

В.Ф. Аджиева¹, С.В. Малышев², Н.А. Некрашевич², Л.А. Мишин³, О.Г. Бабак²,
А.В.Кильчевский²

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ
БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ И СОЗРЕВАНИЕ ПЛОДОВ, ГЕНОТИПОВ ТОМАТА
(*SOLANUM LYCOPERSICUM*) С ПРИМЕНЕНИЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПЦР МАРКЕРОВ**

¹«Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», г. Горки, Беларусь

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

³«Институт овощеводства НАН Беларуси», Минский р-н, п.Самохваловичи.

Введение. Увеличение содержания каротиноидов – одна из главных целей в селекции томата из-за их вклада в повышение биологической ценности получаемой продукции. Каротиноиды, являясь природными антиоксидантами, способны предотвращать негативное воздействие свободных радикалов в клетках человека, что служит основой их использования для снижения вероятности развития онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. Гены биосинтеза каротиноидов модифицируют физиолого-биохимические процессы при созревании плодов, позволяя создавать сорта с измененным и повышенным содержанием каротиноидов. За содержание этих веществ отвечает целый ряд мутантных генов, при этом одни из них (*hp-1*, *hp-2*, *Ip* и *dg*) повышают содержание каротиноидов, другие понижают (*r*, *at* и *sh*), а третьи (*B*, *t* и *gs*) изменяют состав и соотношение [3].

Для практической селекции томата также значительную ценность представляют гены, контролирующие созревание, – *rin*, *nor* и *nor^A*. Формы, несущие перечисленные гены, характеризуются пониженным уровнем дыхания, слабым синтезом этилена, низкой активностью полигалактуроназы, пониженным содержанием каротиноидов и длительным периодом хранения [4 – 6].

По окраске плода и другим фенотипическим признакам, на которые ранее полагались селекционеры, невозможно дать достоверную характеристику генов, которые несет изучаемая форма томата [2]. Тем более, что некоторые признаки весьма противоречивы. Например, окраска плодов томата типа Танжерин схожа с высококаротиновыми формами, несущими ген *B*. При этом оранжевая окраска танжериновых плодов определяется малиновым проликопином и лимонным пигментом ζ -каротином, который лишен А-витаминной активности [2, 7]. Ранее применялся метод определения пигментного состава под микроскопом. Еще в 1913 г. Любименко и Монтеверде установлено, что форма и окраска пластид находятся в прямой зависимости от категории содержащихся в них пигментов [2]. В настоящее время активно используются методы спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии для количественного и качественного определения содержания каротиноидов соответственно [8]. Однако ни один из этих методов не дает информации о том, какими именно генами обусловлен данный фенотип и в каком состоянии они находятся в данной форме.

Использование функциональных ПЦР маркеров как сильного инструмента для быстрой, точной, не связанной с сезонностью идентификации ценных генов позволяет прорабатывать большое количество материала в короткие сроки.

Цель данного исследования – идентификация аллельного состава генов, контролирующих биосинтез каротиноидов и созревание плодов в коллекции генотипов томата, при помощи функциональных ПЦР маркеров при отборе ценных форм для дальнейшего вовлечения их в селекцию.

Материалы и методы исследования. Исходным материалом для исследования

служили 46 генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) с контрастным содержанием каротиноидов и лежкие томаты, полученные из коллекций РУП «Институт овощеводства НАН Беларуси» и УО «БГСХА» (табл.1). ДНК выделяли из листьев растений согласно методике, описанной J. Plaschke et al. [9]. Анализ селекционно-ценных аллелей генов, контролирующих созревание, проводили с использованием функциональных ПЦР маркеров описанным ранее методом [10, 11]. Реакционная смесь для ПЦР (12,5 мкл) включала 50 нг ДНК, 250 нМ каждого праймера, 200 нМ dNTP, 1,5 мМ MgCl₂, 1x PCR буфер "А", 1 ед. Taq полимеразы (Праймтех, Беларусь). Реакцию проводили в амплификаторе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) по программе: 5 мин 94⁰С, 35 циклов 30 с 94⁰С, 30 с 55⁰С, 1 мин 72⁰С и затем 5 мин 72⁰С. Затем образцы разделялись в агарозном или полиакриламидном геле. Агарозные гели фотодокументировали с помощью системы Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Анализ в полиакриламидном геле (7М мочевины, 6 %-ный акриламид / бис-акриламид (19:1), 1x TBE (0,09 М Трис-борат рН 8,3, 2 мМ EDTA), 2 %-ный фотоинициатор (100 мМ 1-гидроксициклогексил-фенил-кетон в этиленгликоле)) выполняли на автоматическом лазерном флуоресцентном секвенаторе ALFexpress II (GE Healthcare, UK). Электрофорез проводили в 1x TBE буфере. 1 мкл продуктов каждой ПЦР реакции смешивали с 4 мкл буфера для нанесения (5 мг/мл голубой декстран в деионизованном формамиде), денатурировали 2 мин при 93⁰С и вносили в гель. Каждая дорожка помимо образца содержала в качестве стандарта фрагменты ДНК известного размера. Размер фрагментов вычисляли путем сравнения с данными стандартами при использовании программы Fragment Analyser 1.02 (GE Healthcare, UK).

Результаты и их обсуждение. Нами были протестированы 24 генотипа томата с контрастной пигментной окраской для выявления аллелей генов, изменяющих состав каротиноидов, с применением функциональных ПЦР маркеров к генам *Beta carotene (B)*, *old-gold (og)*, *old-gold crimson (og^c)*, *tangerine (t)* и гену детерминантного габитуса *self pruning (sp)*, а также 21 генотип – к генам, замедляющим процесс созревание плодов: *ripening inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)* и *alcoçaba (nor^A)*. Результаты генотипирования представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Результаты генотипирования коллекции томата с маркерами к генам *B*, *og^c* и *t*, изменяющим биосинтез каротиноидов, и к гену *sp*, определяющему детерминантный габитус

№ п/п	Название образца	Характеристические продукты ПЦР (рестрикции)				Окраска зрелого плода	Идентифицированные мутантные гены
		BpromF/ BpromR	OgcF/ OgcR	TF/TR	SpF/SpR_ MvaI		
1	Луч	152	140	856	н/т	Оранжевая	<i>B</i>
2	Флайме	152	140	856	~410, ~580	Оранжевая	<i>B</i>
3	Черный принц	143	140	856	н/т	Малиново-бордовая	-
4	Л439 х Желтое сердце	152	140	856	1020	Желтая	<i>B, sp</i>
5	Оранж-1	152	140	856	1020	Розовая	<i>B, sp</i>
6	Carolette	143	140	856	1020	Оранжевая	<i>sp</i>
7	Оранжевый гигант	143	140	508	1020	Ярко-оранжевая	<i>t, sp</i>
8	Девиз	143	140	856	1020	Красная	<i>sp</i>
9	Линия №7741/2	152	140	856	~410, ~580	Оранжевая	<i>B</i>
10	Оранжевый х 24E	143	140	856	1020	Оранжевая	<i>sp</i>
11	Голден элайт	143	140	508	1020	Желто-оранжевая	<i>t, sp</i>
12	Линия №7756/2	152	140	856	1020	Оранжевая	<i>B, sp</i>
13	Оранж х Морковный 20	143	140	856	1020	Красная	<i>sp</i>
14	Айплс	143	139	856	1020	Красная	<i>og^c, sp</i>
15	Yellow охуheart	143	140	508	396, 624	Желто-оранжевая	<i>t</i>

16	Голден санрайз	143	140	856	396, 624	Желтая	-
17	Семко 7803	143	140	856	1020	Красная	<i>sp</i>
18	Бония	143	139	856	1020	Красная	<i>og^c, sp</i>
19	Квадрат гигант	143	140	856	396, 624	Малиновая	-
20	Ронге думонтпе	143	140	856	396, 624	Красная	-
21	Фрайди ред реак	143	140	856	396, 624	Красная	-
22	Ачи гет	143	140	856	1020	Красная	<i>sp</i>
23	Beta	143	140	856	1020	Красная	<i>sp</i>
24	Torosa	143	140	856	1020	Красная	<i>sp</i>

П р и м е ч а н и е : н/т – образец с данным маркером не тестировался. То же для табл. 2.

Три молекулярных маркера были использованы для идентификации аллелей гена, кодирующего фермент хромопласт-специфическую ликопин β-циклазу (CYCB), трансформирующую ликопин в β-каротин. Этот ген расположен на хромосоме 6L, сцеплен с локусом *sp* и был клонирован G. Ronen et al. в 2000 г. [12]. Известен ряд аллелей *CYCB* гена, имеющих селекционную ценность.

Доминантный аллель *B* (*Beta carotene*) повышает содержание β-каротина и окрашивает мякоть плодов в оранжево-красный цвет [12, 13]. Впервые его действие было описано R. Lincoln и J. Porter в 1950 г. [14]. Позднее M. Tomes et al. (1954) описали данный ген как доминантный, но подчиненный действию гена-модификатора *Mo_B* [15]. Как выяснилось далее, ген *B* представляет собой новый аллель гена *CYCB*, который был интрогрессирован из диких видов томата и характеризуется повышенной экспрессией фермента [12]. Для определения присутствия этого аллеля нами была проведена амплификация с использованием SCAR маркера (VpromF/VpromR) к промоторной области гена *CYCB* и последующий вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле. При амплификации с данными праймерами у растений, несущих рецессивный аллель *S. lycopersicum*, образуется фрагмент длиной 143 п.н., тогда как у растений с

мутантным аллелем *B* – 152 п.н. (рис. 1, А).

ПЦР анализ коллекции ДНК генотипов томата позволил выявить фрагмент амплификации, характерный для доминантного аллеля *B*, в следующих образцах: Луч, Флайме, Л439 x Желтое сердце, Оранже-1, линия №7741/2, 7756/2 (табл. 1).

Помимо описанного выше доминантного аллеля гена *СУСВ* для улучшения окраски плодов томата используются рецессивные аллели этого гена *og* и *og^c*. Ген *og* был описан в 1953 г., а *og^c* – в 1967 г. [16]. Клонированы оба гена были в 2000 г. G. Ronen et al. [12]. Два мутантных гена аллельны и имеют схожий фенотип – темно-красные плоды и коричнево-оранжевые цветки. Для плодов мутантов характерно высокое содержание ликопина, так как из-за мутаций в области кодирования и сдвига рамки считывания не происходит формирования функционального фермента [12]. Для генотипирования мутантного аллеля *og* мы использовали CAPS маркер (BF/BR_*DdeI*), однако в изученной коллекции сортов и линий данного гена обнаружено не было. С целью выявления аллеля *og^c* применялся SCAR маркер (OgcF/OgcR) и последующее разделение фрагментов в полиакриламидном геле. В результате амплификации с OgcF/OgcR праймерами были получены фрагменты длиной 139 п.н. (у растений дикого типа) и 140 п.н. (у мутантных растений) (рис. 1, Б). Мутантный ген *og^c* был обнаружен в сортах Айплс и Бония (табл. 1).

Генотипирование *t* проводили с использованием SCAR маркера (TF/TR) с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле. Ген *tangerine* – рецессивная мутация, приводящая к окрашиванию плодов и тычинок томата в оранжевый цвет благодаря аккумуляции ζ -каротина и проликопина вместо всех форм транс-ликопинов, которые нормально синтезируются в плодах дикого типа

[13, 3, 2, 7]. Данная мутация была впервые описана J. MacArthur в 1934 г. [16], а также L. Zechmeister и др. в 1941 г. [17]. Клонирован мутантный ген был T. Isaacson et al. в 2002 г. [18]. Танжериновый фенотип определяется геном CRTISO, кодирующим изомеразу каротиноидов, трансформирующую каротиноиды из цис- в транс-формы. У мутантного аллеля *tangerine* делетирован участок в промоторной области гена, приводящий к нарушению транскрипции, в результате чего происходит нарушение экспрессии функционального фермента [18]. В результате делеции 348 п.н. у мутанта *t* амплифицируются фрагменты 508 п.н., а не 856 п.н. как у растений дикого типа (рис. 1, С). В результате тестирования мутантный ген был обнаружен у сортов томата Оранжевый гигант, Голден элайт и Yellow oхуheart (табл. 1).

Дополнительно был проведен анализ коллекции на наличие гена *sp*, определяющего детерминантный габитус растения. Этот ген, обнаруженный С.Д. Соорег в 1914 г. [13], модифицирует габитус растения томата, в результате происходит более компактное размещение репродуктивных органов на стебле [3]. Мутантный ген *sp* расположен на 6-ой хромосоме, сцеплен с локусом *B*, и был клонирован L. Carmel-Gorenen et al. в 2003 г. [19]. Мутация вызвана заменой одиночного нуклеотида (SNP), который приводит к аминокислотной замене и появлению нефункционального белка [19]. Для идентификации мутантной аллели *sp* мы использовали CAPS маркер (SpF/SpR) с последующей рестрикцией по *MvaI*. Наличие сайта рестрикции для фермента *MvaI* у растений с нормальным типом роста (габитусом) приводит к образованию характеристических фрагментов размером 624 и 396 п.н. У мутантных растений этот сайт отсутствует, вследствие

чего образуется фрагмент длиной 1 020 п.н. Интересно отметить, что у двух линий, содержащих ген *B*, были получены слегка отличные по размеру фрагменты рестрикции, что свидетельствует о наличии дополнительного ДНК-полиморфизма по гену *sr*. Причиной этого, вероятно, является присутствие у данных линий более длинных интрогрессированных сегментов хромосомы 6 из диких видов томата, затрагивающих как ген *B*, так и близко сцепленный с ним ген *sr* (рис. 2). Среди 22 изученных по этому маркеру образцов нашей коллекции мутантный ген *sr* был обнаружен у 15 (табл. 1).

Еще одна группа генотипов томата была изучена для выявления наличия селекционно-ценных аллелей генов, контролирующих созревание плодов – *rin*, *nor* и *nor^A* (табл. 2).

Таблица 2. Результаты генотипирования коллекции томата с применением функциональных ПЦР маркеров к генам, контролирующим созревание плодов

№ п/п	Линия	Характеристические продукты ПЦР (рестрикции)			Идентифицированные мутантные гены
		RinF/RinmR	NorF/NorR	dAlcF/dAlcR_ BspMI	
1	Mo 577	405	161	246	<i>Rin</i>
2	Mo 948	-	159	246	<i>Nor</i>
3	Mo 950	-	161	212	<i>nor^A</i>
4	Линия 18/6	-	159	н/т	<i>Nor</i>
5	Линия 18/9	405	161	н/т	<i>Rin</i>
6	Линия 19/0-б	405	161	н/т	<i>Rin</i>
7	Линия 19/1	-	159	н/т	<i>Nor</i>
8	Линия 19/6	405	161	н/т	<i>Rin</i>
9	Линия 19/0-з.п	405	161	н/т	<i>Rin</i>
10	Линия 18/7	405	161	н/т	<i>Rin</i>
11	Линия 19/3-ж	-	159	н/т	<i>Nor</i>
12	Линия 19/7	405	161	н/т	<i>Rin</i>
13	Линия 19/3	-	161	246	-
14	Линия 19/8	405	161	н/т	<i>Rin</i>
15	Линия №1	405	161	н/т	<i>Rin</i>
16	Линия №2	405	161	н/т	<i>Rin</i>
17	Линия №3	-	161	212	<i>nor^A</i>
18	Линия №5	-	161	246	-
20	Линия №11	405	161	н/т	<i>Rin</i>
21	Линия 18/9	-	161	246	Wt

Эти гены представляют значительную ценность для практической селекции томата на лежкость. Они имеют достаточно выраженный фенотипический эффект в гетерозиготе, что позволяет существенно улучшать товарные и технологические качества плодов томата [5, 20 – 22]. Для гена *rin* характерна желтая окраска плода и ранняя диагностика по увеличенным чашелистикам цветка и недетерминированным соцветиям. Плоды мутанта *rin* хранятся в нерегулируемых условиях 63 – 92 дня [21]. Плоды другого мутанта *nor* могут сохраняться при комнатной температуре в течение 4 – 8 месяцев [22]. Локусы *rin* и *nor* были картированы на генетической карте томата J. Giovannoni et al. в 1995 г. на 5-ой и 10-ой хромосомах соответственно [23].

Для идентификации образцов, несущих ген *rin*, использовали SCAR маркер (RinF/RinmR) с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле. Ген *MADS-RIN* кодирует фактор транскрипции, генетически регулирующий процессы созревания на ранней стадии, еще до активного биосинтеза этилена и климактерического подъема дыхания [6]. У мутантного аллеля делегирован участок ДНК размером 1,7 т.п.н. В случае, когда эта делеция присутствует, использованные нами праймеры дают ПЦР продукт длиной 405 п.н. (рис. 3, А). Тестирование коллекции линий томата позволило обнаружить мутантный ген *rin* у формы Мо 577 и линий 18/9, 19/0-б, 19/6, 19/0-з.п., 18/7, 19/7, 19/8, №1, №2 и №11 (табл. 2).

Для анализа мутантного гена *nor* применялся SCAR маркер с последующим разделением образцов в полиакриламидном геле. В данном случае мутация вызвана короткой делецией (2 п.н.) в третьем экзоне гена *NAC-NOR*, приводящей

к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белка [23]. Поэтому использование пары праймеров NorF/NorR, фланкирующих эту мутацию, дает продукты амплификации – 161 п.н. у нормального аллеля и 159 п.н. у аллеля *nor* (рис. 3, С). В результате генотипирования аллель *nor* был обнаружен в линиях Мо 948, 18/6, 19/1 и 19/3 (табл. 2).

Ген *nor^A* (*syn alc*) в сравнении с генами *nor* и *rin* характеризуется наиболее выраженной красной окраской плодов томата, что свидетельствует о минимальном его ингибирующем действии на биосинтез каротиноидов [5]. Данное его свойство может быть очень полезно в селекции лежких гибридов с лучшими (в отношении окраски плода) потребительскими качествами. Недавно С.В. Малышевым и др. [10, 11] удалось показать, что ген *nor^A* является новой аллельной формой *LeNAC-NOR* гена. Авторами была идентифицирована точечная мутация во втором экзоне, приводящая к аминокислотной замене валин-аспарагин [10]. Для поиска аллеля *nor^A* был использован dCAPS маркер с последующей рестрикцией по *Bsp*MI. Обработка ПЦР продукта длиной 246 п.н. этой рестрикционной эндонуклеазой приводит к образованию более короткого фрагмента 212 п.н. у мутантных форм (рис. 3, В). Исследование селекционных линий с помощью этого маркера позволило обнаружить ген *nor^A* в образцах Мо 950 и линии №3 (табл. 2).

Таким образом, нами был проведен молекулярно-генетический анализ коллекции томата, поступившей из БГСХА и РУП «Институт овощеводства», на присутствие генов, контролирующих созревание плодов (*rin*, *nor*, *nor^A*), генов, детерминирующих содержание каротиноидов (*B*, *og*, *og^c*, *t*) и мутантного гена *sp*.

В результате генотипирования нами были выявлены ценные формы-доноры генов, улучшающих качество продукции и повышающих её биологическую ценность.

Заключение. Проведенное исследование показало, что применение ПЦР маркеров позволяет эффективно выявлять хозяйственно полезные мутантные гены в коллекционных образцах томата без проведения длительного и затратного фенотипического и биохимического анализа. Применение эффективных молекулярно-генетических приемов в сочетании с традиционными методами селекции томата позволит повысить эффективность и скорость длительного и трудоемкого селекционного процесса.

Литература

1. S h i J., M a g u e r M. // Critical reviews in science and nutrition. 2000. Vol. 40, № 1. P. 1 – 42.
2. Г р и г о р о в с к а я М.В. Каротиновые томаты. Кишинев, 1981.
3. К у з ё м е н с к и й А.В. Селекционно-генетические исследования мутантных форм томата. Харьков, 2004.
4. Г а в р и ш С.Ф., К о р о л ь В.Г. // Изв. ТСХА. Вып. 1. 1991. С. 118–132.
5. К у з ь о м е н с ь к и й А.В. // Цитология и генетика. 2007. № 6. С. 34–43.
6. V r e b a l o v J., R u e z i n s k y D., P a d m a n a b h a n V. et al. // Science. 2002. Vol. 296. P. 343–346.
7. А н д р ю щ е н к о В.Н., В ы р о д о в а А.П., З а т у л и в е т е р В.И. и др. Повышенное содержание витаминов в плодах томата. Кишинев, 1983.
8. Б у л д а О.В., Р а с с а д и н а В.В., А л е к с е й ч у к Г.Н., Л а м а н Н.А. //

- Физиология растений. 2008. Т. 55, №4. С. 604–611.
9. P l a s c h k e J., G a n a l M.W., R ö d e r M.S. // Theor. Appl. Genet. 1995. Vol. 91. P. 1001–1007.
 10. M a l y s h e v S., N e k r a s h e v i c h N., B a b a k O., K i l c h e v s k y A. // The 5th Solanaceae Genome Workshop 2008, Cologne, 12–16 Oct. 2008 / Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research. Cologne, Germany, 2008. P. 268.
 11. М а л ы ш е в С.В., Н е к р а ш е в и ч Н.А., Б а б а к О.Г., К и л ь ч е в с к и й А.В. // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы VI Междунар. науч. конф., Минск, 3–6 декабря 2008 г. Мн., 2008. с.126–128.
 12. R o n e n G., C a r m e l-G o r e n L., Z a m i r D., H i r s c h b e r g G. // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97, № 20. P. 11102–11107.
 13. Ж у ч е н к о А.А. Генетика томатов. – Кишинев, 1973.
 14. А в д е е в Ю.И. Селекция томатов. Кишинев, 1982.
 15. Y i p i n g Z., S t o m m e l J.R. // Crop Sci. 2001. Vol. 41. P.1602–1608.
 16. L a b a t e J.A. // Genome mapping and molecular breeding in plants. 2007.Vol. 5. С. 1–126.
 17. E c k a r d t N.A. // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 289–292.
 18. I s a a c s o n T., R o n e n G., Z a m i r D., H i r s c h b e r g J. // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 333–342.
 19. C a r m e l-G o r e n L., L i u Y.-S., L i f s c h i t z E., Z a m i r D. // Plant Mol. Biol. 2003. Vol. 52. P. 1215–1222.
 20. К у з ь о м е н с ь к и й А.В., Н а д т о ч и й Л.Ю. // Веснік Харківського універ.

- ім. В.Н. Карзіна. Серія: Біологія. 2006. Вип. 4, № 748. С. 65–72.
21. Е р ь о м е н к о В.В., К р а в ч е н к о В.А., К у з ь о м е н с к и й О.В. // Овочівництво і баштанництво. 2001. Вип. 45. С. 49–58.
22. Г а в р и ш С.Ф., А в и л о в а С.В. // Прогрессивные приемы в технологии и семеноводстве овощных культур: сб. науч. тр. М., 1987. С. 89–97.
23. G i o v a n n o n i J.J. // Plant Cell. 2004. Vol. 16. P. S170–S180.

В.Ф. Аджиева, С.В. Малышев, Н.А. Некрашевич, Л.А. Мишин, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ
БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ И СОЗРЕВАНИЕ ПЛОДОВ, ГЕНОТИПОВ ТОМАТА С
ПРИМЕНЕНИЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПЦР МАРКЕРОВ**

Резюме. Коллекция из 45 сортов и селекционных линий томата была изучена на наличие мутантных аллелей генов, контролирующих биосинтез каротиноидов – *Beta carotene (B)*, *old-gold (og)*, *old-gold crimson (og^c)*, *tangerine (t)*; созревание плодов томата – *ripening inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)*, *alcobaça (nor^A)*; а также детерминантный габитус – *self pruning (sp)*, с применением функциональных ПЦР маркеров. По результатам ДНК-генотипирования были отобраны формы, несущие хозяйственно-полезные гены, для включения в селекционный процесс.

Ajyieva V., Malyshev S., Nekrashevich N., Michin L., Babak O., Kilchevsky A.

IDENTIFICATION OF ALLELIC COMPOSITION OF THE GENES DETERMINING CAROTENOID BIOSYNTHESIS AND FRUIT RIPENING OF TOMATO CULTIVARS AND BREEDING LINES WITH APPLICATION OF FUNCTIONAL PCR MARKERS

Summary. A collection of 45 tomato cultivars and breeding lines was studied for presence of mutant alleles of the genes determining carotenoid biosynthesis – *Beta* carotene (*B*), *old-gold* (*og*), *old-gold crimson* (*og^c*), *tangerine* (*t*); fruits ripening – *ripening inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*), *alcobaça* (*nor^A*); and also determinant growth habit – *self pruning* (*sp*) with an application of functional PCR-based markers. Based on results of DNA-genotyping, the accessions carrying valuable alleles were selected and further used for introduction to breeding process.

Реферат на статью: Аджиева, Малышев, Некрашевич, Мишин, Бабак, Кильчевский **«Идентификация аллельного состава генов, контролирующих биосинтез каротиноидов и созревание плодов, генотипов томата с применением функциональных ПЦР маркеров».** Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2010. №3. С.

Сочетание методов молекулярной генетики и традиционной селекции является оптимальным способом эффективного удовлетворения требований, которые сегодня предъявляются к современному процессу селекции. ПЦР функциональные маркеры позволяют диагностировать аллельный состав изучаемой формы на разных этапах развития, что ускоряет селекционный процесс и повышает его эффективность. На основе проведенных исследований авторами впервые в условиях Беларуси изучена идентификация аллельного состава генов, контролирующих биосинтез каротиноидов и созревание плодов в коллекции генотипов томата при помощи функциональных ПЦР маркеров с целью отбора ценных форм для дальнейшего вовлечения их в селекционный процесс.

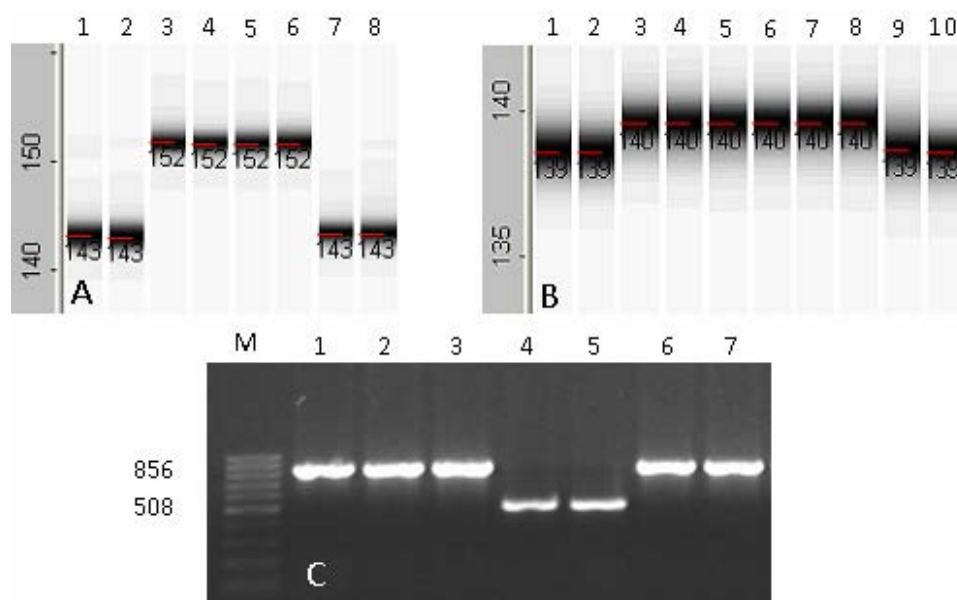


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК сортов и линий томата с функциональными SCAR маркерами к генам *B*, *og^c* и *t*, изменяющим содержание каротиноидов в плодах. А – BpromF/BpromR маркер: 1, 2 – Оранжевый гигант (*t*, *sp*), 3, 4 – Флайме (*B*), 5, 6 – Луч (*B*); В – OgcF/OgcR маркер: 1, 2 – Айплс (*og^c*, *sp*), 3, 4 – Yellow oxheart (*t*), 5, 6 – Голден санрайс, 7, 8 – Семко 7803 (*sp*), 9, 10 – Бония (*og^c*, *sp*); С – TF/TR маркер: 1 – Флайме (*B*), 2, 3 – Оранжевый х 24Е (*sp*), 4, 5 – Оранжевый гигант (*t*, *sp*), 6, 7 – Девиз (*sp*). М – маркер молекулярного веса

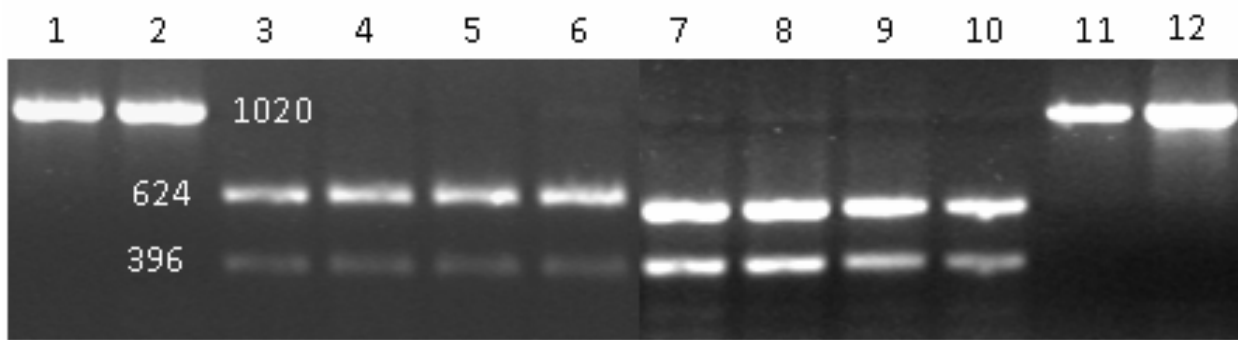


Рис. 2. Продукты амплификации ДНК сортов и линий томата с праймерами SpF/SpR и последующей рестрикции по *MvaI*. 1, 2 – Бония (*og^c*, *sp*), 3, 4 – Квадрат гигант, 5, 6 – Ронге думонтпе, 7, 8 – линия 7741/2 (*B*), 9, 10 – Флайме (*B*), 11, 12 – Оранжевый х 24Е (*sp*)

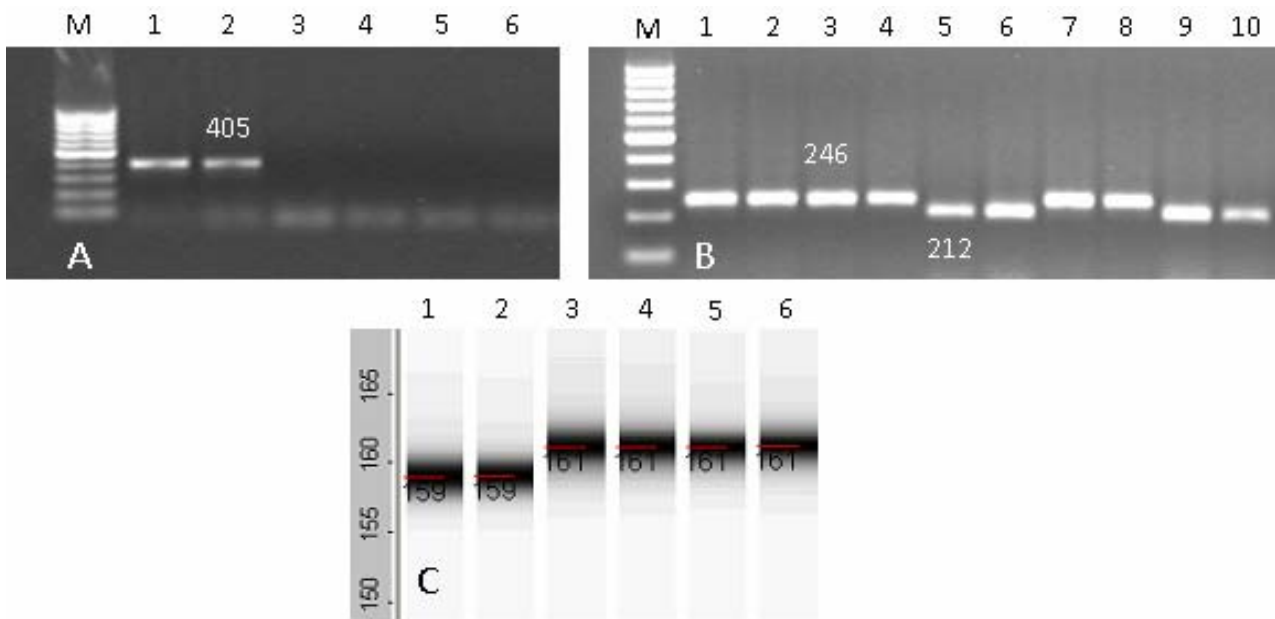


Рис. 3. Результаты ПЦР амплификации ДНК сортов и линий томата с праймерами к генам созревания *rin*, *nor* и *nor^A*. А – SCAR маркер (RinF/RinmR): 1, 2 – Мо 577 (*rin*), 3, 4 – Мо 948 (*nor*), 5, 6 – Мо 950 (*nor^A*); В – dCAPS маркер (dAlcF/dAlcR_BspMII): 1, 2 – Мо 577 (*rin*), 3, 4 – Мо 948 (*nor*), 5, 6 – Мо 950 (*nor^A*), 7, 8 – линия 18/6 (*nor*), 9, 10 – линия №3 (*nor^A*); С – SCAR маркер (NorF/NorR): 1, 2 – Мо 950 (*nor^A*), 3, 4 – Мо 948 (*nor*), 5, 6 – линия 19/1 (*nor*). М – маркер молекулярного веса