

В.Ф. Аджиева<sup>1</sup>, С.В. Малышев<sup>2</sup>, Н.А. Некрашевич<sup>2</sup>, Л.А. Мишин<sup>3</sup>, О.Г. Бабак<sup>2</sup>,  
А.В.Кильчевский<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>«Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», г. Горки, Беларусь

<sup>2</sup>«Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

<sup>3</sup>«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<sup>A</sup>*. 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 высококароотиновыми формами, несущими ген *B*. При этом оранжевая окраска танжериновых плодов определяется малиновым проликопином и лимонным пигментом  $\zeta$ -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 MgCl<sub>2</sub>, 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 94<sup>0</sup>С, 35 циклов 30 с 94<sup>0</sup>С, 30 с 55<sup>0</sup>С, 1 мин 72<sup>0</sup>С и затем 5 мин 72<sup>0</sup>С. 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 93<sup>0</sup>С 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<sup>c</sup>)*, *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 *alcobaça (nor<sup>A</sup>)*. Результаты генотипирования представлены в табл. 1 и 2.

**Таблица 1. Результаты генотипирования коллекции томата с маркерами к генам *B*, *og<sup>c</sup>* 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<sup>c</sup>, 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<sup>c</sup>, 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  $\beta$ -циклазу (CYCB), трансформирующую ликопин в  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sub>B</sub>* [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, Оранж-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<sup>c</sup>*. Ген *og* был описан в 1953 г., а *og<sup>c</sup>* – 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\_ *Dde*I), однако в изученной коллекции сортов и линий данного гена обнаружено не было. С целью выявления аллеля *og<sup>c</sup>* 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<sup>c</sup>* 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  $\zeta$ -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]. Танжеринный 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<sup>A</sup>* (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<sup>A</sup></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<sup>A</sup></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<sup>A</sup>* (*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<sup>A</sup>* 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<sup>A</sup>* 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<sup>A</sup>* 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<sup>A</sup>*), генов, детерминирующих содержание каротиноидов (*B*, *og*, *og<sup>c</sup>*, *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<sup>c</sup>)*, *tangerine (t)*; созревание плодов томата – *ripening inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)*, *alcobaça (nor<sup>A</sup>)*; 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<sup>c</sup>*), *tangerine* (*t*); fruits ripening – *ripening inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*), *alcobaça* (*nor<sup>A</sup>*); 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.



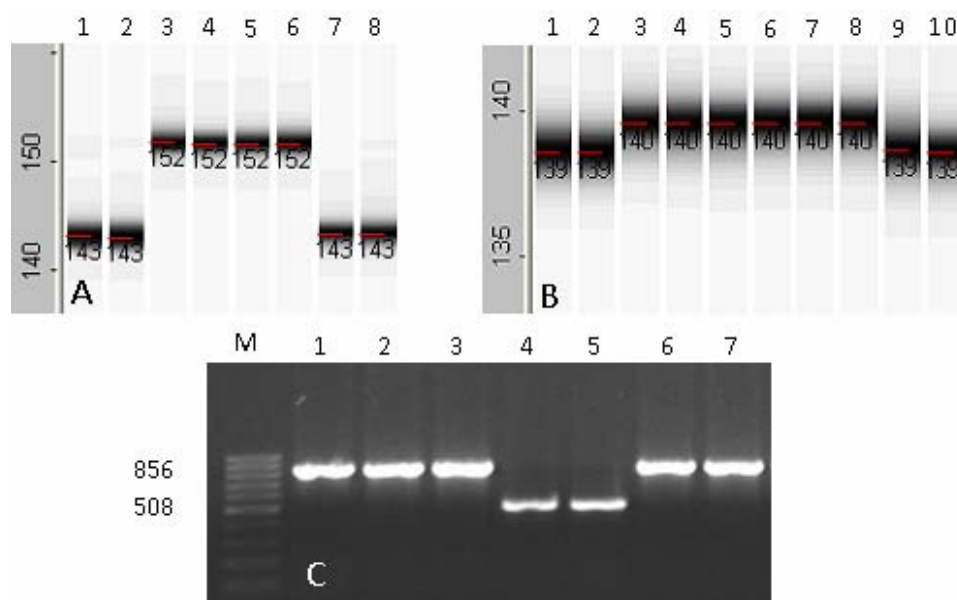


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК сортов и линий томата с функциональными SCAR маркерами к генам *B*, *og<sup>c</sup>* и *t*, изменяющим содержание каротиноидов в плодах. А – BpromF/BpromR маркер: 1, 2 – Оранжевый гигант (*t*, *sp*), 3, 4 – Флайме (*B*), 5, 6 – Луч (*B*); В – OgcF/OgcR маркер: 1, 2 –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

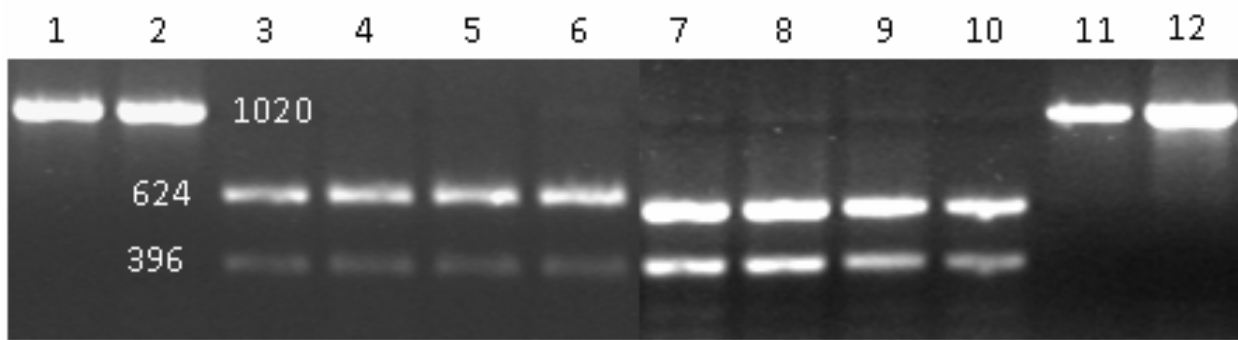


Рис. 2. Продукты амплификации ДНК сортов и линий томата с праймерами SpF/SpR и последующей рестрикции по *MvaI*. 1, 2 – Бония (*og<sup>c</sup>*, *sp*), 3, 4 – Квадрат гигант, 5, 6 – Ронге думонтпе, 7, 8 – линия 7741/2 (*B*), 9, 10 – Флайме (*B*), 11, 12 – Оранжевый х 24Е (*sp*)

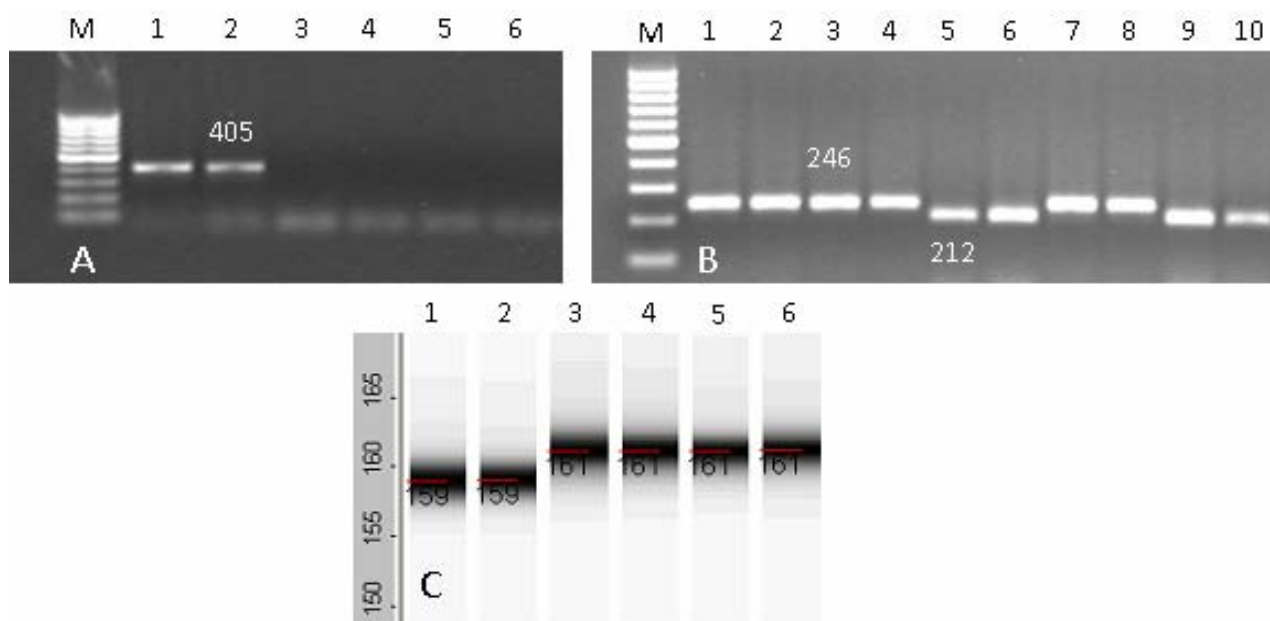


Рис. 3. Результаты ПЦР амплификации ДНК сортов и линий томата с праймерами к генам созревания *rin*, *nor* и *nor<sup>A</sup>*. А – SCAR маркер (RinF/RinmR): 1, 2 – Мо 577 (*rin*), 3, 4 – Мо 948 (*nor*), 5, 6 – Мо 950 (*nor<sup>A</sup>*); В – dCAPS маркер (dAlcF/dAlcR\_BspMII): 1, 2 – Мо 577 (*rin*),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