



СЕЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ТОМАТА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*), УСТОЙЧИВЫХ К БРОНЗОВОСТИ

Монахос Г.Ф.¹ – кандидат с.-х. наук, директор
Нгуен Тхи Лоан² – аспирант
Нгуен Минь Ли² – аспирант

¹ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»
127550, г. Москва, ул. Пасечная, д. 5
Тел. +7(495)976-11-74

²Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева
127550, г. Москва, Тимирязевская ул., 49
E-mail: breedst@mail.ru

Приведены результаты оценки устойчивости к бронзовости томата селекционного материала с использованием инфекционного фона и сравнение её с результатами оценки молекулярным маркером SCAR Sw421. Анализ спектров ДНК, амплифицированных SCAR маркером Sw421, позволил провести отбор устойчивых растений по генотипу, выявляя гомо- и гетерозиготное состояние гена Sw5. При использовании молекулярного маркера выявление растений, гомозиготных по доминантному аллелю гена Sw5, сокращается на одно поколение по сравнению с традиционным генетическим анализом. Получены линии томата с генетической устойчивостью к бронзовости, гомозиготные по доминантному аллелю гена Sw5.

Ключевые слова: *Lycopersicon esculentum*, томат, аллели Sw5, Тосповирус, бронзовость, молекулярный маркер.

Введение

В последнее время возрастает вредоносность бронзовости томата, проявляющаяся в резком снижении урожайности (более 50%) и ухудшении качества продукции (Джос Е.А. и др., 2009; Джалилов Ф.С., Ахатов Е.А., 2014). Заболевание вызывается вирусом бронзовости TSWV (*tomato spotted wilt virus*) – Тосповирус. Тосповирус передается механическим способом трипсами (Naidu et al., 2008), включая табачный трипс *Frankliniella fucosa* и западный цветочный трипс *F. occidentalis*. Передача происходит по персистентному типу, когда в период питания личинок на больных расте-

ниях они сами заражаются вирусом (Джалилов Ф.С., Ахатов Е.А., 2014.)

У восприимчивых растений вирус бронзовости вызывает разнообразные симптомы: бронзовость листьев, побурение, искривление и израстание побегов, карликовость и увядание растения, кольцевую пятнистость, концентрические круги на поверхности плодов (рис.1).

Существуют различные гены устойчивости к бронзовости томата, но чаще используют Sw5. Это объясняется его продолжительной эффективностью, несмотря на сложную структуру Тосповирусов (Anong Shi, 2011).



Рис. 1. Симптомы бронзовости на листьях и плодах томата

Ген *Sw5*, который выявили Stevens и другие (1992) в *L. peruvianum*, доминантный, локализуется на длинном плече хромосомы 9 (Giordano et al., 2000), дает устойчивость к TSWV во многих географических местах (Boiteux and Giordano, 1993; Stevens et al., 1994; Rosello et al., 1998). Кроме этого, этот ген также обеспечивает устойчивость к двум другим Тосповирусам TCSV и GRSV (Boiteux and Giordano 1993, Soler и др., 2003). Эта особенность гена *Sw5* дает возможность создания новых видов *Lycopersicon* с устойчивостью к широкому спектру видов Тосповирусов (Giordano et al., 2000).

В настоящее время применение молекулярных маркеров значительно расширило возможности оценки генов устойчивости к болезням и вредителям растений. Анализ молекулярных маркеров, связанных с генами, обеспечивающими устойчивость, дает возможность проводить отбор устойчивых растений на генетическом уровне, снижать трудности при фитопатологической оценке образцов, устойчивых к болезням. В конеч-

ном итоге это позволяет сделать процесс селекции более эффективным посредством сокращения времени работ, площадей под посевы, в также проводить отбор генотипов по признакам, плохо поддающимся селекции классическим путем (Подвицкий Т.А., Галиновский Д.В., Тарутина Л.А., 2013).

Цель работы – выделить устойчивые к бронзовости образцы томата, изучить генетику устойчивости и возможность оценки устойчивости с помощью молекулярных маркеров, создать устойчивые линии.

Материалы и методы исследования:

Опыт проводили в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур в 2014 году. Материалом опыта служили различные формы томата, показавшие в предыдущие годы высокую устойчивость к бронзовости: F₁ Гилгал (7 растений), F₂ Гилгал (40 растений), F₂ Исфара (39 растений), F₃ Манон 1-7 (6 растений), F₂ (Гилгал x 19-22) (24 растения). Оценку феноти-

1. Наименование и нуклеотидная последовательность праймеров

Название праймеров	Последовательность праймеров 5' → 3'	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Авторы
SCAR Sw5-f2	CGGAACCTGTAACCTTGACTG	541 п.н.	Anong Shi et al., 2011
SCAR Sw5-r2	GAGCTCTCATCCATTTTCCG		
SCAR Sw 421-1	GACTTGTTGCCATAGGTTCC	Доминантная аллель 940 п.н. Рецессивная аллель 900 п.н.	Nascimento et al., 2009
SCAR Sw 421-2	GCCCACCCGAAGTTAATCC		

2. Результаты оценки коллекции образцов томата на устойчивость к бронзовости на инфекционном фоне, 2014 год

Образец	Число устойчивых растений	Число восприимчивых растений	Соотношение	Значение χ^2
F ₁ Гилгал	7	0	-	-
F ₃ Манон 1-7	6	0	-	-
F ₂ Гилгал	29	11	2,6:1	0,13
F ₂ Исфара	29	10	2,9:1	0,008
F ₂ (Гилгал x 19-22)	14	10	1,4:1	-

пического проявления устойчивости к бронзовости томата проводили визуально в теплице на естественном инфекционном фоне. Устойчивость растений определяли только одним качественным показателем – наличие или отсутствие поражений, по внешним признакам проявления реакции растения на заражение патогеном – на молодых листьях многочисленные мелкие темные пятна, листья приобретают бронзовый оттенок, и засыхают; на стеблях, особенно в верхней части образуются некрозы в виде черных полос и растения прекращают рост. Анализ проводили весь период вегетации растений от высадки рассады до начала созревания плодов.

ДНК выделяли из молодых листьев с помощью цетилтриметиламмоний-N-бромиды («Sigma», США) по методике (Murray, Thompson, 1980). Молекулярное генотипирование проводили с использованием двух маркеров гена устойчивости к бронзовости томата: SCAR Sw5-f2/Sw5-r2 (Anong Shi et al., 2011) и SCAR Sw421-1/SCAR Sw421-2 (Nascimento et al., 2009) по ме-

тодике, рекомендованной авторами.

Продукты амплификации окрашивали флуоресцентным красителем GelRed и разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Маркер молекулярных весов, используемый в работе, представляет 100bp.

Результаты и обсуждение

При оценке всех селекционных образцов на инфекционном фоне установлено, что большинство растений каждого из них устойчивы к бронзовости. Причем полная устойчивость наблюдалась у всех 7 растений гибрида F₁ Гилгал и 6 растений F₃ потомства Манон 1-7, а в потомствах F₂ Гилгал, F₂ Исфара и F₂ (Гилгал x 19-22) отмечено расщепление на устойчивые и восприимчивые растения (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что фенотипическое расщепление в двух F₂ потомствах Гилгал и Исфара близко к теоретически ожидаемому при моногенном контроле признака (3:1), χ^2 (F₂ Гилгал) = 0,13 и χ^2 (F₂ Исфара) = 0,008 меньше, чем $\chi^2_{\text{теор.}}=3,84$. В группу устойчивых входят доминантные гомозиготы и гетерозиготы. В потомстве F₂ (Гилгал x 19-22) восприимчивых растений больше, чем можно ожидать. Вероятно, это связано с малым числом растений.

Продукт амплификации ДНК с парой праймеров Sw5-r2/ Sw5-f2 составил около 540 п.н. и соответствует указанному авторами размеру маркера (Anong Shi et al., 2011), однако маркер в исследованных популяциях мономорфен и проявляется у всех растений томата, как у устойчивых, так и у восприимчивых. То есть пара праймеров маркера Sw5-f2/ Sw5-r2 не пригодна для

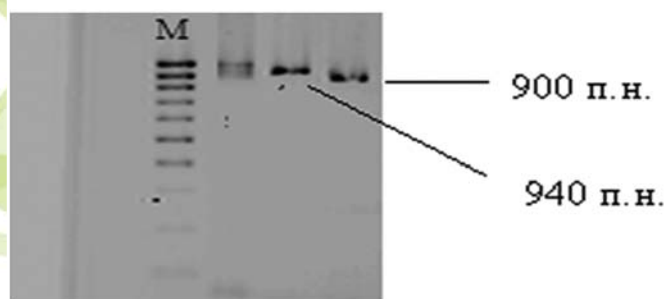


Рис.2. Электрофореграмма продуктов амплификации с маркером Sw421

Результаты анализа электрофореграмм представлены на рисунке 3.

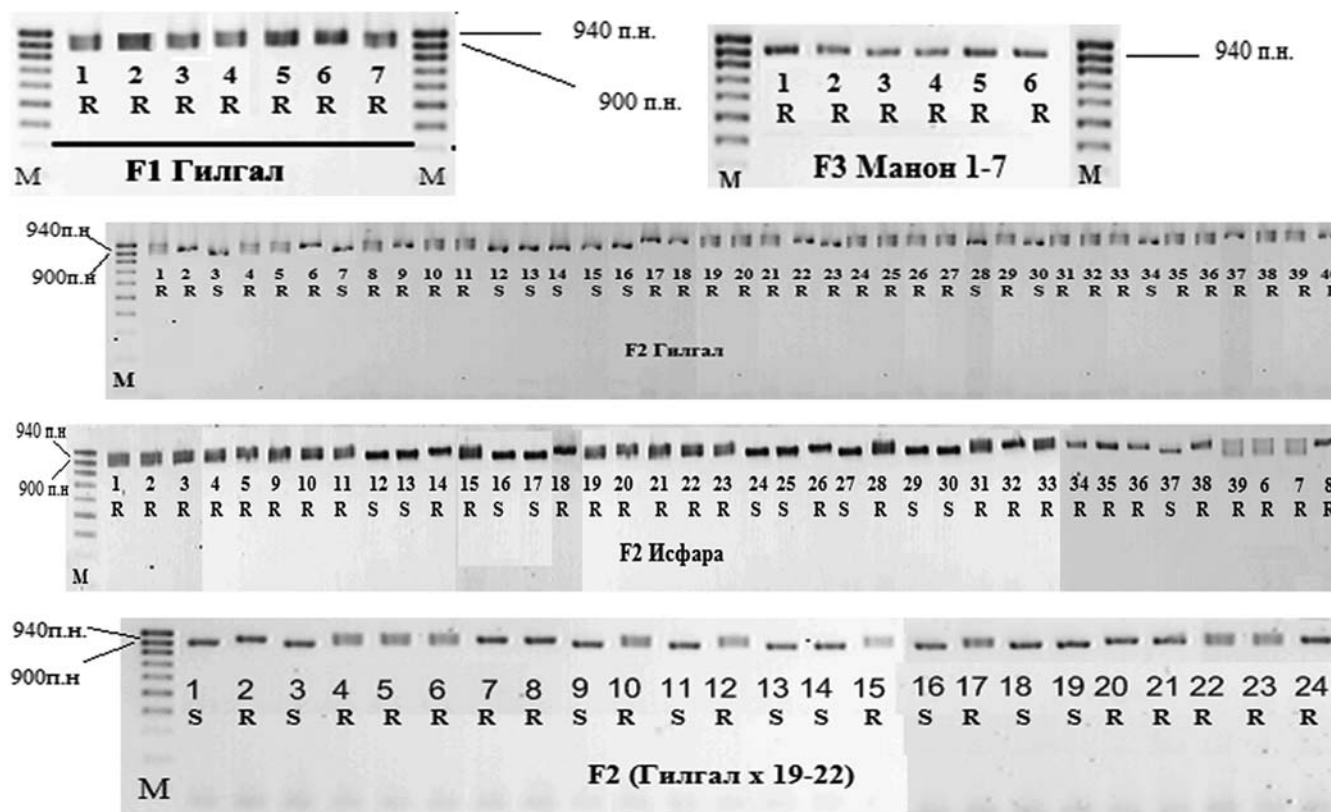


Рис. 3. Электрофореграмма изученных образцов томата

Примечание:

S-восприимчивый, R-устойчивый;

M- маркер молекулярного веса 100bp;

п.н. - пар нуклеотидов

выявления устойчивых растений в анализируемых образцах.

Молекулярный маркер Sw-421 кодоминантный и локализуется на расстоянии 1,0 cM от гена Sw5 в геноме вида *L.peruvianum* (Nascimento et al., 2009). Фрагмент ДНК размером 940 п.н. соответствует доминантному аллелю, а размером 900 п.н. – рецессивному. Присутствие обоих «бендов» говорит о гетерозиготности генотипа (рис. 2).

Из рисунка 3 видно, что все 7 растений гибрида F₁ Гилгал являются гетерозиготами Sw5sw5, и все 6 растений потомства F₃ Манон 1-7 являются доминантными гомозиготами Sw5Sw5.

В потомстве F₂ Гилгал и F₂ Исфара наблюдается расщепление на доминантные гомозиготы, рецессивные гомозиготы и гетерозиготы по аллелям гена Sw5. У потомства F₂ Гилгал: 8 растений (№ 2, 6, 9, 17, 18, 22, 37, 40) имеют доминантный гомозиготный генотип Sw5Sw5; а генотип sw5sw5 отмечен у 11 растений (№ 3, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 28, 30, 34; остальные 21 растение (№ 1, 4, 5, 8, 10, 11, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29,

31, 32, 33, 35, 36, 38, 39) имеют гетерозиготный генотип (Sw5sw5).

Генотипирование потомства F₂ Исфара (39 растений) по маркеру Sw421 показало, что имеется 9 растений с доминантным гомозиготным генотипом Sw5Sw5 (№ 8, 14, 18, 26, 32, 34, 35, 36, 38), 10 растений с рецессивным гомозиготным генотипом sw5sw5 (№ 12, 13, 16, 17, 24, 25, 27, 29, 30, 37), и 20 остальных растений (№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 31, 33, 39) обладают гетерозиготным генотипом Sw5sw5.

Сопоставление результатов фенотипической оценки устойчивости на инфекционном фоне и молекулярного генотипирования показало их полное соответствие (табл.3). Это подтверждает высокую эффективность молекулярного анализа с использованием праймеров SCAR Sw421-1/ Sw421-2.

В настоящее время в семеноводстве гетерозисных гибридов использование форм томата с признаком функциональной мужской стерильности (ФМС) в качестве материнских компонентов становится популяр-

3. Проявление признака устойчивости томата к бронзовости, 2014, Москва

Потомство	№ раст.	Генотип (по маркеру)	Фенотип (на фоне)	Потомство	№ раст.	Генотип (по маркеру)	Фенотип (на фоне)	Потомство	№ раст.	Генотип (по маркеру)	Фенотип (на фоне)
F₁ Гилгал	1	+/- (R)	уст.	F₂ Гилгал	31	+/- (R)	уст.	F₂ Исфара - 3	4	+/- (R)	уст.
	2	+/- (R)	уст.		32	+/- (R)	уст.		5	+/- (R)	уст.
	3	+/- (R)	уст.		33	+/- (R)	уст.		6	+/- (R)	уст.
	4	+/- (R)	уст.		34	-/- (S)	восп.		7	+/- (R)	уст.
	5	+/- (R)	уст.		35	+/- (R)	уст.		8	+/- (R)	уст.
	6	+/- (R)	уст.		36	+/- (R)	уст.		9	+/- (R)	уст.
	7	+/- (R)	уст.		37	+/- (R)	уст.		10	+/- (R)	уст.
F₂ Гилгал	1	+/- (R)	уст.	F₂ (Гилгал x 19-22)2	38	+/- (R)	уст.		11	+/- (R)	уст.
	2	+/- (R)	уст.		39	+/- (R)	уст.		12	-/- (S)	восп.
	3	+/- (R)	уст.		40	+/- (R)	уст.		13	-/- (S)	восп.
	4	+/- (R)	уст.		1	-/- (S)	восп.		14	+/- (R)	уст.
	5	+/- (R)	уст.		2	+/- (R)	уст.		15	+/- (R)	уст.
	6	+/- (R)	уст.		3	-/- (S)	уст.		16	-/- (S)	восп.
	7	+/- (R)	уст.		4	+/- (R)	уст.		17	-/- (S)	восп.
	8	+/- (R)	уст.		5	+/- (R)	уст.		18	+/- (R)	уст.
	9	+/- (R)	уст.		6	+/- (R)	уст.		19	+/- (R)	уст.
	10	+/- (R)	уст.		7	-/- (S)	восп.		20	+/- (R)	уст.
	11	+/- (R)	уст.		8	-/- (S)	восп.		21	+/- (R)	уст.
	12	-/- (S)	восп.		9	-/- (S)	восп.		22	+/- (R)	уст.
	13	-/- (S)	восп.		10	+/- (R)	уст.		23	+/- (R)	уст.
	14	-/- (S)	восп.		11	-/- (S)	восп.		24	-/- (S)	восп.
	15	-/- (S)	восп.		12	+/- (R)	уст.		25	-/- (S)	восп.
	16	-/- (S)	восп.		13	-/- (S)	восп.		26	+/- (R)	уст.
	17	+/- (R)	уст.		14	-/- (S)	восп.		27	-/- (S)	восп.
	18	+/- (R)	уст.		15	+/- (R)	уст.		28	+/- (R)	уст.
	19	+/- (R)	уст.		16	-/- (S)	восп.		29	-/- (S)	восп.
	20	+/- (R)	уст.		17	+/- (R)	уст.		30	-/- (S)	восп.
	21	+/- (R)	уст.		18	-/- (S)	восп.		31	+/- (R)	уст.
	22	+/- (R)	уст.		19	-/- (S)	восп.		32	+/- (R)	уст.
	23	-/- (S)	восп.		20	+/- (R)	уст.		33	+/- (R)	уст.
	24	+/- (R)	уст.		21	+/- (R)	уст.		34	+/- (R)	уст.
	25	+/- (R)	уст.		22	+/- (R)	уст.		35	+/- (R)	уст.
	26	+/- (R)	уст.		23	+/- (R)	уст.		36	+/- (R)	уст.
	27	+/- (R)	уст.		24	+/- (R)	уст.		37	-/- (S)	восп.
	28	-/- (S)	восп.		1	+/- (R)	уст.		38	+/- (R)	уст.
	29	+/- (R)	уст.		2	+/- (R)	уст.		39	+/- (R)	уст.
	30	-/- (S)	восп.		3	+/- (R)	восп.				

Примечание: +/- (R): генотип Sw5Sw5; +/- (R) - генотип Sw5sw5; -/- (S)- генотип sw5sw5

ным методом, который позволяет сократить время на производство гибридных семян (Мамедов М.И., Пышная О.Н., Харченко В.А., 2000). Перенос генов устойчивости к заболеваниям, в том числе гена *Sw5*, в другие восприимчивые формы томата играет важную роль в процессе защиты растений от болезней, увеличения урожайности, улучшения качества продукции томата. В нашей работе при передаче гена *Sw5* в стерильные растения с ФМС типа Врбычанский низкий, мы провели скрещивания F_1 Гилгал со стерильной материнской линией 19-22, которая восприимчива к бронзовости, но несет другие гены устойчивости, *I₂I₂*, *VeVe*, *Cf4Cf4*, *MiMi*, *Tm₂Tm₂*.

Так как растения гибрида Гилгал были гетерозиготами, потомство от скрещивания со стерильной линией 19-22 состояло из устойчивых к бронзовости гетерозигот и восприимчивых рецессивных гомозигот в соотношении 1:1. У устойчивого растения с гетерозиготным генотипом получили потомство – второе поколение (F_2) (Гилгал х 19-22). Анализ потомства из 24 растений по-

казал, что 4 растения (№ 2, 20, 21, 24) имеют генотип *Sw5Sw5*, и три из них обладали мужской стерильностью. Генотип *sw5sw5* отмечен у 11 растений (№1, 3, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19). У 9 остальных растений (№ 4, 5, 6, 10, 12, 15, 17, 22, 23), у которых присутствуют фрагменты ДНК размером 940 п.н. и 900 п.н., имеют генотип *Sw5sw5*, и из них три стерильных (рис.1.).

Выводы

С использованием инфекционного фона и молекулярного маркера создана коллекция фертильных и стерильных линий с генетической устойчивостью к бронзовости, контролируемой доминантным аллелем гена *Sw5* в гомозиготном состоянии.

Молекулярный SCAR маркер Sw421 показывает высокую эффективность при анализе устойчивости растений томата на генетическом уровне и позволяет надежно отбирать устойчивые генотипы, гомозиготные по доминантному аллелю гена *Sw5*, что сокращает время создания устойчивых линий на одно поколение.

Литература

1. Джалилов Ф.С., Ахатов Е.А. Защита томата от болезней.// Картофель и овощи. – 2014, – №5. – С.13-15.
2. Джос Е.А., Енга Лычева Н.А., Пышная О.Н., Мамедов М.И. Виды и межвидовые гибриды рода *Capsicum* L. – источники устойчивости к вирусу бронзовости томата в условии защищенного грунта Московской области // Селекция и семеноводство овощных культур – сб. науч. тр. / Всерос.НИИ селекции и семеноводства овощных культур. – М., 2009. – Вып. 42. – С. 64-74.
3. Мамедов М.И., Пышная О.Н., Харченко В.А. Использование ФМС в гибридном семеноводстве томата и перца сладкого: Метод рекомендации / Всерос.НИИ селекции и семеноводства овощных культур. – М., 2000. – 11с.
4. Подвицкий Т.А., Галиновский Д.В., Тарутин Л.А. Источники устойчивости томата (род *Lycopersicon*) к возбудителям хозяйственно значимых заболеваний.// Известия национальной академии наук Беларуси. – 2013. – № 4. – С. 45-50.
5. Ainong Shi, Richard Vierling, Richard Grazzini, Pegyin Chen, Homer Caton, Dilip Panthee. Identification of molecular markers for Sw – 5 gene of tomato spotted wilt virus resistance.//American Journal Biotechnology and Molecular Sciences. – 2011. – №1(1). – P.8-16.
6. Boiteux L.S., Giodano L. de B. Genetic basis of resistance against two Tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*).// Euphytica. – 1993. – № 71. – P. 151-164.
7. Giordano L. De, Avila A.C. De, Charchar J.M., Boitex L.S. A tospovirus – resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments.// Hort. Sci. – 2000. – № 35. – P. 1368-1370.
8. Naidu R.A., Sherwood J.L., Deom C.M. Characterization of a vector – non – transmissible isolate of tomato spotted wilt virus.// Plant Pathology. – 2008. – № 57. – P. 190-200.
9. Nascimento I. R. D., Maluf W. R., Figueira A.R. et al. Marker assisted identification of tospovirus resistant tomato genotypes in segregating progenies.//Sci. agric. (Piracicaba, Braz.). – 2009. – V.66. – №3. – P.298-303.
10. Rosello S., Diez M.J., Nuez F. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*.// European Journal of Plant Pathology. – 1998. – №5. – P. 499-509.
11. Soler S., Cebolla-Cornejo J., Nuez F. Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. // Phytopathol Mediterr. – 2003. – №42. – P. 207-219.
12. Steven M.R., Scott S.J., Gergerich R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. // Euphytic. – 1992. – №59. – P. 9-17.