

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-34-41>
УДК 635.64:631.524.86:632.38

О.Л. Горун, Е.В. Дубина, И.В. Козлова,
И.В. Баясний, С.В. Гаркуша

ФГБНУ "ФНЦ риса"
Россия, г. Краснодар, п. Белозерный, 3

Благодарности. Исследования выполнены при поддержке гранта Унитарной некоммерческой организации «Кубанский Научный Фонд» №МФИ-П-20.1/1 «Разработка и реализация генетико-селекционных подходов для получения нового селекционного материала томата на основе ФМС с повышенной устойчивостью к биотическим стрессорам для юга России».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: Все авторы участвовали в планировании и постановке эксперимента, а также в анализе экспериментальных данных и написании статьи (Горун О.Л., Козлова И.В. – 30%, Дубина Е.В. – 20%, Баясний И.В., Гаркуша С.В. – 10%).

Для цитирования: Горун О.Л., Дубина Е.В., Козлова И.В., Баясний И.В., Гаркуша С.В. ДНК-технологии (молекулярное маркирование) в селекции томата на устойчивость к *Tobacco Mosaic Virus*. *Овощи России*. 2021;(4):34-41. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-34-41>

Поступила в редакцию: 09.07.2021
Принята к печати: 09.08.2021
Опубликована: 25.08.2021

Olesya L. Gorun, Elena V. Dubina,
Irina V. Kozlova, Ivan V. Balyasny,
Sergey V. Garkusha

Federal State Budgetary Institution "Federal
Research Center of Rice"
3, Belozerny, Krasnodar, Russia

Acknowledgements. The research was carried out with the financial support of the Kuban science Foundation in the framework of the scientific project №ИФР-П-20.1/1 «Development and implementation of genetic selection approaches for obtaining a new tomato breeding material based on FMS with increased resistance to biotic stressors for the south of Russia».

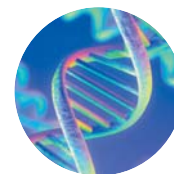
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Authors' Contribution: All authors contributed to the planning and setting up the experiment, as well as in the analysis of experimental data and writing of the article (Gorun O.L., Kozlova I.V. – 30%, Dubina E.V. – 20%, Balyasny I.V., Garkusha S.V. – 10%)

For citations: Gorun O.L., Dubina E.V., Kozlova I.V., Balyasny I.V., Garkusha S.V. DNA technologies (molecular marking) in tomato breeding for resistance to *Tobacco Mosaic Virus*. *Vegetable crops of Russia*. 2021;(4):34-41. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-34-41>

Received: 09.07.2021
Accepted for publication: 09.08.2021
Accepted: 25.08.2021

ДНК-технологии (молекулярное маркирование) в селекции томата на устойчивость к *Tobacco Mosaic Virus*



Резюме

Актуальность. Целью данной работы является создание на основе современных биотехнологических подходов (молекулярное маркирование) новых конкурентоспособных генотипов томата с повышенной устойчивостью к вирусу табачной мозаики, хозяйственно-ценными признаками и адаптированных к почвенно-климатическим условиям выращивания в южных регионах РФ.

Материал и методика. На первом этапе исследования выполнена апробация SSR-маркеров, взятых из литературных источников [1;2] и оптимизированы условия ПЦР для идентификации целевых генов Tm (Tm2a, Tm2², обеспечивающих устойчивость к вирусу табачной мозаики на тканевом уровне) в селекционном материале, имеющемся в отделе овощекртофелеводства.

Результаты. Отобрано два информативных молекулярных маркера Tms 37 и UMD 2060, которые выявляют аллельную разницу между устойчивыми и восприимчивыми образцами. Проведена гибридизация ФМС-линий томата с образцами, имеющими в генотипе искомые гены интереса для получения резистентных к BTM линий томата. Получены семена отцовских форм – доноров целевых генов для дальнейшего их использования в селекционной работе. Научная новизна заключается в изучении дискретного генетического материала *Solanum lycopersicum*, используемого в селекционном процессе и сохраняющего свои функции в новом генетическом окружении.

Ключевые слова: селекция, томат, BTM, SSR-маркеры, ПЦР

DNA technologies (molecular marking) in tomato breeding for resistance to *Tobacco Mosaic Virus*

Abstract

Relevance. The purpose of this work is to create new discrete competitive tomato genotypes based on modern biotechnological approaches with increased resistance to the tobacco mosaic virus, economically valuable traits and adapted to the soil and climatic conditions of cultivation in the southern regions of the Russian Federation.

Methods. At the first stage of the study, SSR markers taken from literature sources were tested [1;2] and PCR conditions were optimized for the identification of target Tm genes (Tm2a, Tm2², providing resistance to tobacco mosaic virus at the tissue level) in the breeding material available in the department of vegetable and potato growing.

Results. Two informative molecular markers Tms 37 and UMD 2060 were selected, which reveal the allelic difference between resistant and susceptible samples. Hybridization of FMS tomato lines with samples having the desired genes of interest in the genotype for obtaining tomato lines resistant to TMV was carried out. Seeds of paternal forms - donors of target genes were obtained for their further use in breeding work. The scientific novelty lies in the study of the discrete genetic material of *Solanum lycopersicum*, used in the breeding process, and preserving its functions in a new genetic environment.

Keywords: selection, tomatoes, TMV, SSR markers, PCR.

Введение

Основной целью в стратегии развития сельского хозяйства является обеспечение продовольственной безопасности Российской Федерации. Овощеводство – одна из важных и перспективных отраслей в Краснодарском крае. В связи с политическими и экономическими процессами в мире в минувшие пять-семь лет, введением экономических санкций и пр. в регионе реализуется программа по импортозамещению в сфере производства сельскохозяйственной продукции, в том числе и для овощеводства. В настоящее время разработана подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур в Краснодарском крае» на период с 2016-2021 годы, целью которой является создание на территории Краснодарского края оптимальных условий для развития селекции и производства конкурентоспособных отечественных сортов и гибридов сельскохозяйственных культур, адаптированных к местным условиям, и развития собственного конкурентоспособного рынка семян сельскохозяйственных культур. Для эффективного импортозамещения, необходимо обеспечить товаропроизводителей посевным материалом отечественных сортов и гибридов томата не менее, чем на 80%.

Томат – одна из самых распространенных овощных культур в Краснодарском крае. Исключительная ценность его плодов заключается в том, что они содержат очень важные витамины, органические кислоты, минеральные соли, необходимые для лучшего обмена веществ и сохранения трудоспособности человека [1, 2].

Наряду с развитием технологий, создание новых сортов и гибридов томата, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков и устойчивостью к болезням являются обязательным условием для повышения экономической эффективности отрасли. К сожалению, на настоящий момент значительная часть семенного материала томатов импортируется. В связи с этим возрастает необходимость развития отечественной селекции и семеноводства данной культуры. Очевидно, что для повышения эффективности селекционного процесса и процесса семеноводства необходимо комплексное изучение имеющихся генетических ресурсов, в том числе и с использованием современных методов молекулярно-генетического анализа и внедрение таких методов в процесс селекции для ее ускорения. При этом, использование в качестве ключевого селекционного «инструмента» методов молекулярно-генетической идентификации целевых генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки, даст возможность выполнения программ по созданию сортов и гибридов с комплексной устойчивостью к болезням за счет пирамидирования нескольких генов устойчивости (объединение в одном генотипе), что является труднодостижимым при использовании классического фитопатологического тестирования [3, 4, 5].

Одним из самых распространенных вирусных заболеваний томата является вирус табачной мозаики (ВТМ). При заражении ВТМ потери урожая

достигают более 50%. Заболевание характеризуется появлением мозаичной окраски листьев, стеблей и плодов с последующей их деформацией и увяданием. Реакция растения томата на заражение вирусом зависит не только от генетики хозяина (наличия или отсутствия генов Тm), но и от генотипа вируса. ВТМ передается механически и насекомыми.

Есть три доминантных гена 2-х типов устойчивости к вирусу: Тm-1, Тm-2 и Тm-2а. Тm-1, локализованный на хромосоме 5, обеспечивает устойчивость томата к ВТМ на клеточном уровне и не дает полной устойчивости. Ген Тm-2а обеспечивает большую устойчивость к различным штаммам вируса. Гены Тm-2 и Тm-2², локализованные на хромосоме 9, придают устойчивость на тканевом уровне – блокируют передвижение вируса от клетки к клетке, а также вызывают реакцию гиперчувствительности [6, 7].

Заболевание вызывается вирусом, относящимся к группе Tobamovirus. Типичным представителем этой группы является вирус табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus* – ТМV). В прошлом к нему относились и специализированные штаммы, которые повреждают томат. В настоящее время он рассматривается как самостоятельный вирус мозаики томата (*Tomato mosaic virus* – ТоМV). Установлены две расы ТоМV-0 и 1. Вирион этого вируса – палочковидный. Он обладает высокой термоустойчивостью и инактивируется при нагревании до 93°C в течение 10 мин [8].

Цель работы – создать на основе современных биотехнологических подходов (молекулярное маркирование) новые дискретные конкурентоспособные генотипы томата с повышенной устойчивостью к вирусу табачной мозаики, хозяйственно-ценными признаками и адаптированные к почвенно-климатическим условиям выращивания в южных регионах РФ.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг имеющегося селекционного материала томата в отделе овощекртофелеводства и выделить генотипы по комплексу хозяйственно ценных признаков и устойчивости к вирусным болезням. Подобрать родительские формы для гибридизации.

2. Выполнить апробацию SSR-маркеров в количестве не менее 10. Оптимизировать условия ПЦР (экспериментальные параметры) и электрофореза для идентификации целевых генов Тm (устойчивости к вирусу табачной мозаики) в селекционном материале и выполнить ДНК-маркерный скрининг на выборке не менее, чем 50 образцов.

3. Провести гибридизацию ФМС-линий томата с образцами, обладающими устойчивостью к генам-интереса для получения ФМС-линий с генами резистентности к ВТМ.

4. Получить семена отцовских форм – доноров целевых генов для дальнейшего их использования в селекционной работе.

5. При использовании камеры искусственного климата получить F₂-поколение ФМС-линий с генами устойчивости Тm.

Методы

Создание исходного материала томата, устойчивого к вирусу табачной мозаики нового поколения с заданными характеристиками, предполагает серию скрещиваний ФМС-линий типа Врбычанский низкий (ps-2) с донорами устойчивости к ВТМ и дальнейшим отбором в F₂ стерильных форм, обладающих заданными параметрами. В семеноводстве гетерозисных гибридов томата использование линий с признаком функциональной мужской стерильности (ФМС) в качестве материнских компонентов является перспективным способом получения дешевых семян. Этот метод позволяет обеспечить 100% гибридность производимых семян, сократить время на их производство и снизить затраты труда на опыление и маркировку цветов примерно вдвое. Для закрепления признака устойчивости к ВТМ проводится беккросные скрещивания.

Гибридизацию донорных и реципиентных форм томата проводится путём кастрации материнских растений и опыление путём нанесения пыльцы рекуррента на рыльце пестика реципиента [9].

Для молекулярно-генетического исследования ДНК из анализируемых образцов выделяется из свежесрезанной части листовой пластинки растений томата на стадии 4-5 листьев методом СТАВ с модификациями [10].

Экстракция ДНК проводится буфером следующего состава: 1М Tris-HCl (pH 7.5), 5M NaCl, 0.5MEDTA (pH 8.0), 10% SDS. Часть листа (2-3 см) растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5 мл.

Образцы инкубируются при 60°C в течение 31 часа. Затем охлаждаются до комнатной температуры. Супернатант отделяется центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляется 500 мкл лизопрона и оставляется на 10 минут, предварительно перемешав. После этого образцы центрифугируются 5 минут при 12000 об/мин. Полученный осадок промывается 300 мкл 70% этанола, высушивается и

растворяется в 50 мкл 0,1*ТЕ. В ПЦР смесь добавляется по 3 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом [11].

ПЦР проводится по следующему разработанному протоколу:

1) Состав реакционной смеси: 0,05 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов (dNTPs), по 0,3 мМ каждого праймера, 25 мМ KCL, 60 мМ Tris-HCL (pH 8,5), 0,1% Тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 1,5 мМ MgCL₂, 1 единица Taq-полимеразы с 40-50 нг ДНК в конечном объеме 25 мкл [12].

2) Условия ДНК-амплификации: начальная денатурация ДНК при 94°C – 4 минуты, следующие 45 циклов: 30 сек – денатурация при 94°C; 30 сек – отжиг праймеров при T_oC, указанной в таблице 1; 30 сек – элонгация при 72°C; последний цикл синтеза 7 минут при 72°C. Для ДНК-анализа применяются нейтральные кодоминантные микросателлитные маркеры, взятые из литературных источников [12, 13] и базы данных на сайте <https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>, разработанные для оценки уровня полиморфизма у растений *Solanum lycopersicum*. Специфичные праймеры, использованные в исследованиях (табл.1), синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (г. Москва).

ДНК-амплификация проводится на амплификаторах «Терцик» («ДНК-технология», г. Москва) и «BioRad» (производства Германия).

3) Разделение продуктов реакции амплификации проводится методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

4) Визуализация результата электрофоретического разделения продуктов ПЦР проводится в УФ-свете и фотографируется.

Результаты исследований

ДНК-скрининг селекционного материала с использованием высокоинформативных SSR- маркеров сопутствует селекционной схеме для прицельного отбора генотипов, несущих максимальное

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для идентификации генов устойчивости Tm-2 [12, 13]
Table 1. Nucleotide sequence of primers for identification of Tm-2 resistance genes [12, 13]

Маркер	Сиквенс праймеров		Т отжига, °C
	F-праймер 5'-3'	R-праймер 5'-3'	
UMD- 1958	tccgttggtctgtcaatcca	cctcccacaaaaagaccaaa	60
UMD -2060	ttccctggatcatctgtcact	acagcttggtgtgtctgctg	60
UMD- 2781	ttctccttaccctgccttt	ttggcatcattcaacaagaa	60
UMD-88	ggtaatgatggcttctgtgtcctcc	tctgttgatgattctgtgacg	65
Tms 22	tggtgggtggagaaactccc	aggcatttaaaccaatagtagc	55
Tms 9	ttggtaatttatgtcgga	ttgagccaattgattataagt	55
Ssr 63	ccacaacaattccatctca	gctccgccatactgatacg	55
Leef 1Aa	aaataatgacttgccaattg	ctgaaagcagcaacagatttt	55
Tms 37	acaaactcaagataagtaagagc	gtgaattgtgttttaacatgg	55
Est 253712	gaaatgaagctctgacatcaa	tcattgcttgcattgttcacg	55



Рис. 1. Визуализация продуктов ПЦР по локусу LEMDDNa в 2%-ном агарозном геле.
Примечание: Mm – маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Синтол, Россия); 1-4 – неустойчивые формы к BTM; 5-8 – устойчивые линии
Fig. 1. Visualization of PCR products by the LEMDDNa locus in a 2% agarose gel.
Note: Mm is a marker of the molecular weight of 100 bp+1.5 Kb (supplier – comp. Sintol, Russia); 1-4 – unstable forms for BTM; 5-8 – stable lines

число ценных аллелей. В итоге в разы сокращается время, необходимое для вывода на рынок конкурентоспособных селекционных продуктов, вследствие чего снижается себестоимость их производства, что непременно сказывается на цене посевной единицы при их коммерциализации.

Для изучения уровня полиморфизма микросателлитных локусов между устойчивыми и неустойчивыми формами томата, используемыми в качестве родительских форм в селекционной работе, нами апробированы SSR маркеры, взятые из литературных источников и базы данных на сайте <https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/app/page/home> [12, 13, 15].

Отбор маркеров, пригодных для оценки полиморфизма ДНК сортов томата, отличающихся по устойчивости к BTM, проводился на материале, имеющемся в коллекции ФГБНУ «ФНЦ риса».

Некоторые результаты оценки уровня полиморфизма использованных в работе SSR-маркеров между контрастными (устойчивыми/неустойчивыми) фермами томата представлены на рисунках 1-5.

Из рисунка 1 видно, что по данному локусу неустойчивый образец под №3 имеет идентичный ДНК-профиль с устойчивым образцом №7; неустойчивый образец №4 имеет ПЦР-продукт, аналогичный устойчивому образцу №8; ДНК-профили устойчивых образцов № 5 и 6 также отличаются между собой, т.е. нет единообразия ДНК-профилей как у устойчивых образцов между собой, так и у неустойчивых, поэтому данный маркер является не информативным и не эффективным для использования его при идентификации донорных аллелей целевого гена *Tm2a*. Размеры ожидаемых целевых фрагментов – 229 и полученных – 220 и 280.

Рисунок 2 демонстрирует результаты амплификации между контрастными образцами по локусам Est 253712 и Leef1Aa. Как видно, полиморфизм между анализируемыми контрастными образцами по локусу Est 253712 не выявлен. По локусу Leef1Aa из анализируемых неустойчивых образцов идентичный ДНК-профиль имеют только №1 и 4; из устойчивых: № 6, 7, и 8. Таким образом, данные маркеры также не пригодны для визуализации донорных аллелей целевого гена. Размеры ожидаемых целевых фрагментов для маркера Est 253712 – 147 и полученных – 125 и 140. Размеры ожидаемых целевых фрагментов для маркера Leef1Aa – 203 и полученных – 209.

На рисунке 3 видно, что полиморфизм между анализируемыми устойчивыми и неустойчивыми образцами по локусу Ssr63 не выявлен. По локусу Tms 37 четко выявлена аллельная разница между восприимчивыми и резистентными формами тома-

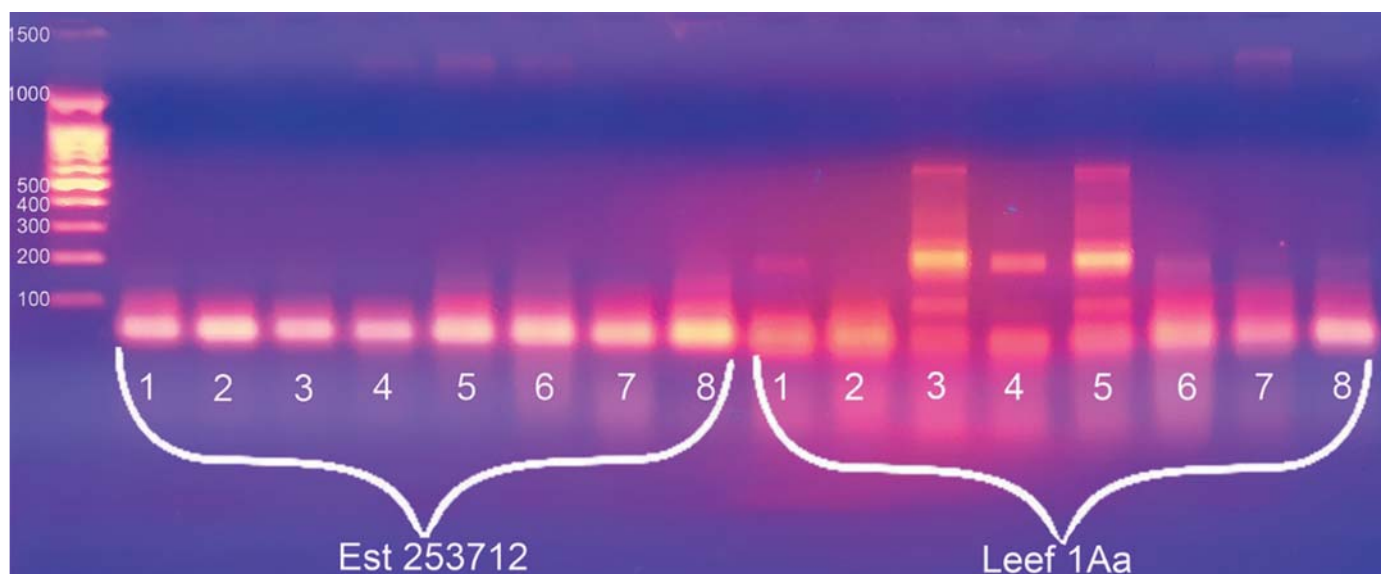


Рис. 2. Визуализация продуктов ПЦР по локусам Est 253712 и Leef1Aa в 2%-ном агарозном геле.
Примечание: Mm – маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Синтол, Россия); 1-4 – неустойчивые формы к BTM; 5-8 – устойчивые линии
Fig.2. Visualization of PCR products by Est 253712 and Leef1Aa loci in a 2% agarose gel.
Note: Mm is a marker of the molecular weight of 100 bp+1.5 Kb (supplier – comp. Sintol, Russia); 1-4 – unstable forms for BTM; 5-8 – stable lines

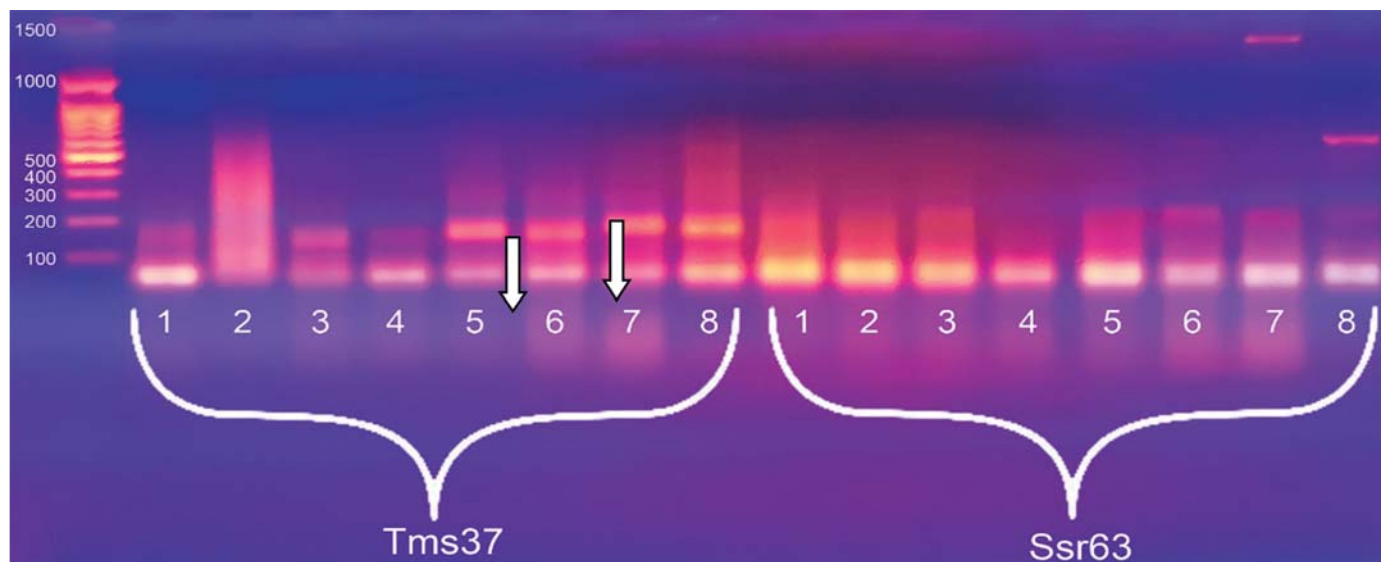


Рис. 3. Визуализация продуктов ПЦР по локусам Tms37 и Ssr63 в 2%-ном агарозном геле.
 Примечание: Mm - маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Синтол, Россия);
 1-4 – неустойчивые формы к BTM; 5-8 – устойчивые линии
Fig. 3. Visualization of PCR products by Tms37 and Ssr63 loci in a 2% agarose gel.
 Note: Mm is a marker of the molecular weight of 100 bp+1.5 Kb (supplier – comp. Sintol, Russia);
 1-4 – unstable forms for VTМ; 5-8 – stable lines

та. Агарозный гель, в котором проводилась визуализация продуктов ПЦР, хоть и является удобным с технической точки зрения, но иногда может не показывать какие-либо минорные компоненты, выявляющие аллельную разницу между контрастными сортами, а при выборе маркерной системы они могут быть полезными в данном направлении, поэтому мы дополнительно провели визуализацию по данным маркерам и в 8%-ном полиакриламидном геле (рис. 5, 6, 7). Размеры ожидаемых целевых фрагментов для маркера Ssr63 – 208 и полученных – 210. Размеры ожидаемых целевых фрагментов для маркера Tms 37 – 191 и полученных – 195.

Рисунок 4 демонстрирует результаты амплификации между контрастными образцами по локусам

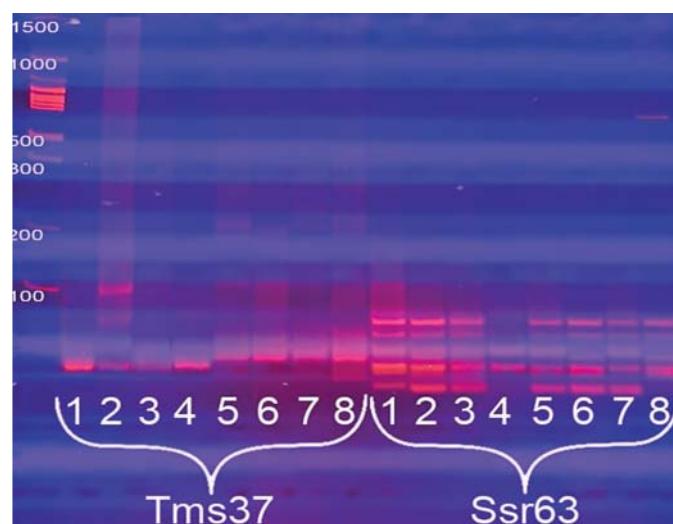


Рис. 5. Визуализация продуктов ПЦР по локусам Tms37 и Ssr63 в 8%-ном ПААГ.
 Примечание: Mm - маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Синтол, Россия); 1-4 – неустойчивые формы к BTM; 5-8 – устойчивые линии
Fig. 5. Visualization of PCR products by Tms37 and Ssr63 loci in 8% PAAG.
 Note: Mm is a marker of the molecular weight of 100 bp+1.5 Kb (supplier – comp. Sintol, Russia);
 1-4 – unstable forms for VTМ; 5-8 – stable lines

Est 253712 и Leef1Aa. Как видно, полиморфизм между анализируемыми образцами по локусу Est 253712 также не выявлен. По локусу Leef1Aa из анализируемых неустойчивых образцов идентичный ДНК-профиль имеют только №1 и 2; из устойчивых: № 6, 7, и 8. Таким образом, данные маркеры также не пригодны для визуализации донорных аллелей целевого гена.

На рисунке 5 показаны результаты визуализации продуктов ПЦР в полиакриламидном геле. На фореграмме видно, что полиморфизм между анализируемыми устойчивыми и неустойчивыми образцами по локусу Ssr63 также отсутствует. Отличие по группам (неустойчивые/устойчивые) показали образцы № 4 и 8. По локусу Tms 37 четко выявлена аллельная разница между восприимчивыми и резистентными формами томата.

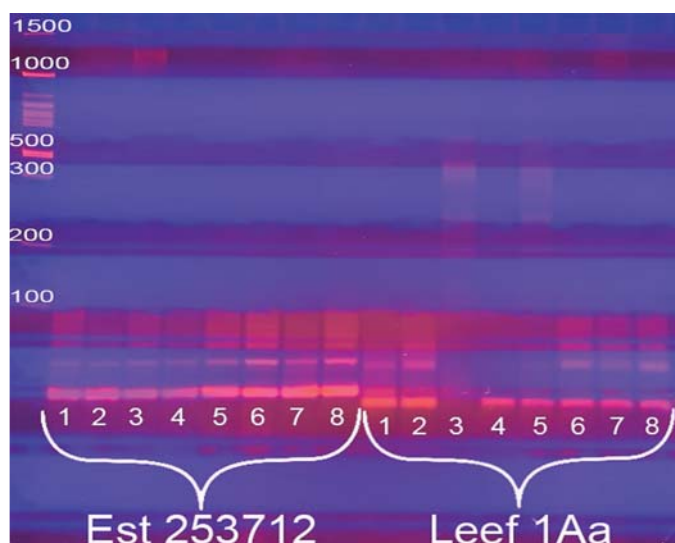


Рис. 4. Визуализация продуктов ПЦР по локусам Est 253712 и Leef1Aa в 8%-ном ПААГ.
 Примечание: Mm - маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Синтол, Россия);
 1-4 – неустойчивые формы к BTM; 5-8 – устойчивые линии
Fig. 4. Visualization of PCR products by Est 253712 and Leef1Aa loci in 8% PAAG.
 Note: Mm is a marker of the molecular weight of 100 bp+1.5 Kb (supplier – comp. Sintol, Russia);
 1-4 – unstable forms for VTМ; 5-8 – stable lines

Создание и вовлечение линий с функциональной мужской стерильностью (генетически чистые гомозиготные материнские формы) с заданными параметрами устойчивости к болезням и адаптивностью к условиям выращивания в процесс гибридизации позволяет создавать высокопродуктивные гетерозисные гибриды, способные конкурировать с зарубежными и отечественными аналогами. С этой целью в задачу любого селекционера входит правильно и эффективно подобрать родительские пары. Для этого мы на основе метода ПЦР с использованием отобранного информативного молекулярного маркера UMD 2060 провели анализ ДНК всех материнских (24 образца) и отцовских (69 образцов) форм – претендентов для гибридизации, с целью выбрать те образцы, которые по ДНК-профилю имели донорный аллель целевого гена *Tm2a*.

Некоторые результаты представлены на рисунках 6-10.

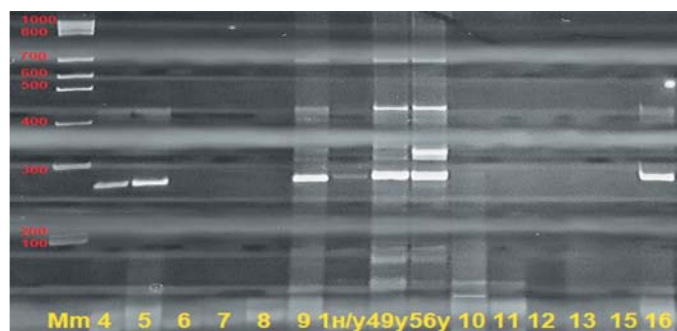


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК по локусу UMD 2060 в 8%-ном ПААГ.
Примечание: Mm – маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Хеликон, Россия); 4...16 – анализируемые материнские растения, 1 – неустойчивая форма; 49 и 56 – донор устойчивости к BTM
Fig. 6. Electrophoregram of genomic DNA amplification products at the UMD 2060 locus in 8% PAAG. Note: Mm is a molecular weight marker 100 bp+1,5 Kb (supplier – comp. Helicon, Russia); 4 ... 16 – analyzed mother plants, 1 – unstable form; 49 and 56 – donor of resistance to TMV

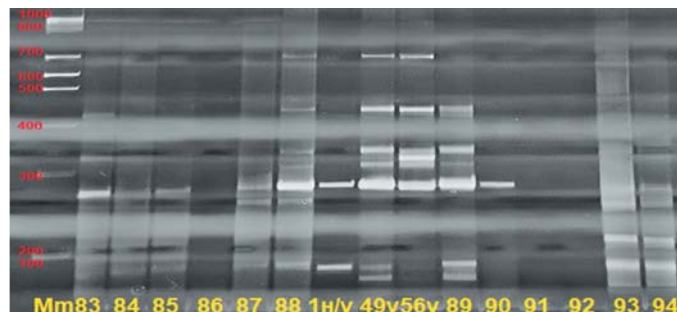


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК по локусу UMD 2060 в 8%-ном ПААГ.
Примечание: Mm – маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Хеликон, Россия); 83...94 – анализируемые материнские растения, 1 – неустойчивая форма; 49 и 56 – донор устойчивости к BTM
Fig. 7. Electrophoregram of genomic DNA amplification products at the UMD 2060 locus in 8% PAAG. Note: Mm is a molecular weight marker 100 bp+1,5 Kb (supplier – comp. Helicon, Russia); 83...94 – analyzed mother plants, 1 – unstable form; 49 and 56 – donor of resistance to TMV

Из рисунка 6 видно, что образцы под № 4, 5, 9 и 16 имеют ДНК-профиль, как у устойчивых донорных образцов. Они были включены в гибридизацию в качестве материнских форм. Размеры ожидаемых целевых фрагментов – 159 и полученных – 280.

На рисунке 7 видно, что только образцы №83 и 88 имеют ДНК-профиль, как у донорных линий. Размеры ожидаемых целевых фрагментов – 159 и полученных – 280.

Размеры ожидаемых целевых фрагментов для маркера UMD 2060 – 159 и полученных – 160.

Размеры ожидаемых целевых фрагментов для маркера UMD 2060 – 159 и полученных – 160.

В гибридизацию в качестве отцовских форм из всех проанализированных образцов включены № 37, 65, 70, 82, 49, 56.

На рисунках 10, 11 представлены результаты гибридизации донорных и реципиентных форм томата в камерах искусственного климата.

В настоящее время полученный гибридный селекционный материал с генами-интереса выса-

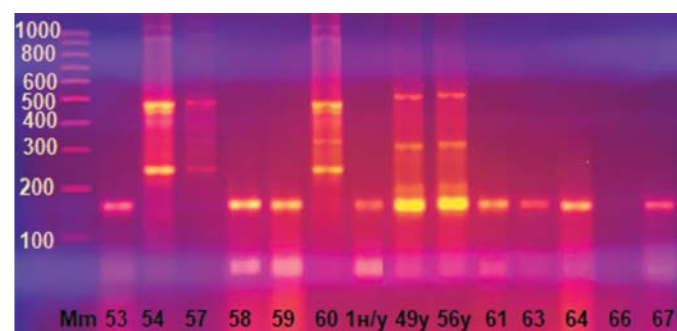


Рис. 8. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК по локусу UMD 2060 в 2%-ном агарозном геле.

Примечание: Mm – маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kbp (поставщик – комп. Хеликон, Россия); 53...67 – анализируемые отцовские растения, 1 – неустойчивая форма; 49 и 56 – донор устойчивости к BTM
Fig. 8. Electrophoregram of genomic DNA amplification products at the UMD 2060 locus in a 2% agarose gel. Note: Mm is a molecular weight marker 100 bp+1,5 Kb (supplier – comp. Helicon, Russia); 53...67 – analyzed paternal plants, 1 – unstable form; 49 and 56 – donor of resistance to TMV

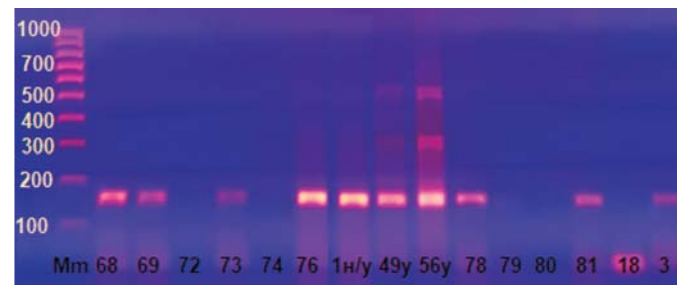


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК по локусу UMD 2060 в 2%-ном агарозном геле

Примечание: Mm – маркер молекулярной массы 100 bp+1,5 Kb (поставщик – комп. Хеликон, Россия); 68...3 – анализируемые отцовские растения, 1 – неустойчивая форма; 49 и 56 – донор устойчивости к BTM
Fig. 9. Electrophoregram of genomic DNA amplification products at the UMD 2060 locus in a 2% agarose gel. Note: Mm is a molecular weight marker 100 bp+1,5 Kb (supplier – comp. Helicon, Russia); 68...3 – analyzed paternal plants, 1 – unstable form; 49 and 56 – donors of resistance to TMV



Рис. 10 (а,б). Гибридизация донорных и реципиентных форм томата
Fig. 10 (a,b). Hybridization of donor and recipient forms of tomato



Рис. 11 (а,б). Получение гибридного селекционного материала томата
Fig. 11 (a,b). Obtaining a hybrid tomato breeding material

жен в открытый грунт на оценку по устойчивости к ВТМ, по результатам которой будут отобраны резистентные формы и вовлечены в последующие звенья селекционного процесса. Результаты проведённой фенотипической оценки будут сравниваться с результатами проведенных ПЦР-анализов.

Заключение

В результате научных исследований проведен скрининг имеющегося селекционного материала томата в отделе овощекартофелеводства и по результатам ДНК-анализа и по комплексу хозяйственно-ценных признаков выделены генотипы, устойчивые к Tobacco Mosaic Virus. Подобраны

родительские формы для гибридизации. Выполнена апробация SSR-маркеров и оптимизированы условия ПЦР (экспериментальные параметры) для идентификации целевых генов *Tm* (устойчивости к вирусу табачной мозаики) в селекционном материале. Отобрано два информативных молекулярных маркера *Tms 37* и *UMD 2060*, которые выявляют аллельную разницу

между устойчивыми и восприимчивыми образцами. Проведена гибридизация ФМС-линий томата с образцами, обладающими устойчивостью к генам-интереса для получения ФМС-линий с генами резистентности к ВТМ. Получены семена отцовских форм – доноров целевых генов для дальнейшего их использования в селекционной работе.

Об авторах:

Олеся Леонидовна Горун – младший научный сотрудник лаб. информационных, цифровых и биотехнологий, olesyagorunflash@gmail.com

Елена Викторовна Дубина – доктор биол. наук, зав. лаб. информационных, цифровых и биотехнологий, lenakrug1@rambler.ru

Ирина Викторовна Козлова – научный сотрудник отдела овощекртофелеводства

Иван Валерьевич Баянский – зам. директора

Сергей Валентинович Гаркуша – доктор с.-х. наук, профессор, врио директора

About the authors:

Olesya L. Gorun – Junior Researcher of the Laboratory of Information, Digital and Biotechnologies, olesyagorunflash@gmail.com

Elena V. Dubina – Doc. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Information, Digital and Biotechnologies, lenakrug1@rambler.ru

Irina V. Kozlova – Researcher of the Department of vegetable and potato growing

Ivan V. Balyasny – Deputy Director

Sergey V. Garkusha – Doc. Sci. (Agriculture), Professor, Acting Director

• Литература

1. Гавриш С.Ф., Будилин М.В. Использование молекулярных маркеров при создании гибридов томата, устойчивых к грибным заболеваниям. *Гавриш*. 2016;(6):24-33.
2. Arens P. et al. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and applied genetics*. 2010;120(3):655-664. DOI:10.1007/s00122-009-1183-2
3. Barone A., Frusciante L. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Marker-assisted selection: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. *Food & Agriculture Org. Ed. Elcio P. Guimarães*. 2007;(9):151-164.
4. Foolad M.R., Sharma A. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *ISHS Acta Horticulturae*. 2005;(695):225-240.
5. Будилин М.В. Обыкновенное чудо. Молекулярные маркеры в современной селекции. *Гавриш дайджест. Технологии*. 2015. С.149-151.
6. Foolad M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007(2):64358. DOI:10.1155/2007/64358
7. Panthee G.R., Brown A.F., Yousef G.G., Ibrahe R., Anderson C. Novel molecular marker associated with Tm2a gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato. *Plant Breeding*. 2013;(132):413-416.
8. Shi A. et al. Molecular markers for Tm-2 alleles of Tomato mosaic virus resistance in tomato. *American Journal of Plant Sciences*. 2011;2(02):180.
9. Нгуен Т.Л. Комбинаторная способность стерильных индетерминантных и фертильных детерминантных линий томата с групповой устойчивостью к заболеваниям. 2015.
10. Мюррей М.Г. Быстрое выделение высокомолекулярной ДНК растений. *Геном*. 1980;(40):379-378.
11. Буц А.В., Цаценко Л.В. Использование гибридизационных зондов Real-time PCR, на примере маркера гена устойчивости к ВТМ культуры томата. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2020;(158):168-180.
12. Аджиева В.Ф. Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) белорусской и зарубежной селекции. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2010;(11):7-11.
13. Заморзаева И., Барбакер Н. SSR маркеры, созданные на основе кодирующих нуклеотидных последовательностей томата. Селекция и семеноводство овощных культур. 2014;(45.):287-293.
14. Smulders M.J.M. et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 1997;(94):264-272.
15. Aishwarya V., Sharma P.C. UgMicroSatdb: database for mining microsatellites from unigenes. *Nucl. Acids Research*, 2008;(36). Database issue: D53-D56.

• References

1. Gavrish S.F., Budylin M.V. The use of molecular markers in the creation of tomato hybrids resistant to fungal diseases. *Gavrish*. 2016;(6):24-33. (In Russ.)
2. Arens P. et al. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and applied genetics*. 2010;120(3):655-664. DOI:10.1007/s00122-009-1183-2
3. Barone A., Frusciante L. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Marker-assisted selection: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. *Food & Agriculture Org. Ed. Elcio P. Guimarães*. 2007;(9):151-164.
4. Foolad M.R., Sharma A. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *ISHS Acta Horticulturae*. 2005;(695):225-240.
5. Budylin M. V. An ordinary miracle. Molecular markers in modern breeding. *Gavrish digest. Technologies*. Moscow. 2015. pp. 149-151. (In Russ.)
6. Foolad M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007(2):64358. DOI:10.1155/2007/64358
7. Panthee G.R., Brown A.F., Yousef G.G., Ibrahe R., Anderson C. Novel molecular marker associated with Tm2a gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato. *Plant Breeding*. 2013;(132):413-416.
8. Shi A. et al. Molecular markers for Tm-2 alleles of Tomato mosaic virus resistance in tomato. *American Journal of Plant Sciences*. 2011;2(02):180.
9. Nguyen T.L. Combinational ability of sterile indeterminate and fertile determinant tomato lines with group resistance to diseases. 2015. (In Russ.)
10. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Genom.* 1980;(40):379-378. (In Russ.)
11. Butz A.V., Tsatsenko L. V. Using hybridization probes Real-time PCR, on the example of a marker of the gene of resistance to TMV of tomato culture. Polythematic network electronic Scientific Journal of the Kuban State Agrarian University. 2020;(158):168-180. (In Russ.)
12. Adzhieva, V. F. Comparative analysis of polymorphism of microsatellite markers of tomato genotypes (*Solanum lycopersicum* L.) of Belarusian and foreign breeding. *Molecular and Applied genetics*. 2010;(11):7-11. (In Russ.)
13. Zamorzayeva I., Barbakar N. SSR markers created on the basis of coding nucleotide sequences of tomato. *Selection and seed production of vegetable crops*. 2014;(45.):287-293. (In Russ.)
14. Smulders M.J.M. et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 1997;(94):264-272.
15. Aishwarya V., Sharma P.C. UgMicroSatdb: database for mining microsatellites from unigenes. *Nucl. Acids Research*, 2008;(36). Database issue: D53-D56.