

«ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ ТОМАТА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПЦР МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ КАЧЕСТВО ПЛОДОВ»



В.Ф. Аджиева¹, С.В. Малышев², В.М. Беляков³, Л.А. Мишин⁴, А.В. Кильчевский²

¹УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»

²ГНУ «Институт генетики и цитологии НАНБ»

³ ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси»

⁴РУП «Институт овощеводства».

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОВОДИМЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Селекция на качество плодов томата

- создание генотипов с повышенным содержанием каротиноидов :

гены *Ip*, *hp-1*, *hp-1w*, *hp-2*, *hp-2j* и *hp-2dg* повышают содержание каротиноидов.

гены *r*, *at*, *sh* понижают содержание каротиноидов.

гены *Del*, *B*, *t*, *gs* изменяют состав и соотношение каротиноидов.

- создание генотипов с пролонгированным периодом хранения плодов.

Гены, контролирующие созревание плодов томата – *rin*, *nor* и *nor^A*

Генотипирование с применением функциональных ПЦР маркеров:

- идентификация на ранних стадиях развития (семена, проростки)

- точность, скорость

- отсутствие сезонности в работе

- тестирование большого объема материала в короткие сроки.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

■ Генотипирование коллекции томата с применением функциональных ПЦР маркеров к генам, изменяющим биосинтез каротиноидов и созревание плодов томата, и выделение образцов, несущих ценные мутантные гены.

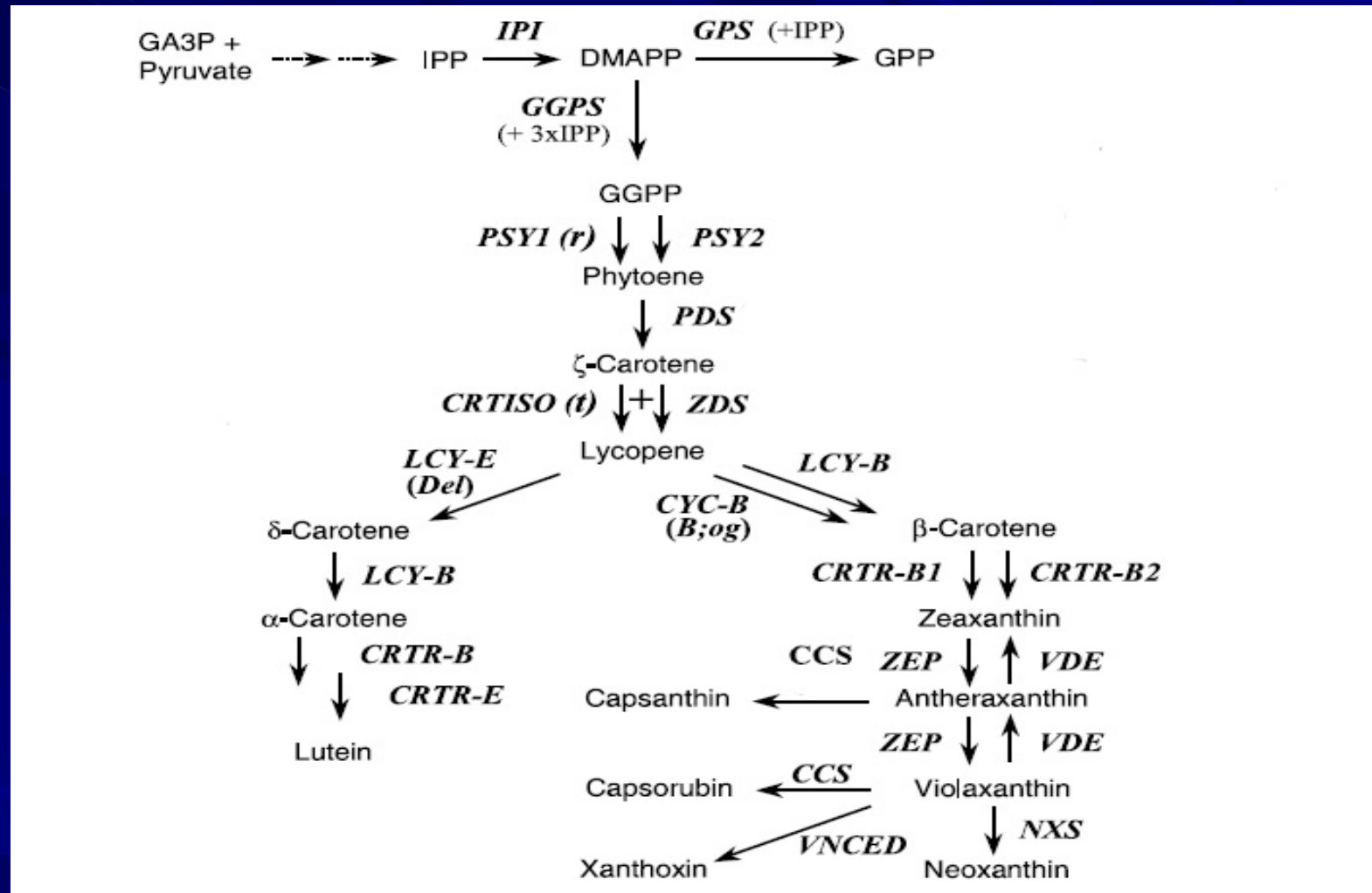
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

■ Исходным материалом для исследования служили 23 генотипа томата (*Solanum lycopersicum* L.) с контрастным содержанием каротиноидов, полученные из РУП «Институт овощеводства» и УО «БГСХА».

■ Аллельный состав генов идентифицировали в ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» по методике, описанной Малышевым и др., 2008.

■ Сравнительный анализ содержания индивидуальных каротиноидов проводили в ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси» методом ВЭЖХ на хроматографе «Цвет 4000» по методике, описанной Булда и др., 2009 с модификациями. Массовую концентрацию каротина определяли спектрофотометрическим методом с дополнительной очисткой при помощи колончатой хроматографии.

Схема пути биосинтеза каротиноидов томата (Hirschberg, 2001)



Мутации томата, которые изменяют биосинтез каротиноидов показаны в скобках:
B (Beta), *Del* (Delta), *og* (old-gold), *r* (yellow-flesh), *t* (tangerine).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таблица 1. Результаты генотипирования коллекции томата с применением ПЦР маркеров.

№	Наименование образца	Идентифицированные мутантные гены	Каротин, мг%	Окраска плода
1	Луч	<i>B / B</i>	3,48	оранжевая
2	Флайме	<i>B / B</i>	4,50	оранжевая
3	Л 439 x Желтое сердце	<i>B / B</i>	4,80	оранжевая
4	Оранж-1	<i>B / B</i>	4,20	оранжево-красная
5	Кароlette	-	4,50	оранжевая
6	Оранжевый гигант	<i>t / t</i>	1,89	оранжевая
7	Девиз	-	3,50	красная
8	Линия № 7741/2	<i>B / B</i>	4,01	оранжевая
9	Голден элайт	<i>t / t</i>	4,60	желто-оранжевая
10	Линия № 7756/2	<i>B / B</i>	5,80	оранжевая
11	Оранж x Морковный	-	4,40	красная
12	Айплс	<i>og^c / og^c</i>	4,40	красная
13	Yellow oxyheart	<i>t / t</i>	4,60	желто-оранжевая
14	Голден санрайс	-	0,50	желтая
15	Семко 7803	-	4,98	красная
16	Бония	<i>og^c / og^c</i>	4,40	красная
17	Квадрат гигант	-	1,58	малиновая
18	Ронге думонтпе	-	5,80	красная
19	Фрайди ред реак	-	4,60	красная
20	Ачи гет	-	3,91	красная
21	Мо 950	<i>nor^A / nor^A</i>	н.о.	желто-красная
22	Мо 948	<i>nor / nor</i>	н.о.	желтая
23	Мо 577	<i>rin / rin</i>	н.о.	желто-лимонная

■ **Мутантный ген *B* (*Beta carotene*).** ПЦР анализ коллекции ДНК генотипов томата позволил выявить мутантный ген в следующих образцах: Луч, Флайме, Л 439 х Желтое сердце, Оранж-1, линии № 7741/2 и № 7756/2 (рис. 1).

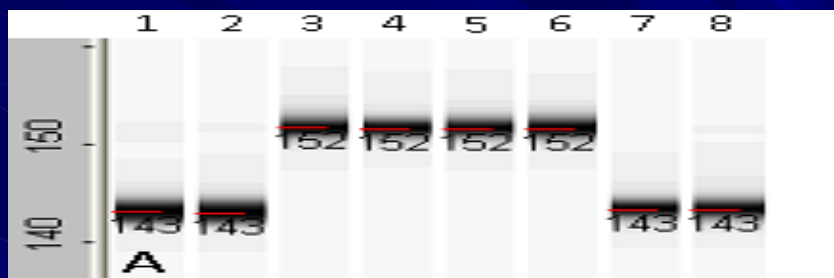


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК генотипов томата с функциональным SCAR маркером (VpromF/VpromR) к гену *B*: 1, 2 – Оранжевый гигант (*t*, *sp*), 3, 4 – Флайме (*B*), 5, 6 – Луч (*B*).

■ **Анализ сравнительного содержания каротиноидов методом ВЭЖХ** показал, процентное содержание β -каротина составляет от $14,7 \pm 0,6\%$ от суммы каротиноидов у сорта Луч до $18,5 \pm 0,6\%$ у сорта Флайме (рис.2). По данным спектрофотометрического анализа содержание каротина в плодах с геном *B* изменялось от 3,48 до 5,8 мг %.

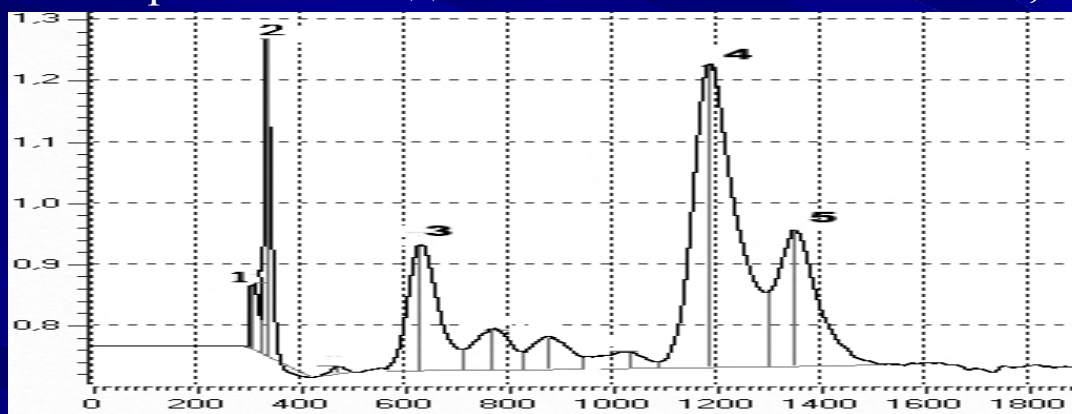


Рис. 2 – Результаты ВЭЖХ разделения каротиноидов в экстрактах плодов томата сорта Флайме (*B*). Цифрами указаны пики определяемых соединений: 1, 2 - растворители, 3 – ликопин, 4 – неидентифицированный изомер каротина, 5 – β -каротин.

■ **Рецессивный ген og^c .** Фенотипические особенности растений og^c – это темно-красные плоды и коричнево-оранжевые цветки (рис.3). В результате генотипирования мутантный ген был идентифицирован в сортах Айплс и Бония (рис.4).



Рис. 3 – Размер и интенсивность окраски цветков мутанта og^c (справа) и нормального растения томата (слева)

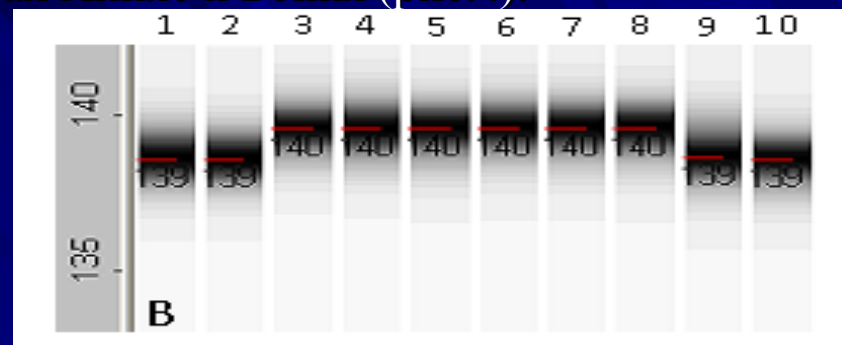


Рис. 4. Продукты амплификации ДНК генотипов томата с функциональным SCAR маркером (OgcF/OgcR) к гену og^c : 1, 2 – Айплс (og^c , sp), 3, 4 – Yellow oxheart (t), 9, 10 – Бония (og^c , sp).

■ **Анализ сравнительного содержания каротиноидов методом ВЭЖХ** показал, что в мутанте og^c содержание ликопина равно $65,7 \pm 0,9\%$ от суммы каротиноидов (рис. 5). По данным спектрофотометрического анализа содержание каротина в изучаемых сортах равнялось 4.4 мг%

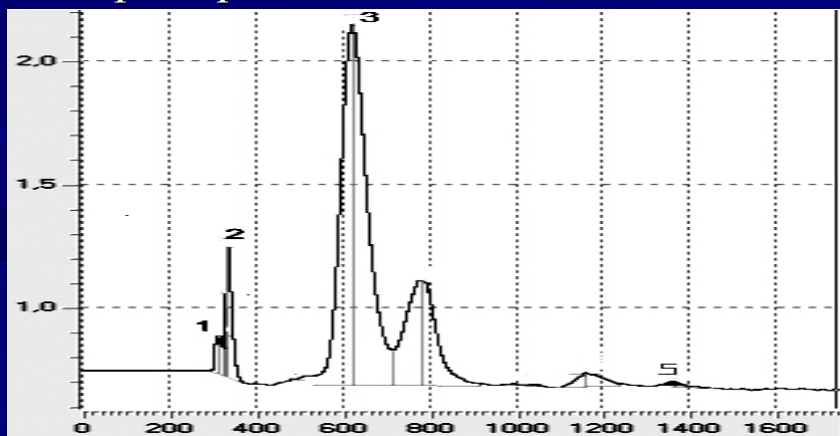


Рис. 5. Результаты ВЭЖХ разделения каротиноидов в экстрактах плодов томата сорта Бония (og^c). Цифрами указаны пики определяемых соединений: 1, 2 – растворители, 3 – ликопин, 5 – β -каротин.

■ **Ген *t* (*tangerine*)**. ПЦР анализ коллекции ДНК генотипов томата позволил выявить мутантный ген *t* в сортах томата Оранжевый гигант, Голден элайт и Yellow oxyheart (рис. 6).

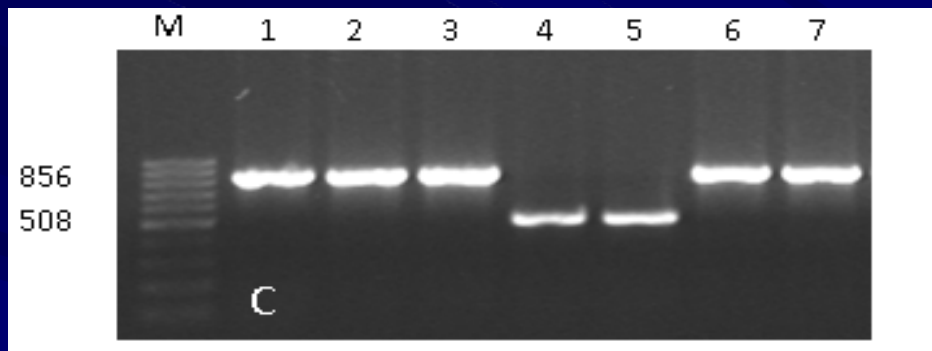


Рис. 6. Продукты амплификации ДНК генотипов томата с функциональным SCAR маркером (TF/TR) : 1 – Флайме (*B*), 2, 3 – Оранжевый x 24Е (*sp*), 4, 5 – Оранжевый гигант (*t*, *sp*), М – маркер молекулярного веса.

■ **В результате анализа ВЭЖХ** сорт Yellow oxyheart проявил себя, как низкокаротиновый ($0,9 \pm 0,1\%$ β -каротина от суммы каротиноидов), так как для эффективного разделения цис-изомеров каротиноидов необходим дополнительный анализ с модификацией условий анализа.



Рис. 7. Растение томата сорта Yellow oxyheart (*t*).

ПЦР-типирование генов, замедляющих процесс созревания плодов.

ПЦР анализ позволил выявить в форме Мо 577 – ген *rin*, в Мо 950 ген *nor^A*, в Мо 948 – ген *nor* (рис. 8).

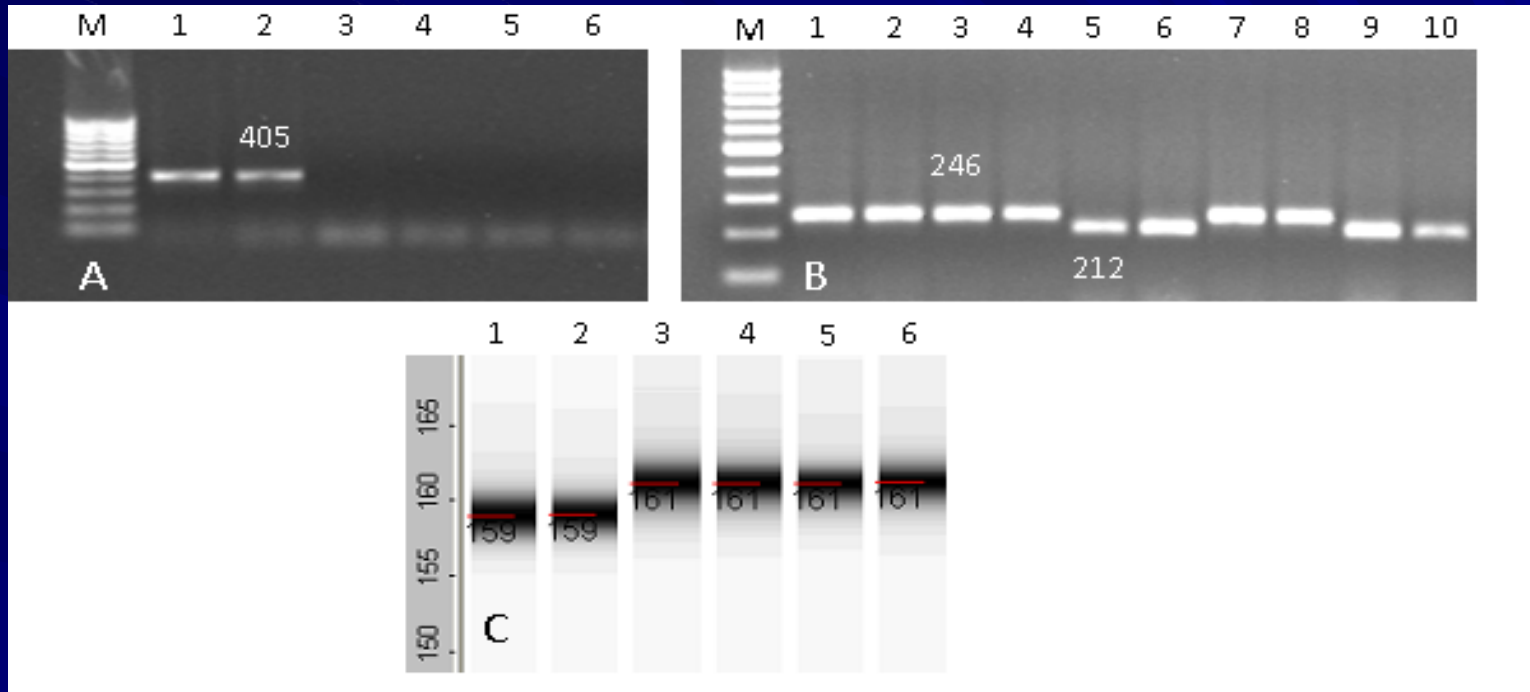


Рис. 8. Результаты ПЦР амплификации ДНК сортов и линий томата с праймерами к генам созревания. А – SCAR маркер (RinF/RinmR): 1, 2 – Мо 577 (*rin*), 3, 4 – Мо 948 (*nor*), 5, 6 – Мо 950 (*nor^A*); В – dCAPS маркер (dAlcF/dAlcR_BspMII): 1, 2 – Мо 577 (*rin*), 3, 4 – Мо 948 (*nor*), 5, 6 – Мо 950 (*nor^A*), 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



Рис. 8. Увеличенные чашелистики цветков мутанта *rin* (справа) и нормального растения томата (слева).

В результате анализа сравнительного содержания каротиноидов методом ВЭЖХ было выявлено, что ликопин в лепестках мутантов находится в следовых концентрациях (рис. 9).

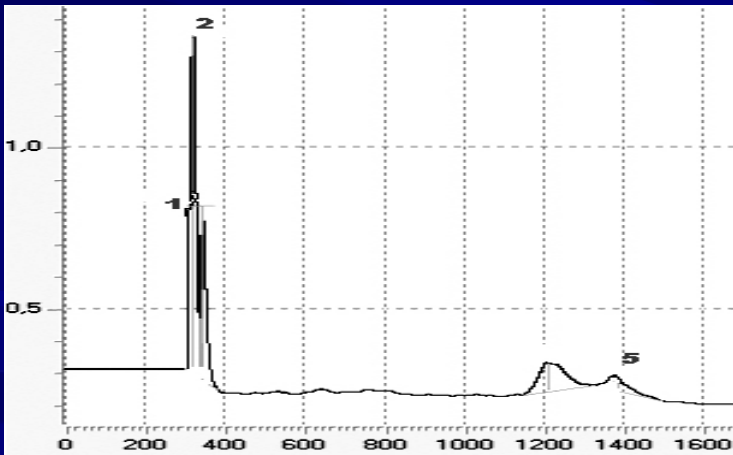


Рис. 9. Результаты ВЭЖХ разделения каротиноидов в экстрактах плодов мутантной формы *Mo 577 (rin)*. Цифрами указаны пики определяемых соединений: 1, 2 – растворители, 3 – ликопин, 4 – неидентифицированный изомер каротина, 5 – β -каротин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

■ Коллекция генотипов томата была изучена на наличие селекционно-ценных аллелей генов, изменяющих содержание каротиноидов и созревание плодов томата.

■ В результате генотипирования были выделены перспективные формы с мутантными генами для дальнейшего вовлечения их в селекционный процесс на качество плодов томата:

Ген *B*: Луч, Флайме, Оранж-1, Л 439 x Желтое сердце, Линии № 7741/2 и 7756/2.

Ген *og^c* : Бония, Айплс.

Ген *t*: Оранжевый гигант, Голден элайт и Yellow oхуheart.

■ Был проведен сравнительный анализ содержания каротиноидов методом ВЭЖХ. В результате было подтверждено действие мутантных генов *B*, *og^c*, увеличивающих содержание β-каротина и ликопина соответственно, и генов *rin*, *nor* и *nor^A* ингибирующих синтез каротиноидов, в особенности ликопина.



Спасибо за внимание!

