УДК 634.11: 632.4

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ТОМАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ (ОБЗОР)

Иван Николаевич Шамшин
ассистент
ivan_shamshin@mail.ru
Екатерина Владимировна Грошева
научный сотрудник лаборатории «Биофотоника»
Мичуринский государственный аграрный университет
г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Томат является самой распространенной овощной культурой не только в России, но и во всем мире. Его широкому распространению способствует ценные пищевые свойства. На сегодняшний день систематика томата вызывает спорные вопросы. В нашей стране и за рубежом известно несколько классификаций. Разногласия вызваны тем, что большинство исследователей берут за основу разные морфологические признаки растения. Однако с развитием методов молекулярного анализа большинство систематиков и селекционеров придерживаются новой международной ботанической классификации, основанной на исследовании ДНК.

В статье приводится обзор зарубежных и отечественных работ по изучению генома томата с применением ДНК-технологий. Собраны работы по применению различных типов молекулярных маркеров (RAPD, AFLP, SSR) в исследованиях по систематике, генетическому разнообразию, идентификации сортов и гибридов. В представленных исследованиях отмечены наиболее информативные системы маркеров, рассмотрены работы по изучению генетических коллекций и отбору исходных форм для селекции, а также вопросы идентификации полиморфизма по генам ценных признаков.

Ключевые слова: томат, геном, ДНК-маркеры, генетическая карта, маркер-вспомогательная селекция, *Solanum lycopersicon* L.

Селекция растений базируется на знаниях генетических механизмов формирования ценных признаков. Появление новых методов в генетике значительно ускоряет отбор перспективных форм. Наиболее широкое распространение получил метод ДНК-маркеров. Он основан на знании структуры генома, а также строении и функции отдельных генов. Использование этого метода для создания новых генотипов позволяет проводить отбор не по внешнему проявлению признака, а непосредственно по наличию гена. Кроме того, становится возможным определить его аллельное состояние. Направление селекции с использованием ДНК-маркеров получила название маркер-опосредованной селекции.

Исследования генома растений с применением молекулярных маркеров чаще всего начинают с изучения полиморфизма, филогении, построения генетических карт, определения локализации локусов генов качественных и количественных признаков, создание системы маркеров для их идентификации (Пикунова, 2011). Аналогичным путем идет и исследование генома томата (*Solanum lycopersicon* L.).

Первый тип ДНК-маркера, используемый для идентификации генетического полиморфизма, был RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Данный метод анализа до сих пор востребован, но в области идентификации и различения растений ему на смену пришли методы, основанные на ПЦР-амплификации ДНК с использованием случайно выбранных праймеров или праймеров, комплементарных известным участкам генома (Шамшин, 2014).

Маркеры RFLP в изучении томата использованы главным образом для оценки полиморфизма по генам конкретных признаков. Например, по генам, контролирующим количество растворимых твердых веществ в плодах томата (Tanksley and Hewitt, 1988). Значительная часть работ посвящена нанесению на карты хромосом маркеров генов устойчивости, как, например, в работе van der Beek с коллегами (Van der Beek et al, 1992). В своем исследовании они

картировали более 190 маркеров генов устойчивости в том числе к кладоспориозу и нематодам. Более 1000 маркеров были идентифицированы различными группами исследователей и нанесены на карту томата Tanksley и коллегами (Tanksley et al, 1992). Маркеры RFLP были использованы при картировании 6 хромосомы томата. В результате исследований была построена интегральная карта сцепления, основанная на анализе гибридов томата *L. esculentum* × *L. pennellii* (Weide et al, 1993). Messeguer и др. были проведены исследования по картированию участка 9 хромосомы томата для поиска гена устойчивости к нематодам (ген *Tm-2*) (Messeguer et al, 1991). Маркирование устойчивости к корневым нематодам (ген *Mi*) было отмечено и в работе Klein-Lankhorst и коллег. В результате созданы два ДНК-маркера и протестированы на 51 образце томата (Klein-Lankhorst et al, 1991). Более 250 гибридных форм были использованы для поиска локуса гена *I1*, обуславливающего устойчивость к расе 1 возбудителя фузариоза *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (Sarfatti et al, 1991). Несколько работ посвящены маркированию генов устойчивости к кладоспориозу с использованием RFLP-маркеров. В основном это гены *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* и *Cf-9* (Jones et al, 1993, Balint-Kurti et al, 1994).

Одним из наиболее распространённых методов оценки полиморфизма, основанный на амплификации с праймерами, случайно выбирающими участки генома является RAPD-анализ (Random Amplified Polymorphic DNA). Преимущество этого метода в его высокой производительности, простоте исполнения. При его использовании не требуется знаний сиквенса конкретного участка генома (Чесноков, 2005). Обладает он и рядом недостатков, наиболее серьезным из которых, является недостаточный уровень воспроизводства в лаборатории на различном приборном обеспечении. Кроме того, метод проявляет доминантный тип наследования и не позволяет идентифицировать различное аллельное состояние (Конарев, 2006).

Маркеры на основе случайно амплифицированных фрагментов ДНК были использованы различными группами исследователей. Так Klein-Lankhorst, успешно использовал этот тип маркеров для оценки полиморфизма линий

томата, полученных от дикорастущих видов *L. esculentum* и *L. pennellii* (Klein-Lankhorst et al, 1991). Эффективность RAPD-маркеров в сравнении с RFLP была оценена Majid R. Foolad с коллегами. Работа позволила дополнить сведения о полиморфизме трех культурных сортов и *L. pennellii* дикорастущего вида, выявила целесообразность использования RAPD-маркеров для изучения томата (Foolad and Jones, 1993). Случайно амплифицированные полиморфные ДНК-маркеры были использованы для оценки разнообразия 35 бразильских образцов томата. Исследования установили разницу между 23 местными, 9 коммерческими сортами и 3 гибридами. Всего было проанализировано 20 маркеров (Carelli et al, 2006). Сравнение генетического разнообразия новых и местных стародавних сортов было проведено и в Индии. Исследованы 27 сортов с помощью 42 случайных праймеров. Результаты показали снижение уровня полиморфизма у новых сортов в сравнении с местными сортами, что, по мнению авторов, вызвано узконаправленной селекцией (Patil et al, 2010). Отдельные работы посвящены использованию RAPD-маркеров для оценки однородности гибридов и линий (Rom et al, 1995).

RAPD-маркеры были успешно применены для идентификации генов резистентности к различным болезням. Например, анализ 1000 случайных праймеров помог выявить три маркера гена *Frl* устойчивости к корончатой гнили томата (Fazio et al, 1999).

Ряд работ посвящен поиску маркеров генов устойчивости к вирусным болезням. Так анализ большого количества гибридов томата F3 и F2 с использованием RAPD-маркеров позволил создать маркер гена *Sw-5* устойчивости к вирусу пятнистого увядания томатов (TSWV). Поиск маркеров для отбора устойчивых форм к данному вирусу был проведен и Chagué с коллегами. В результате 5 праймерных пар были использованы для селекционной работы. 13 пар праймеров из 220 отобраны для создания ДНК-маркеров гена устойчивости к томатной мозаике (*Tm-2*) (Chagué et al, 1997).

Еще одним распространенным маркером для оценки полиморфизма генома являются AFLP-маркеры (Amplified Rrestriction Fragment Length Polymorphism).

Этот тип маркеров основан на полиморфизме длин амплифицированных фрагментов ДНК. Включает несколько этапов, в т.ч. рестрикция, лигирование адаптеров, две последовательные ПЦР. Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с флуорисцентной меткой. Сложнее по техническому исполнению по сравнению RAPD и превосходит его по производительности, требуется специальное оборудование для детекции (Vos, 1995). AFLP – достаточно дешевый и надежный метод, используя который можно быстро генерировать сотни высоковоспроизводимых маркеров, случайно распределенных по всему геному. Для создания AFLP-карты генома не требуется знание его последовательности (Коновалов, 2006).

AFLP-маркеры были использованы для построения генетической карты линии томата, полученной на основе гибридизации видов *L. esculentum* и *L. esculentum var. Cerasiforme*. Всего проанализированы 153 растения. Получены 211 полиморфных фрагментов. Выделен ряд кластеров. Проведено сравнение с другими мультилокусные маркерами такими как RAPD и RFLP. На основании анализа всех трех типов маркеров построена генетическая карта, охватывающая 965 cM (Saliba-Colombani et al, 2000).

34 гомозиготных линии томата были проанализированы с использованием маркеров AFLP французскими исследователями (Tam et al, 2005). В результате проведенной работы выявлено 845 фрагментов, 123 из которых, были полиморфными.

На основе анализа AFLP были созданы маркеры генов ценных признаков, таких как ген устойчивости к кладоспориозу *Cf-9* (Thomas et al, 1995), устойчивости к вирусу пятнистого увядания томатов (Moon and Nicholson, 2007). Данный тип анализа использован для разработки SCAR-маркера гена устойчивости к бактериальному увяданию (ген *TRSR-1*). В результате анализа 256 комбинаций праймеров созданы два маркера SCAR (Miao et al, 2009).

Самым распространенным методом анализа генетического разнообразия генома томата на сегодняшний день остается SSR-анализ. Микросателлиты высоко полиморфны, кодоминантны и равномерно распределены по всему

геному. С использованием SSR-анализа проведена оценка генетического разнообразия и родства 42 сортов томатов, происходящих из разных географических регионов. Были использованы 29 маркеров EST-SSR (Korir et al, 2014). Zhou и коллеги оценили в общей сложности 29 культурных сортов томата (*S. lycopersicum*), 14 дикорастущих видов и 7 интрогрессивных. линии (ИЛ), полученных от скрещивания *S. pennellii* и *S. lycopersicum* по 9 морфологическим признакам и 15 локусам SSR (Zhou et al, 2015). 19 генотипов томата были изучены Kumar с соавторами с использованием 11 полиморфных маркеров SSR. Исследователи пришли к выводу, что эти маркеры могут быть использованы для широкого спектра практических применений, включая сортовую идентификацию и предварительный скрининг для оценки разнообразия генотипов томатов (Kumar et al, 2016). Проведена оценка 12 микросателлитных локусов у 78 сортов томата российской коллекции. Количество выявляемых аллелей варьировало от 2 до 6. Всего полиморфных фрагментов идентифицировано 39 (Колобова и др., 2012). SSR-маркеры были использованы для предсказания генетического потенциала и оценки гетерозиса у гибридов томата F1 белорусскими исследователями. Изучены 10 линий из различных эколого-географических регионов произрастания, а также 24 гибридных комбинации, полученные от них. Оценку проводили по 11 микросателлитным локусам. Результаты работы подтверждают важность различных типов действия генов для экспрессии гетерозиса (Шаптуренко и др., 2014).

Вопросы полиморфизма и филогении тесно связаны с систематикой. Систематика томата долгое время вызывала вопросы среди исследователей. В России и за рубежом было известно несколько классификаций (Редичкина, 2016). Все они базировались на морфологических признаках растения. В настоящее время большинство систематиков и селекционеров придерживаются новой международной ботанической классификации, которая создана на основе исследования ДНК. Наибольший вклад в понимание филогении и полиморфизма различных видов томата внес проект по полногеномному

секвенированию, начавшейся в 2004 году. В 2012 году был опубликован черновой вариант сборки генома сорта томата Heinz 1706. Его приблизительный размер составил 900 МВ. Параллельно было проведено секвенирование генома дикорастущего вида томата *Solanum pimpinellifolium*, размер которого был меньше чем у сортовой формы и составил 739 МВ (Tomato Genome Consortium, 2012).

Заключение

Для изучения культурных и дикорастущих форм томата используют различные типы ДНК-маркеров в исследованиях по систематике, генетическому разнообразию, идентификации сортов. Проведено сравнение томата с другими представителями семейства семейства Паслёновые (*Solanaceae*). На основе анализа различных генетических структур составлены карты и нанесены на них гены ценных признаков. В рамках маркер-опосредованной селекции созданы ДНК-маркеры генов селекционно-значимых признаков. Отработаны технологии ускоренного отбора исходных форм и анализа гибридного потомства.

* *Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства сельского хозяйства РФ № 122021800376-2*

Список литературы:

1. Колобова О. С. Велишаева, Н. С., Шилов, И. А., Харченко, П. Н. Различение и идентификация сортов томата методом микросателлитного анализа // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук., 2012. №. 1. С. 16-18.

2. Конарев А. В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. 2006. №. 6. С. 4-22.

3. Коновалов Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха: дисс. к.биол.н. М., 2006. С. 150.

4. Пикунова А.В. Оценка генетического разнообразия исходного и селекционного материала ягодных культур с помощью молекулярных маркёров: дисс … к.биол.н. Орел, 2011. 150 с.

5. Редичкина Т. А. Создание и изучение крупноплодных гибридов томата со сливовидной (i= 1, 20-1, 30) формой плода // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. №. 38. С. 171-181.

6. Чесноков Ю. В. Молекулярные маркеры и управление генетическими ресурсами растений // Идентифицированный генофонд растений и селекция. 2005. С. 240-250.

7. Шамшин И. Н. Оценка генетического разнообразия сортов и форм яблони с использованием ДНК-маркеров: дисс к. биол. н. Мичуринск-наукоград РФ. –014. 117 с.

8. Шаптуренко М. Н. Тарутина Л. А., Мишин Л. А., Кубрак С. В., Кильчевский А. В., Хотылёва Л. В. Перспективы предсказания генетического потенциала F1 томата (*Solanum lycopersicum* L.) на основе оценки SSR полиморфизма // Экологическая генетика. 2014. Т. 12. №. 3.

9. Balint-Kurti P. J. Dixon M. S., Jones D. A., Norcott K. A., Jones J. D. G. RFLP linkage analysis of the *Cf-4* and *Cf-9* genes for resistance to*Cladosporium fulvum* in tomato / /Theoretical and Applied Genetics. 1994. V. 88. N 6-7. P. 691-700.

10. Carelli B. P. Gerald L. T. S., Grazziotin F. G., Echeverrigaray,S. Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. revealed by RAPD markers // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2006. – V. 53. N 2. P. 395-400.

11. Chagué V. Mercier J. C., Guenard M., De Courcel A., Vedel F. Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis // Theoretical and applied genetics. 1997. V. 95. N 4. P. 671-677.

12. Fazio G., Stevens M. R., Scott J. W. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato // Euphytica. – 1999. – V. 105. N 3. P. 205-210.

13. Foolad M. R., Jones R. A. Mapping salt-tolerance genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) using trait-based marker analysis // Theoretical and Applied Genetics. 1993. V. 87. N 1. P. 184-192.

14. Jones D. A. Dickinson M. J., Balint-Kurti P. J., Dixon M. S., Jones J. D. G. Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum* // Molecular Plant Microbe Interactions. 1993. V. 6. P. 348-348.

15. Klein-Lankhorst R. M. Vermunt A., Weide, R., Liharska T., Zabel P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (L. esculentum) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) // Theoretical and Applied Genetics. 1991. V. 83. N 1. P. 108-114.

16. Korir N. K. Diao W., Tao R., Li X., Kayesh E., Li, A., Wang, S. Genetic diversity and relationships among different tomato varieties revealed by EST-SSR markers // Genetics and Molecular Research. 2014. V. 13. N. 1. P. 43-53.

17. Messeguer R. Ganal, M., De Vicente, M. C., Young, N. D., Bolkan, H., Tanksley, S. D.High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato // Theoretical and Applied Genetics. 1991. V. 82. N 5. P. 529-536.

18. Miao L. Shou S., Cai J., Jiang F., Zhu Z., Li H. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers // Molecular biology reports. 2009. V. 36. N 3. P. 479-486.

19. Moon H., Nicholson J. S. AFLP and SCAR markers linked to tomato spotted wilt virus resistance in tobacco // Crop science. 2007. V. 47. N 5. P. 1887-1894.

20. Patil B. R. Archak S., Gautam D., Salimath P. M. Narrow genetic base of private sector tomato varieties revealed by RAPD profiles // Electronic Journal of Plant Breeding. 2010. V. 1. N 4. P. 1153-1158.

21. Rom M. Bar M., Rom A., Pilowsky M., Gidoni D Purity control of F1-hybrid tomato cultivars by RAPD markers // Plant breeding. 1995. V. 114. N 2. P. 188-190.

22. Saliba-Colombani V. Causse M., Gervais L., Philouze J. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome // Genome. 2000. V. 43. N 1. P. 29-40.

23. Sarfatti M Abu-Abied M., Katan J., Zamir D. RFLP mapping of *I1*, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 //Theoretical and Applied Genetics. 1991. V. 82. N 1. P. 22-26.

24. Tanksley S. D., Ganal M. W., Prince J. P., De Vicente M. C., Bonierbale M. W., Broun P., Martin G. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics. V. 132. N 4. P. 1141-1160.

25. Tanksley S. D., Hewitt J. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato—a re-examination //Theoretical and Applied Genetics. 1988. V. 75. N 5. P. 811-823.

26. Thomas C. M. Vos P., Zabeau M., Jones D. A., Norcott K. A., Chadwick B. P., Jones J. D. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* // The Plant Journal. 1995. V. 8. N 5. P. 785-794.

27. Tomato Genome Consortium The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // Nature. 2012. V. 485. N 7400. P. 635.

28. Van der Beek, J. G., Verkerk, R., Zabel, P., & Lindhout, P. (1992). Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars: *Cf9* (resistance to *Cladosporium fulvum*) on chromosome 1. Theoretical and Applied Genetics. V. 84. N1. P. 106-112.

29. Vos P. AFLP a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker // Nucleic Acid Res. 1995. V. 23. P. 4407-4414

30. Weide R., Van Wordragen M. F., Lankhorst R. K., Verkerk R., Hanhart C., Liharska T., Koornneef M. (1993). Integration of the classical and molecular linkage maps of tomato chromosome 6. Genetics. V. 135. N 4. P. 1175-1186.

31. Zhou R. Yu X., Kjær K. H., Rosenqvist E., Ottosen C. O., Wu Z. Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using *Fv*/*Fm* to reveal the physiological mechanism of heat tolerance // Environmental and Experimental Botany. 2015. V. 118. P. 1-11.

UDC 634.11: 632.4

STUDY OF TOMATO GENETIC POLYMORPHISM USING MOLECULAR MARKERS (REVIEW)

Ivan N. Shamshin
assistant
ivan_shamshin@mail.ru
Ekaterina V. Grosheva
researcher at the Biophotonics labor atory
Michurinsk State Agrarian University
Michurinsk, Russia

Annotation. Tomato is the most common vegetable crop not only in Russia, but throughout the world. Its wide distribution is facilitated by valuable nutritional properties. To date, the taxonomy of tomato raises controversial issues. Several classifications are known in our country and abroad. Disagreements are caused by the fact that most researchers take as a basis different morphological features of the plant. However, with the development of molecular analysis methods, most taxonomists and breeders adhere to the new international botanical classification based on DNA research.

The article provides an overview of foreign and domestic works on the study of the tomato genome using DNA technologies. Collected papers on the use of various types of molecular markers (RAPD, AFLP, SSR) in studies on taxonomy, genetic diversity, identification of varieties and hybrids. In the presented studies, the most

informative systems of markers are noted, works on the study of genetic collections and the selection of initial forms for selection, as well as the identification of polymorphisms in genes of valuable traits, are considered.

Key words: tomato, genome, DNA markers, genetic map, auxiliary selection marker, *Solanum lycopersicon L.*

Статья поступила в редакцию 12.09.2022; одобрена после рецензирования 10.10.2022; принята к публикации 20.10.2022.

The article was submitted 12.09.2022; approved after reviewing 10.10. 2022; accepted for publication 20.10.2022.