. После рестрикции эндонуклеазой *AciI*, мутантный аллель *hp-2^{dg}* (dark green) остается неизменным, а нормальный аллель разрезается на фрагменты длиной 578 п.н. и 119 п.н. (рис.1 А).

Использование CAPS маркера *ps-2*_TaiI позволяет получить ПЦР-фрагменты размером 397, 223, 76 п.н. у фертильных форм, и 223, 200, 197 и 76 п.н. у образцов с аллелем стерильности *ps-2*. (рис.1 Б).

Для выявления аллеля детерминантного габитуса *sr* использован маркер CAPS SpF/R_ MvaI. В результате рестрикции у растений с неограниченным ростом (*Sp*) ампликон режется на фрагменты 396, 624 п.н, а у растений детерминантного фенотипа – остается неизменным 1020 п.н. (рис.1 В).

С целью выявления аллеля устойчивости к кладоспориозу *Cf5* применялся доминантный маркер SCAR 2-5 Cf. Продукты ПЦР размером 1163 и 880 п.н. свидетельствуют о наличии аллеля гена *Cf5* (рис.1 Г).

При амплификации с маркером NCLB-9-6678 устойчивости к фитофторе (*Ph3*) фрагменты размерами 600 и 900 п.н. свидетельствуют о наличии признака устойчивости и восприимчивости к фитофторе, соответственно (рис.).

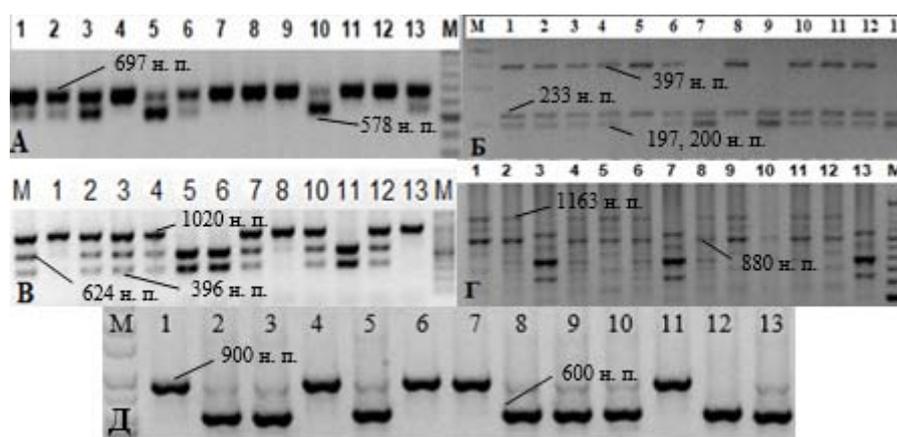


Рисунок – Продукты амплификации ДНК 13 образцов популяции T40 F₂ C9464 × ЛВРН_д с CAPS маркером *hp-2^{dg}F/hp-2^{dg}R_AciI* (А); CAPS маркером *ps-2_TaiI* (Б); CAPS маркером *SpF/R_MvaI* (В); SCAR маркером *2-5Cf* (Г); SCAR маркером *NCLB-9-6678* (Д)

Таблица 2. – Результаты ДНК-генотипирования образцов томата популяции F₂ с маркерами к генам *B*, *hp-2dg*, *sp*, *Cf2*, *Cf5*, *Ph3*, *ps-2*

Образец ДНК	Ген и размеры искомого ПЦР продукта, п.н.						Фенотипическое описание растений
	<i>B</i> , 150.	<i>hp-2^{dg}</i> , 697	<i>ps-2</i> , 200	<i>Sp</i> , 396+624	<i>Cf-5</i> , 1163+880	<i>Ph-3</i> , 600	
T40 -7	<i>b</i>	<i>hp-2^{dg}</i>	<i>ps2</i>	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Картофельный лист
T40 -20	Гетеро*	<i>hp-2^{dg}</i>	Гетеро	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Плоды белесые
T40 -25	<i>B</i>	<i>hp-2^{dg}</i>	Гетеро	<i>sp</i>		<i>Ph-3</i>	Растение невысокое
T40 -27	<i>B</i>	Гетеро	<i>ps2</i>	<i>sp</i>		Гетеро	Очень высокое
T40 -28	<i>B</i>	<i>Hp-2^{dg}</i>	Гетеро	<i>sp</i>		<i>Ph-3</i>	Плоды белесые, листья обычные
T40 -30	Гетеро	Гетеро	<i>ps2</i>	Гетеро		Гетеро	Лист картофельный, кисть простая
T40 -42	<i>B</i>	<i>hp-2^{dg}</i>	<i>ps2</i>	<i>sp</i>		Гетеро	Низкое, высота 52 см.
T40 -58	<i>b</i>	<i>Hp-2^{dg}</i>	<i>ps2</i>	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Лист картофельный, кисть простая
T40 -68	<i>b</i>	Гетеро	<i>ps2</i>	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	Гетеро	Картофельный лист, кисть простая
T40 -88	<i>B</i>	Гетеро	Гетеро	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Плоды белёдые, крупные
T40 -92	Гетеро	Гетеро	<i>ps2</i>	Гетеро	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Кисти сложные
T40 -98	<i>b</i>	<i>hp-2^{dg}</i>	Гетеро	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Кисти сложные
T40 -103	<i>B</i>	Гетеро	Гетеро	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Очень сложная кисть, плод округлый, жёлтый
T40 -107	Гетеро	<i>Hp-2^{dg}</i>	<i>ps2</i>	Гетеро		Гетеро	Лист средний, кисть простая, плоды крупные
T40 -123	<i>B</i>	<i>hp-2^{dg}</i>	-	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Плод мелкий, наличие трещин

* – Гетерозиготная форма

По результатам молекулярного анализа, а также фенотипического анализа образцов были отобраны 18 форм с различным сочетанием аллелей устойчивости: кладоспориозу (*Cf5*), фитофторозу (*Ph3*); качества плодов: ликопина и каротина (*b*). β-каротина (*B*), повышенного содержания пигментов (*hp-2dg*); детерминантного и индетерминантного типа роста (*sp/Sp*); функциональной мужской стерильности (*ps-2*). Наряду с молекулярным анализом оценивались признаки по фенотипу: размер и форма плода, тип кисти, наличие картофельного листа.

Заключение. Показана возможность создания индетерминантных форм у гибридов F₁ с сочетанием в генотипе генов *Self pruning* и *Beta* в гетерозиготном состоянии. На основе разработанных молекулярных маркеров и адаптированных методик ДНК-типирования аллелей качества плодов *B*,

hp-2^{dg}, устойчивости к болезням *Ph-3*, *Cf-5*, типа роста главного побега *Sp*, функциональной мужской стерильности пыльников (ФМС) *ps-2* проведен скрининг популяции F₂ гибрида С9464 × ЛВРН_д, получен селекционный материал для создания новых материнских линий на основе ФМС с преимущественным накоплением β-каротина, и устойчивостью к фитофторе, кладоспориозу. Из расщепляющейся популяции F₂ были отобраны стерильные (с аллелем *ps-2*) и фертильные (с аллелем *Ps-2*) образцы с сочетанием аллелей *B/hp2^{dg}/sp/Ph3/Cf5*, *b/hp2^{dg}/Sp/Ph3/Cf5*. Данные формы будут использованы в дальнейшем селекционном процессе, направленном на создание новых форм с высоким качеством плодов и устойчивостью к патогенам.

Список использованных источников

1. Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Анисимова Н.В., Яцевич К.К., Никитинская Т.В., Лещина Н.Ю., Пугачева И.Г., Никонович Т.В., Добродькин М.М., Кильчевский А.В. Создание гибридов F1 томата черри на стерильной основе с использованием методов классической и маркер-сопутствующей селекции / Сб. науч. трудов «Молекулярная и прикладная генетика», 2020. – Т.29, С. 5-17
2. Gorguet B., Schipper D., van Lammeren A., Visser R. G. F., van Heusden A. W. *ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene // *Theor Appl Genet* - 2009 – V.118 –P.1199–1209.
3. Генетические основы селекции растений а 4 т. Т4. Биотехнология в селекции растений. Генетика и генетическая инженерия. гл.11 Молекулярные технологии в селекции томата (*Solanum lycopersicum L.*) / А.В.Кильчевский, О.Г. Бабак, В.Ф. Аджиева, Н.А. Некрашевич С.В. Малышев, З.Ф. Грушецкая, Л.А. Мишин, М.М. Добродькин, И. Е.Зайцева, И.Г.Пугачева/ Мн.:Беларусская наука, 2014. – с.290-344.
4. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1 / L. Pnueli [et al.] // *Development*. – 1998 Jun. – Vol. 125(11). – P. 1979–1989.
5. Kolotilin, I. Transcriptional profiling of high pigment-2dg tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of phytonutrients / Igor Kolotilin [et al.] // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 145. –P. 389–401.
6. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato / Chunwongse J. [et al.]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 77. – №. 3. – P. 281-286.
7. Кильчевский, А.В. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата / А.В. Кильчевский, О.Г. Бабак, С.В. Малышев, В.Ф. Аджиева, Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, А.В. Кондратюк; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2016. – с. 41. – ISBN 978-985-552-526-5.
8. Генетические ресурсы растений в Беларуси: мобилизация, сохранение, изучение и использование. Гл.4, раздел 4.1.1. Генетические коллекции сельскохозяйственных культур. Томат (*Solanum lycopersicum L.*) и перец (*Capsicum annuum L.*) / Кильчевский А.В., Бабак О.Г., Аджиева В.Ф., Никитинская Т.В., Некрашевич Н.А., Яцевич К.К./ – Минск: Четыре четверти, 2019. – с.167-175.
9. Babak O.G., Nekrashevich N.A., Yatsevich K.K., Malyshev S.V., Kilchevsky A. V. Genetic bases of tomato marker-assisted selection in Belarus. *Eurobiotech. J.* 2018; 2(2):128-135, doi:10.2478/ebtj-2018-0017.