

На правах рукописи

ХУНВАНУ ВИНЬИНУ НИКЭЗ

**«СЕЛЕКЦИЯ ИНДЕТЕРМИНАНТНОГО ТОМАТА С РОЗОВЫМИ
ПЛОДАМИ»**

Специальность: 4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология
растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2026

Работа выполнена на кафедре молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Научный руководитель	Монахос Сократ Григорьевич, д.с.-х.н., профессор, заведующий кафедрой молекулярной селекции, клеточных технологий и семеноводства ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
Официальные оппоненты:	Домблидес Артур Сергеевич, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики и цитологии ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»
Ведущая организация	Дубина Елена Викторовна, доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, главный научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Защита состоится 27 ноября 2026 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.08 созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук

Е.А. Вертикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Томат (*Solanum lycopersicum* L. var. *lycopersicum*) по объемам потребления в мире занимает первое место среди овощей. Он принадлежит к семейству Пасленовых насчитывающим 100 родов и 2500 видов растений (Щербань А.Б., 2019). Томат выращивают в мире на площади почти 5 миллионов гектар каждый год, производя более 186 миллионов тонн томатов при средней урожайности 36,97 т/га (Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций). По экспертным оценкам объем рынка томата составил 207,17 млрд долларов США в 2024 году и, как ожидается, достигнет 261,41 млрд долларов США к 2029 году, при ежегодном увеличении на 4,76% в течение прогнозируемого периода (2024-2029 гг.) (<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/tomato-market>).

Томат подвержен поражению большим числом болезней, которые всегда угрожают экономическими потерями. Основные болезни, препятствующие выращиванию томата, включают фузариоз (возбудитель почвенный гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), вертициллез (возбудитель *Verticillium dahliae*), фитофтороз (возбудитель оомицет *Phytophthora infestans*), бронзовость томата (возбудитель тосповирус бронзовости томата, TSWV), кладоспориоз (возбудитель высококонтагиозный, факультативный сапротроф *Passalora fulva*), желтая курчавость томата (возбудитель бегомовирус желтой курчавости листьев томата, TYLCV), галловая нематода (возбудитель *Meloidogyne incognita*) и мучнистая роса (возбудитель *Oidium neolycopersici*). С 1940-х годов селекция томата была сосредоточена на создании сортов, подходящих для различных условий возделывания при одновременном улучшении качества плодов и устойчивости к патогенам (Фулад, М. R., 2012). В этом контексте и в настоящее время широко используют генетические ресурсы в том числе дикие виды, родственные культивируемым томатам, в частности, для поиска и интрогрессии генов устойчивости к патогенам (Ercolano M.R., 2012). Сегодня с появлением новых технологий стало проще внедрять новые гены в геном томата, чтобы улучшить его характеристики. В этой связи использование молекулярных маркеров в программах селекции томата стало постоянным явлением. Знания о наиболее значимых генах устойчивости томата к болезням и их молекулярных маркерах являются существенным преимуществом в селекции томата.

Томат является одной из первых культур, для которых молекулярные маркеры были предложены в качестве косвенных критериев селекции (Tanksley, 1983). За последние годы было идентифицировано несколько молекулярных маркеров, связанных с генами устойчивости томата к различным заболеваниям. Такие исследователи, как Robbins, Grushetskaya, Huang, Arens и многие другие смогли идентифицировать гены устойчивости томата к наиболее известным

заболеваниям (Robbins et al., 2010; Grushetskaya et al., 2007; Huang et al., 2000; Arens et al., 2010). Однако эффективность этих генов при внедрении в геном растений томата остается серьезной проблемой. Сочетание нескольких генов устойчивости в одном геноме оказывается наиболее эффективным способом защиты растений (Беспалова и др., 2012). Повышение продуктивности и скороспелости, а также возможность совмещения различных генов устойчивости к болезням у гибридов зависят от подбора родительских пар, способных при скрещивании давать гетерозисное потомство. В связи с этим приобретение широких знаний о проявлении эффектов комбинационной способности комплекса хозяйственно ценных признаков при скрещивании фертильных и мужски стерильных линий, а также оценка взаимосвязей данных молекулярно-генетического и фенотипического анализа и способности к сочетанию хозяйственно-ценных признаков абсолютно необходимы для повышения шансов создания конкурентоспособных гетерозисных гибридов.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день разработаны многочисленные маркеры генов устойчивости томата. Так маркеры гена I2, гена устойчивости к фузариозному увяданию, разработаны Куклев М.Ю. с соавторами (2006). Также были идентифицированы маркеры генов устойчивости к вертициллезу Ve1 и Ve2. Также эффективность молекулярно-генетических маркеров, позволяющих идентифицировать локусы Cf-2, Cf-5 и Cf-6 устойчивости томата к кладоспориозу, показана Грушецкой З.Е. и др. (2005, 2007). Гены Ph-2 и Ph-3 определяли по маркерам dTG422 и TG328 соответственно. (Hanson et al., 2016). Известно, что комбинация генов Ty-3 + Ty-2 не исключает поражение растений томата вирусом и следует изучить возможность создания новых комбинаций генов устойчивости таких, как Ty-3, Ty-5 и Ty-2 (Hanson et al., 2016). Новые маркеры CAPS разработаны на основе известных последовательностей tm-2 и Tm-2², а также последовательности Tm-2 (Sobir et al., 2000, Dax et al., 1998). Несмотря на достаточно широкий перечень публичных молекулярных маркеров генов устойчивости к наиболее вредоносным заболеваниям томата, вопрос их эффективности применительно к локальным генетическим коллекциям линий/образцов, используемых в селекционных программах по созданию конкурентоспособных коммерческих F1-гибридов с групповой устойчивостью, а также выявление новых доноров устойчивости и дифференциация линий с целью дальнейшего пирамидирования генов, остается актуальным.

Цели и задачи исследования

Цель данного исследования состоит в изучении генетических источников хозяйственно-ценных признаков с использованием методов гибридологического и молекулярно-генетического анализа и создание чистых линий и F1-гибрида

индетерминантного томата с розовыми плодами с групповой устойчивостью к заболеваниям.

Для достижения цели были определены следующие задачи:

1. Скрининг полиморфизма ДНК-маркеров генов устойчивости к девяти наиболее значимым заболеваниям: *I2*, фузариоз (возбудитель - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*); *Ve*, вертициллез (возбудитель - *Verticillium dahliae*), *Cf-2/5*, *CF6*, кладоспориоз (возбудитель - *Cladosporium fulvum*); *R1*, *R3a*, *Ph-3*, фитофтороз (возбудитель - *Phytophthora infestans*); *SW5*, бронзовость (возбудитель - *Тосновирус бронзовости томата*); *Mi23*, нематодам (возбудитель - *Meloidogyne incognita*); *Ol1* и *Ol3*, мучнистая роса (*O. neolycopersici* sp. nov.); *Ty-3/Ty-3a*, *Ty-2*, вирус желтой курчавости листьев томата (возбудитель - *Бегмовирус желтой курчавости листьев томата*) и *Tm-2*, *Tm-2²*, вирус томатной мозаики (возбудитель - *вирус томатной мозаики*) с использованием генетической коллекции линий индетерминантного розовоплодного томата (*L. esculentum*);

2. Молекулярно-генетическое изучение и дифференциация линий с функциональной мужской стерильностью и фертильных линии томата по числу генов устойчивости к болезням (*I2*, *Ve*, *Mi23*, *Tm-2²*, *Cf-2*, *Cf-5*, *Sw5*, *Ph3*, *Ty-2*, *Ol-1*), выделение линий, содержащих наибольшее число генов устойчивости;

3. Оценка устойчивости к фитофторозу генетической коллекции (линии Кр-1 – Кр-14) томата на естественном/искусственном инфекционном фоне; выявление образцов томата с генетической устойчивостью к фитофторозу и изучение характера ее наследования; молекулярно-генетический скрининг устойчивых и восприимчивых к фитофторозу линий томата с использованием молекулярного маркера гена *Ph3*;

4. Изучение комбинационной способности линий томата при оценке хозяйственно-ценных признаков гибридных комбинаций, полученных в системе топкросс;

5. Определение корреляции проявления хозяйственно ценных признаков растений томата - число листьев до первого соцветия (шт.), продолжительность периода «всходы-цветение» (сут.), продолжительность периода «всходы-созревание» (сут.), число плодов на растении (шт.), продуктивность (кг), с использованием данных испытания F1-гибридов;

6. Изучение проявления признаков и выделение перспективных гибридных комбинаций индетерминантного розовоплодного томата устойчивых к наиболее вредоносным заболеваниям, фузариозу (ген *I2*), вирусу бронзовости (ген *Sw5*), вертициллезу (ген *Ve*), вирусу табачной мозаики (ген *Tm-2²*), кладоспориозу (гены *Cf-2*, *Cf-5*), нематоде (ген *Mi2*), вирусу желтой курчавости листьев томата (ген *Ty3a*), мучнистой росе (ген *Ol-1*).

Научная новизна

Впервые в России с использованием отечественной генетической коллекции при испытании на инфекционном фоне показан моногенный доминантный контроль проявления устойчивости томата (*L. esculentum*) к фитофторозу (возбудитель - *Phytophthora infestans*).

Впервые с использованием молекулярных маркеров известных генов устойчивости (*R1*, *R3a*, *Ph-3*) установлено наличие гена *Ph-3* в генетической коллекции линий розовоплодного индетерминантного томата.

Впервые при оценке комбинационной способности выявлены линии индетерминантного розовоплодного томата с функциональной мужской стерильностью и групповой устойчивостью к 9 наиболее вредоносным заболеваниям, обладающие максимальными положительными эффектами ОКС по признакам «число листьев до первого соцветия»; «число плодов на одном растении»; «масса товарных плодов на растение»; и отрицательными эффектами ОКС по признакам «продолжительность периода «всходы – начало цветения»; «продолжительность периода «всходы – начало созревания».

Впервые для генетической коллекции розовоплодного индетерминантного томата с групповой устойчивостью к заболеваниям установлена положительную связь средней силы $r=0,58$ признаков «число плодов на растении» и «продолжительность периода «всходы-созревание» и отсутствие корреляции признаков число листьев до первого соцветия (шт.), продолжительность периода «всходы-цветение» (сут.), продолжительность периода «всходы-созревание» (сут.), число плодов на растении (шт.), продуктивность (кг).

Теоретическая и практическая значимость

Впервые на основе фенотипического анализа, оценки устойчивости на инфекционном фоне, в комплексе с молекулярно-генетическим анализом в генетической коллекции розовоплодного индетерминантного томата выделена линия Кр-14 – донор моногенной доминантной устойчивости к фитофторозу (возбудитель - *Phytophthora infestans*).

Впервые в генетической коллекции томата (*L. esculentum*) с использованием молекулярных маркеров 15 генов устойчивости выявлены 17 линий, содержащих одновременно 9 генов устойчивости (*I₂*, *Ve*, *Mi2*, *Tm-2²*, *Cf-5*, *Sw5*, *Ph-3*, *TYLCV* и *Ol*) к наиболее значимым заболеваниям фузариозу, вертициллезу, кладоспориозу, фитофторозу, бронзовости, нематодам, мучнистой росе, вирусу желтой курчавости листьев томата и вирусу томатной мозаики.

В результате скрининга 32 молекулярных маркеров 15 генов устойчивости на генетической коллекции индетерминантного розовоплодного томата выявлен полиморфизм 18 (56,25% от исходного числа) молекулярных маркеров ассоциированных с 10 (66,7% от исходного числа) генами устойчивости к заболеваниям.

Впервые выделены перспективные гибридные комбинации индетерминантного розовоплодного томата (Роз ст (0-12) х РБК1-264, Роз ст 9-1 х РБК1-264 и Роз ст 4-431 х 518-1133) сочетающие комплекс хозяйственно ценных признаков с групповой устойчивостью к 7 заболеваниям: к фузариозу (ген I2), вирусу бронзовости (ген Sw5), вертициллезу (ген Ve), вирусу табачной мозаики (ген Tm-22), клadosпориозу (гены Cf-5), нематоду (ген Mi2), вирусу желтой курчавости листьев томата (ген Tu3a).

Методология и методы исследования

Теоретические исследования основаны на аналитическом синтезе опубликованных научных результатов. Экспериментальные исследования проводились с использованием стандартных и частных методов и последующей статистической обработки данных. Методика полностью описана в главе «Материалы и методы» диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1. Линия Кр-14 розовоплодного индетерминантного томата обладает моногенной доминантной устойчивостью к фитофторозу (возбудитель - *Phytophthora infestans*);

2. Растения линии Кр-6 (Кр6-1, Кр6-2, Кр6-3, Кр6-4) обладают геном устойчивости к фитофторозу *Ph-3*;

3. 17 линий розовоплодного индетерминантного томата (Роз ст 0-1, Роз ст 1-3, Роз ст2(2), Роз ст3(3), Роз ст 4-431, Роз ст5(1), Роз ст6(3), Роз ст7(3), Роз ст 8-64, Роз ст 9(121), Роз ст 12(1), Роз ст 13(2), Роз ст 15(1), Роз ст 16(3), Роз ст 20(3), Роз ст 22(3) и РБК1251) обладают групповой устойчивостью к 9 наиболее значимым заболеваниям фузариозу, вертициллезу, клadosпориозу, фитофторозу, бронзовости, нематодам, мучнистой росе, вирусу желтой курчавости листьев томата и вирусу томатной мозаики.

Степень достоверности

Достоверность исследования подтверждается выбором необходимого количества повторений и объема выборки при проведении экспериментов, а также статистической обработкой полученных экспериментальных данных.

Апробация результатов

Результаты исследований доложены и обсуждены на 1-й международной и 1 всероссийской конференциях:

1- XXIII-й научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 2023.

2- Международная научная конференция молодых учёных специалистов, посвящённая 100-летию со дня рождения академика Г.И. Тараканова, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 2023.

3- Workshop/Conference, Working Group, Management Committee, COST Action: CA18210 - Oxygen sensing a novel mean for biology and technology of fruit quality, Turkey, Antalya, Turkey, from 12/04/2023.

4- Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича. – 2024. – Т.2

Публикация результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 4 научных работы, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 2 статья в сборнике докладов конференции.

Личный вклад соискателя

Результаты экспериментальных исследований получены лично автором. Кандидат отвечает за разработку программы исследований и проведение фундаментальных экспериментов, а также теоретическое обобщение полученных результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 164 страницах, содержит 22 таблицы и 7 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, выводов. Библиографический список состоит из 162 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия, материалы и методы

Семенной материал для проведения исследования получен из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева». Для проведения исследования были выбраны 19 линий индетерминантных томатов: Поз St 0-1, Поз St 1-3, Поз St 2(2), Поз St 3(3), Поз St 4-431, Поз St 5(1), Поз St 6(3), Поз St 7(3), Поз St 9(121), Поз St 12(1), Поз St 13(2), Поз St 15(1), Поз St 16(3), Поз St 20(3), Поз St 22(3), РБК1251, Клубка куба (КК), 518-11338, Поз St 8-64. Представленные линии являются инбредными линиями разных поколений инбридинга, разработанные в рамках селекционных программ по созданию F1-гибридов, обладают комплексом экономически-значимых признаков, в том числе устойчивостью к заболеваниям. Для молекулярно-генетического анализа использовали по 3 растения из каждой линии, всего в работе было проанализировано 57 растений.

С каждого растения отбирали 100–150 мг тканей молодых листьев для выделения ДНК СТАВ-методом (цетилтриметиламмония бромид) согласно стандартному протоколу (Tamarit F. и др., 2016). Концентрацию и качество ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer N50 (Implen, Германия).

Продукты амплификации окрашивали интеркалирующим красителем GelRed и разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. В качестве

маркера использовали ДНК маркер Step100 (Биолабмикс, Россия), содержащий фрагменты ДНК длиной от 100 до 1000 п.н.

Рестрикцию в случае использования CAPS-маркеров производили в соответствии с протоколом, приведённым авторами используемого маркера.

Всего в работе было использовано 32 молекулярных маркера, ассоциированных с 12 локусами устойчивости к восьми основным заболеваниям томата, перечисленных в Таблице 1.

Таблица 1. Список использованных генетических маркеров, их соответствие локусам устойчивости к заболеваниям

Наименование заболевания	Возбудитель	Локус устойчивости	Название праймеров (прямой/обратный)	Тип маркера	Ожидаемые размеры ампликонов (п.н.)	Литературный источник
Фузариоз	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen	<i>I2C-1</i>	U78/UP78	CAPS	340, 390	Фесенко, 2007
		<i>I2</i>	U127/UN127	CAPS	900, 100, 200, 800	
Вертициллез	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	<i>Ve</i>	VF/VR	SCAR	164, 200	Куклев, 2006
Фитофтороз	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary	<i>Ph-3</i>	TG328F/TG328R	CAPS	500, 260, 240	Huang <i>et al.</i> , 2005. Robbins <i>et al.</i> , 2010
		<i>R1</i>	R1-1400:76-F/R1-1400:76-R	SCAR	1400	
			R1-1250:76-F/R1-1250:76-R	SCAR	1250	
		<i>R3a</i>	RT-R3a-F/RT-R3a-R	SCAR	1000	
Бронзовость томатов	Тосповирус бронзовости томата (TSWV)	<i>Sw5</i>	Sw5-f2/Sw5-r2	SCAR	541	Монахос, 2014
			Sw421-1/Sw421-2	SCAR	940	
Кладоспориоз	<i>Passalora fulva</i> (Cooke) U. Braun & Crous	<i>Cf-2 u Cf-5</i>	2-5Cf	-	1600, 800	Grushetskaya, 2007
Желтая курчавость листьев томатов	Бегмовирус желтой курчавости листьев томата, TYLCV	<i>Ty-3</i>	FLUW-25 F/FLUW-25 R	SCAR	450, 640	Rane, 2024
Галловая нематода	<i>Meloidogyne incognita</i> Kofoed & White	<i>Mi23</i>	Mi23F/Mi23R	SCAR	380, 430	Bhavana, 2019
Мучнистая роса	<i>Oidium neolycopersici</i> L. Kiss	<i>Ol-1, Ol-2</i>	SCAE16F/SCAE16R	SCAR	780	Huang, 2000.

Оценка комбинационной способности

Растительный материал был представлен 60 гибридными комбинациями, полученными путем скрещивания 20 мужскистерильных материнских линий и 3 фертильных отцовских линий. Измеряли такие параметры, как число плодов на растении (шт./раст.), средняя масса плода (г.), число листьев до 1-соцветия (шт.), период «всходы – начало цветения» (суток) и период «всходы – начало созревания» (суток). Расчет эффектов КС производили по методу Савченко В.К. по модели I (Савченко В.К., 1973).

Оценка устойчивости к фитофторозу

Для проведения исследования были использованы 12 линий томата, которые были высажены и выращены в открытом грунте. В общей сложности было изучено 335 растений. Для создания искусственного инфекционного фона были собраны образцы *P. infestans* в естественной среде. Пораженные *P. infestans* листья собирали и выдерживали при температуре +4°C в течение 4 часов. Затем зараженные листья переносили в дистиллированную воду на 15 минут для создания суспензии инокулята. Полученную суспензию ооспор *P. infestans* использовали для двукратной инокуляции растений томата. Для выявления наличия гена *Ph-3* в исследуемых образцах использовали молекулярный маркер TG328 (Хунвану Н. В., и др., 2024). Гидролиз ампликонов проводили в течение 16 часов с использованием 0,9 ед. на 10 мкл ПЦР-продукта эндонуклеазы рестрикции BstNI.

Статистический анализ

Результаты фенотипического расщепления обрабатывали с помощью χ^2 (хи-квадрат), дисперсионный анализ - с помощью программы Statistica версии 6.0.

Результаты исследований и обсуждение

Молекулярно-генетический скрининг генетической коллекции (линий) томата по генам устойчивости к наиболее значимым заболеваниям

Для выявления гена *I2C-1*, обеспечивающего частичную устойчивость к фузариозу, был использован CAPS-маркер на основе пары праймеров U78-UP78. При анализе амплифицированных фрагментов после обработки рестриктазой *Acc I* выявляли как два целевых фрагмента с длинами около 340 п.н. и 390 п.н, так и фрагменты с длинами около 190 п.н, 600 п.н., 700 п.н., 850 п.н. и 1000 п.н. (Рис. 1А). Целевые продукты были выявлены у всех исследованных растений за исключением растений трёх линий – Роз St12; «Клибка Куба» и 518-11338. Обнаружение целевых продуктов позволяет предположить наличие аллеля *I2C-1*, обеспечивающего частичную устойчивость к фузариозу.

Генетическое исследование коллекции растений на наличие делеции 36 п.н. в локусе *Ve*, ассоциированной с устойчивостью томатов к вертициллезу, при

помощи SCAR-маркера на основе пары праймеров VF и VR, позволила обнаружить у всех исследованных растений два фрагмента длиной около 250 п.н. и 300 п.н. (Рис. 1Б). Хотя наличие двух продуктов ПЦР указывает на то, что все исследованные растения (за исключением линии 518-1133) представляют собой гетерозиготы по данному маркеру, однако длины фрагментов оказались больше, чем ожидалось (около 164 п.н. и 200 п.н. соответственно). Полученные результаты не позволяют однозначно сделать вывод о наличии гена устойчивости к вертициллезу у изученных растений и возможности использования данного маркера в маркер-опосредованном отборе данной генетической коллекции томатов на устойчивость к вертициллезу.

Результаты ПЦР-анализа изученных линий томата присутствия в их геномах маркеров генов устойчивости к фитофторозу показали отсутствие у всех исследованных растений как маркеров устойчивого аллеля гена *Ph-3*, так и соответствующих маркеров *R*-генов.

Для выявления наличия гена устойчивости к вирусу бронзовости томатов Sw5 у исследованных растений было использовано два SCAR-маркера: на основе пар праймеров Sw5-f2 и Sw5-r2, Sw421-1 и Sw421-2 (Монахос и др., 2014). При анализе длин фрагментов, образовавшихся в результате ПЦР с парой праймеров Sw5-f2 и Sw5-r2, целевой последовательности длиной 541 п.н. не было обнаружено только в линии 518-1133 (Рис. 1В). Наличие ампликона указанной длины подтверждает присутствие в геноме исследованных растений аллеля гена *Sw5b*, который обеспечивает устойчивость к вирусу бронзовости томатов. Маркер на основе праймеров Sw421-1 и Sw421-2 был обнаружен у растений всех линий, за исключением Роз St 12(1), «Клибка куба» и 518-11338 (Рис. 1Г). В линии «Клибка куба» был обнаружен ампликон большей длины – около 1000 п.н. вместо ожидаемых 940 п.н. Результаты, полученные при анализе наличия генетических маркеров устойчивости к вирусу бронзовости томатов в целом сходятся. Однако в случае двух линий, Роз St 12(1) и «Клибка куба», требуется дополнительное исследование, так как один маркер показывает наличие аллеля гена *Sw5b*, который придаёт устойчивость растениям, тогда как второй маркер показывает отсутствие такого аллеля.

Для выявления устойчивых к кладоспориозу растений использовали генетический маркер на основании пары праймеров 2-5Cf. Данная пара праймеров фланкирует области генов, кодирующие LRR (Leucine-Rich Repeat - обогащённые лейцином повторы) в гомологичных генах *Cf-2* и *Cf-5*, отличающихся количеством повторов (Grushetskaya Z. E. и др., 2007). Соответственно, данный маркер должен позволять проверить присутствие генов *Cf-2* и *Cf-5* в геноме и одновременно различать их на основании разницы в размерах ампликонов – 1600 п.н. и 800 п.н. соответственно. Результаты ПЦР с парой праймеров 2-5Cf показали, что ампликоны выявлялись во всех линиях, кроме РБК1251, «Клибка куба», 518-1133

и Роз st 8-64. Однако размеры ампликонов отличались от ожидаемых – у растений во всех линиях, где после ПЦР присутствовал продукт реакции, выявлялось три фрагмента с длинами около 680 п.н., 850 п.н. и 1000 п.н. (Рис. 2А). Основываясь на полученном результате, нельзя сделать вывод о присутствии в их геномах генов *Cf-2* и *Cf-5*. Возможно, в данном случае были амплифицированы фрагменты родственных им генов семейства *Hcr* (Grushetskaya Z. E. и др., 2007).

Для поиска линий устойчивых к вирусу желтой курчавости листьев томатов использовали SCAR-маркер на основе пары праймеров FLUW-25 F и FLUW-25 R (Rane O. и др., 2024), ассоциированный с геном устойчивости *Ty-3*. Были получены фрагменты длиной около 475–500 п.н. (кроме линий «Клибка куба» и 518-1133), что соответствует восприимчивому к заболеванию варианту аллеля (Rane O. и др., 2024), (Рис. 2Б).

Линии, устойчивые к галловой нематоде, выявляли путём генетического скрининга на наличие гена *Mi23* при помощи SCAR-маркера на основе пары праймеров *Mi23F* и *Mi23R* (Bhavana P. и др., 2019.). Ожидаемая длина ампликонов составляет 380 п.н. у устойчивых гомозигот и 430 п.н. у неустойчивых гомозигот. Среди всех исследованных линий гетерозиготными оказались растения в линиях Роз St 2(2) и 518-1133 (Рис. 2В). Линии Роз St 6(3) и Роз St 22(3) – неустойчивые гомозиготы. В линиях Роз St 15(1) и Роз St 8-64 маркер не был обнаружен. Остальные линии – устойчивые гомозиготы.

Молекулярный скрининг исследуемой коллекции томатов на устойчивость к мучнистой росе проводили при помощи SCAR-маркера, тесно ассоциированного с геном устойчивости *Ol-1* на основе пары праймеров SCAE16F и SCAE16R (Huang, C. и др., 2000). Во всех линиях томатов из исследуемой коллекции, за исключением линий Роз St 15(1), «Клибка куба» и 518-1133, при анализе результатов ПЦР выявлялись ампликоны размером около 780-800 п.н., что свидетельствует о наличии в геномах исследованных растений маркера гена устойчивости *Ol-1* (Рис. 2Г).

Таким образом, в результате молекулярно-генетического скрининга генетической коллекции томатов с использованием 13 ДНК-маркеров восьми основных заболеваний томатов, показано, что растения двенадцати из девятнадцати инбредных линий розовоплодного индетерминантного томата, Роз St 0-1, Роз St 1-3, Роз St 2(2), Роз St 3(3), Роз St 4-431, Роз St 5(1), Роз St 7(3), Роз St 9(121), Роз St 13(2), Роз St 16(3), Роз St 20(3), РБК1251 несут маркеры генов устойчивости по крайней мере пяти заболеваний, вертициллеза, вируса бронзовости томатов, вируса желтой курчавости листьев, галловой нематоды и мучнистой росы (всего 7 маркеров). Эти линии благодаря совокупности хозяйственно-ценных признаков с признаками устойчивости к наиболее вредоносным заболеваниям представляют генетическую ценность и могут быть использованы в дальнейшем для вовлечения в селекционные программы по

созданию устойчивых к заболеваниям F1-гибридов индетерминантного розовоплодного томата. В тоже время необходимо отметить, что для обеспечения устойчивости к фузариозу, фитофторозу и кладоспориозу в селекционные программы необходимо вовлекать генетические источники и доноры этих признаков с дальнейшей интрогрессией генов устойчивости в генотипы элитных линий, родительских линий коммерческих F1-гибридов.

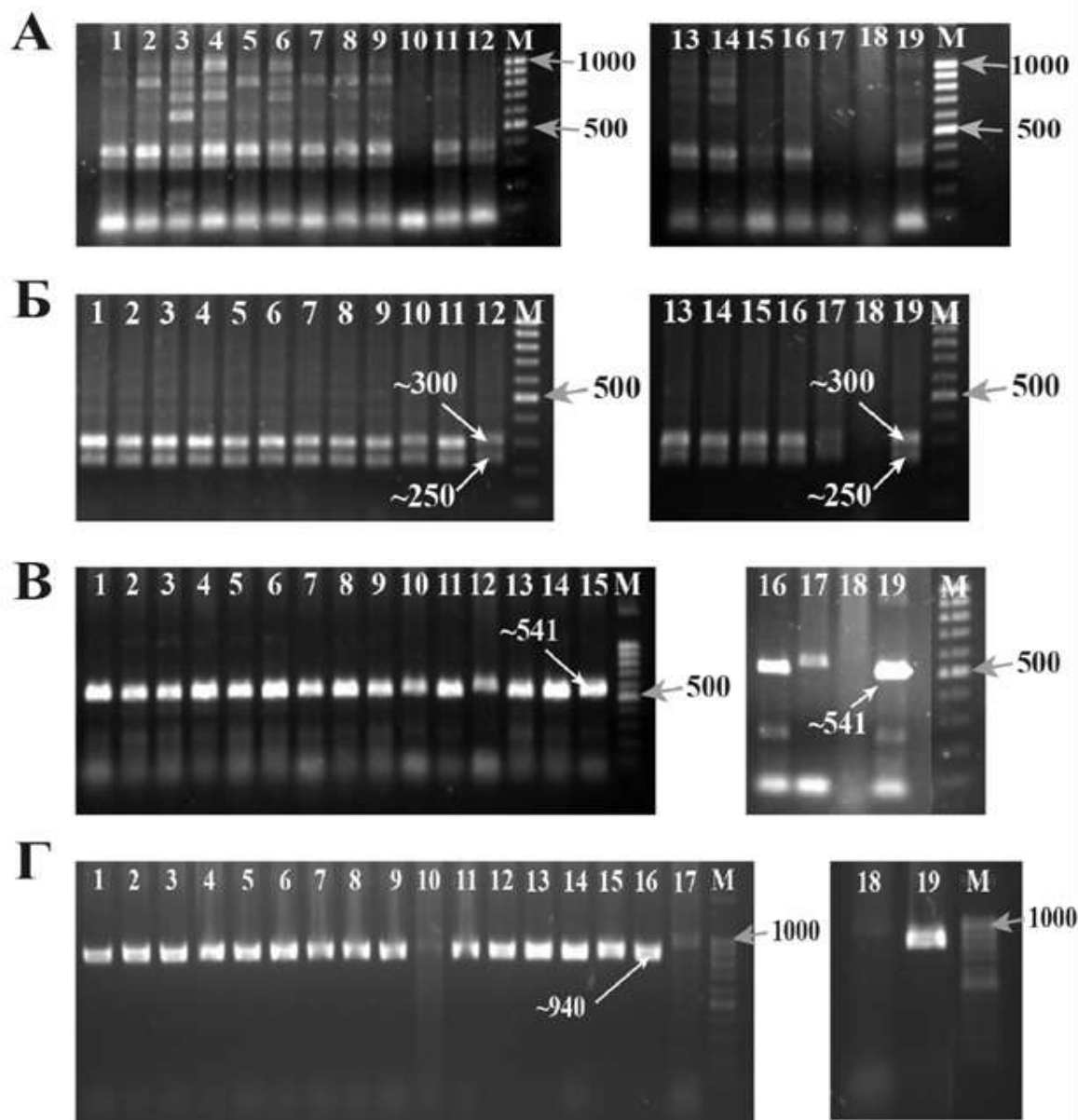


Рис. 1. Результаты молекулярно-генетического скрининга коллекции томатов на наличие генетических маркеров для гена *I2C-1* (а), локуса устойчивости *Ve* (б), гена *Sw5* (в) и маркера *Sw421* (г): 1 – Поз St 0-1, 2 – Поз St 1-3, 3 – Поз St 2(2), 4 – Поз St 3(3), 5 – Поз St 4-431, 6 – Поз St 5(1), 7 – Поз St 6(3), 8 – Поз St 7(3), 9 – Поз St 9(121), 10 – Поз St 12(1), 11 – Поз St 13(2), 12 – Поз St 15(1), 13 – Поз St 16(3), 14 – Поз St 20(3), 15 – Поз St 22(3), 16 – РБК1251, 17 – Клибка куба (КК), 18 – 518-1133, 19 – Поз st 8-64. М – маркер длин фрагментов ДНК

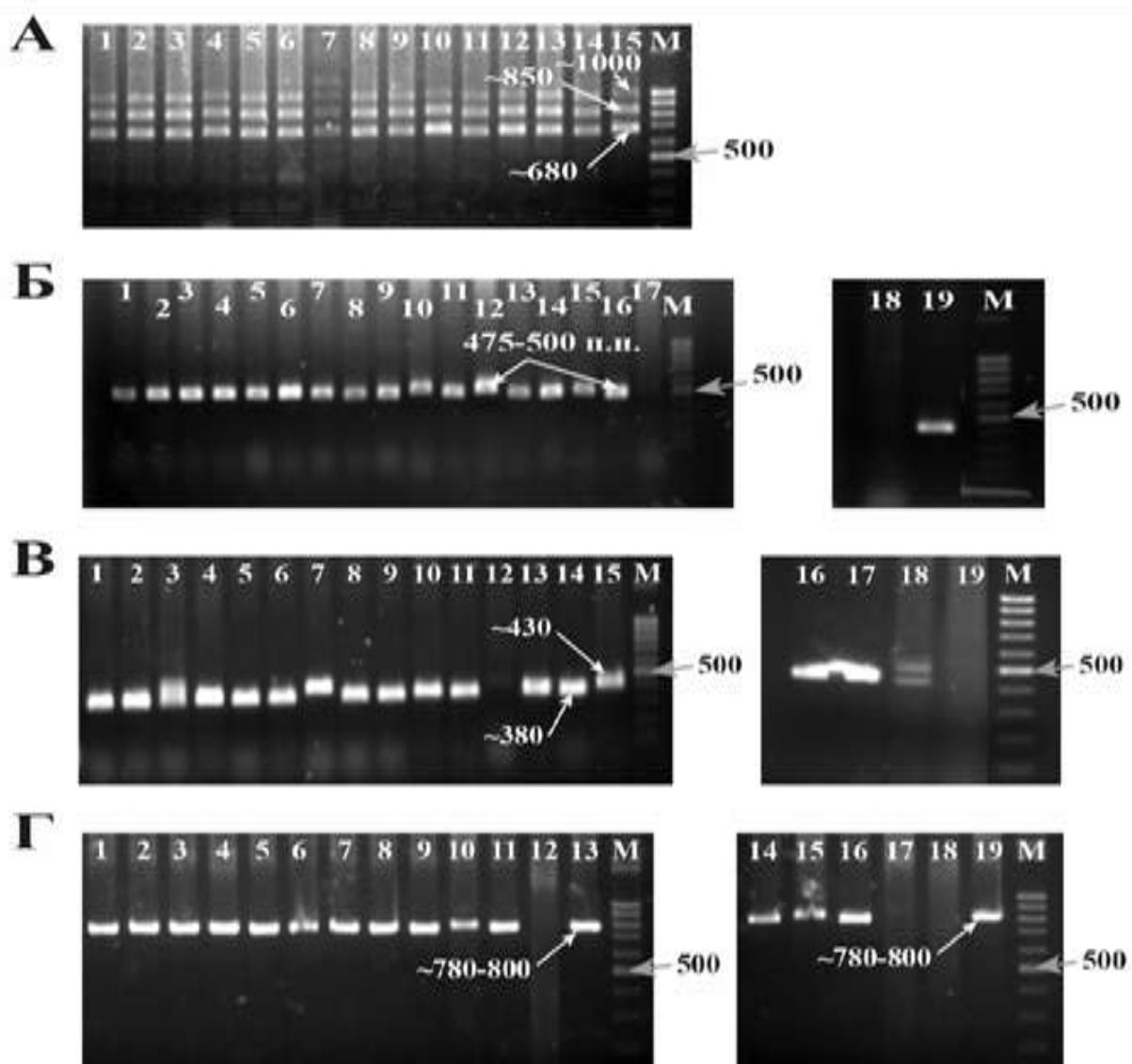


Рис. 2. Результаты молекулярно-генетического скрининга коллекции томатов на наличие генетических маркеров для генов *Cf-2* и *Cf-5* (а), гена *Ty-3* (б), гена *Mi23* (в) и гена *Ol-1* (г): 1 – Поз St 0-1, 2 – Поз St 1-3, 3 – Поз St 2(2), 4 – Поз St 3(3), 5 – Поз St 4-431, 6 – Поз St 5(1), 7 – Поз St 6(3), 8 – Поз St 7(3), 9 – Поз St 9(121), 10 – Поз St 12(1), 11 – Поз St 13(2), 12 – Поз St 15(1), 13 – Поз St 16(3), 14 – Поз St 20(3), 15 – Поз St 22(3), 16 – РБК1251, 17 – Клубка куба (КК), 18 – 518-1133, 19 – Поз st 8-64. М – маркер длин фрагментов ДНК.

Оценка комбинационной способности линий томата с функциональной мужской стерильностью

Максимальный положительный эффект ОКС по признаку «число листьев до первого соцветия» у линий Поз ст (12)4 ($gi = 0,96$ шт.), Поз ст 4-432, ($gi = 1,31$ шт.) и Поз ст 9-1 ($gi = 0,89$ шт.); максимальный отрицательный эффект ОКС по признаку «продолжительность периода «всходы – начало цветения» у линий Поз ст 3-23 и Поз ст 9-121 ($gi = -1,65$ суток), Поз ст 9-12 2017 ($gi = -1,98$ суток); максимальный отрицательный эффект ОКС по признаку «продолжительность

периода «всходы – начало созревания» у линий Роз ст 6-322 ($g_i = -3,23$ суток), Роз ст 4-431 ($g_i = -7,23$ суток), Роз ст 3-23 ($g_i = -2,23$ суток), Роз ст 8-61 ($g_i = -2,90$ суток); максимальный положительный эффект ОКС по признаку «число плодов на одном растении» у линий Роз ст 6-322 ($g_i = 12,87$ шт.), Роз ст 3-11 ($g_i = 10,32$ шт.), и Роз ст 4-431 ($g_i = 22,76$ шт.); максимальный положительный эффект ОКС по признаку «масса товарных плодов на растение» у линий Роз ст 3-11 ($g_i = 0,77$ кг), Роз ст 7-3 ($g_i = 0,77$ кг) и Роз ст 4-432 ($g_i = 0,77$ кг).

Результаты стационарных испытаний перспективных гибридных комбинаций и краткий экономико-биологический обзор

Важно подчеркнуть, что все комбинации гибридов не только несут в себе гены устойчивости, но и противостоят наиболее вредоносным известным заболеваниям. Из 60 протестированных гибридных комбинаций выделены 3 перспективные гибридные комбинации индетерминантного розовоплодного томата Роз ст (0-12) x РБК1-251, Роз ст 9-1 x РБК1-251 и Роз ст 4-431 x 518-1133 (Рис.3) с групповой устойчивостью к фузариозу (ген *I2*), вирусу бронзовости (ген *Sw5*), вертициллезу (ген *Ve*), вирусу табачной мозаики (ген *Tm-2²*), клadosпориозу (гены *Cf-2/5*), нематоду (ген *Mi2*), мучнистой росе (ген *Ol-1*, *Ol-3*) вирусу желтой курчавости листьев томата (ген *Tu3a*).



Рис. 3. Перспективные гибридные комбинации индетерминантного розовоплодного томата с групповой устойчивостью: а - Роз ст (0-12) x РБК1-251; б - Роз ст 9-1 x РБК1-251; в - Роз ст 4-431 x 518-1133

Оценка симптомов фитофтороза линий томата на инфекционном фоне

Из таблицы 2 видно, что при оценке на инфекционном фоне все растения линий Кр1, Кр2, Кр5, Кр8 и Кр11 показали полную восприимчивость к фитофторозу, что указывает на надежность оценки на инфекционном фоне. Все растения линии Кр14 проявили полную устойчивость к фитофторозу. В линиях Кр4, Кр6, Кр7, Кр9, Кр10 и Кр12 наблюдается расщепление на устойчивые и восприимчивые растения.

Линии Кр-1, Кр-2, Кр5 и Кр11 не показали фенотипической дисперсии и все они несут родительский фенотип, «восприимчивый к фитофторозу». Таким образом, мы делаем вывод, что все эти линии являются гомозиготными по аллелю

восприимчивости. Все растения линии Кр14 имели фенотип, устойчивый к фитофторозу, таким образом, все они являются гомозиготными носителями аллеля устойчивости к фитофторозу. Установлено, что фенотипическое расщепление на устойчивые и восприимчивые растения в F3 потомстве КР6 составило 1 : 1,8 ($\chi^2 = 1,71 < \chi^2_{\text{теор.}} = 3,84$), в F3 потомстве КР7 1 : 4,3 ($\chi^2 = 0,67 < \chi^2_{\text{теор.}} = 3,84$), в F3 потомстве КР10 1,67 : 1 ($\chi^2 = 2,67 < \chi^2_{\text{теор.}} = 3,84$) и в F3 потомстве КР12 1 : 1,7 ($\chi^2 = 2,08 < \chi^2_{\text{теор.}} = 3,84$). Эти расщепления близки к теоретически ожидаемым при моногенном доминантном контроле признака 3:1. Это свидетельствует о том, что признак устойчивости к фитофторозу томата у изученных генотипов контролируется доминантным геном (Табл. 2).

Таблица 2: Результаты оценки коллекции образцов томата на устойчивость к фитофторозу на инфекционном фоне, 2023 г.

Название образца	Общее число растений	Число растений		Фактическое расщепление, R : S	Теоретическое ожидаемое, R:S	χ^2 факт. (P05)
		Устойчивых, R	Восприимчивых, S			
Кр1	24	0	24	-	-	-
Кр2	28	0	28	-	-	-
Кр4	32	24	8	3 : 1	3 : 1	0,00
Кр5	28	0	28	-	-	-
Кр6	28	18	10	2,6 : 1,4	3 : 1	1,71
Кр7	32	26	6	3,2 : 0,8	3 : 1	0,67
Кр8	24	0	24	-	-	-
Кр9	26	16	10	2,5 : 1,5	3 : 1	2,51
Кр10	32	20	12	2,5 : 1,5	3 : 1	2,67
Кр11	24	0	24	-	-	-
Кр12	27	17	10	2,5 : 1,5	3 : 1	2,08
Кр14	30	30	0	-	-	-

Определение наличия гена *Ph3* в геноме линии томата Кр6.

Амплификация ДНК потомства F3 томата Кр6 с использованием маркера TG328 без рестриктазы BstN1 показала наличие единственного фрагмента длиной 500 п.н. у всех растений (рис. 1), что демонстрирует эффективность этого маркера в амплификации этой области гена *ph3* устойчивости к фитофторозу. Электрофореграмма рестрицированных продуктов амплификации ДНК потомства F3 Кр6 томата показала наличие двух фрагментов у растений Кр6-1, Кр6-2, Кр6-3 и Кр6-4. Фрагмент размером 500 п.н. и два фрагмента очень близкого размера, 240 п.н. и 260 п.н. (рис.3). Наличие фрагмента размером 500 п.н. указывает на отсутствие сайта рестрикции на этом фрагменте. Эта последовательность соответствует рецессивному аллелю восприимчивости гена *ph3* к фитофторозу. Наличие фрагментов размером 240 и 260 п.н. свидетельствует о существовании на этом фрагменте сайта рестриктазы BstN1. Эта последовательность соответствует

доминантному аллелю гена (рис. 2). Растения Кр6-1, Кр6-2, Кр6-3 и Кр6-4 несут доминантные и рецессивные аллели гена Ph3, поэтому имеют гетерозиготный генотип. С другой стороны, растения Кр6-5, Кр6-6, Кр6-7, Кр6-8, Кр6-9, Кр6-10, Кр6-11 и Кр6-12 являются носителями рецессивного аллеля гена ph3, и имеют гомозиготный генотип.

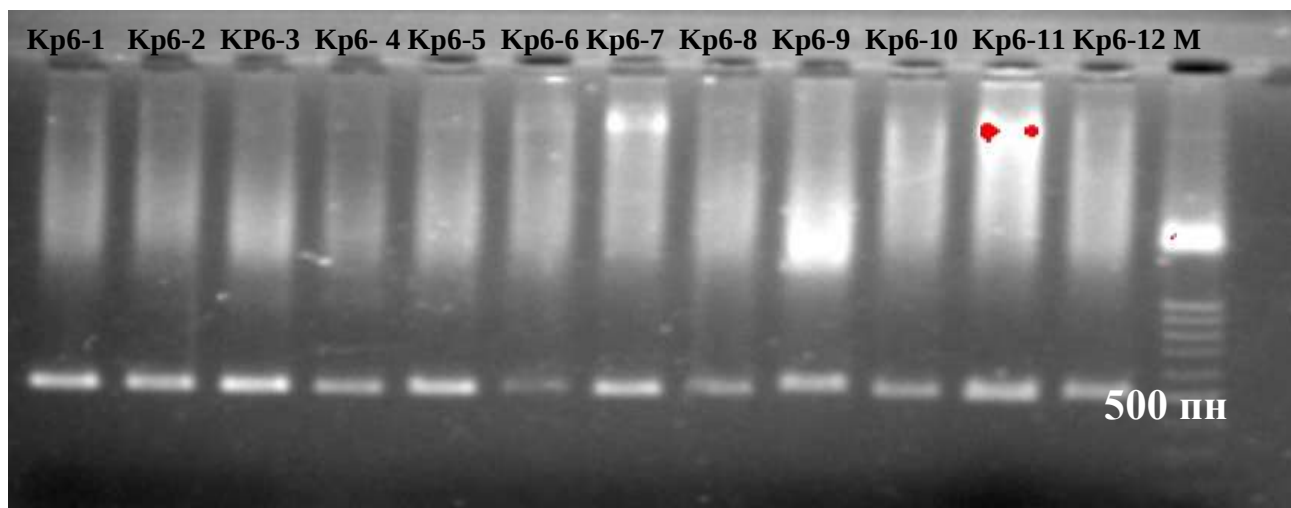


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов амплификации потомства F3 Кр6-1 –Кр6-12 без рестрикции, М – молекулярный маркер GeneRuler 1 kb DNA

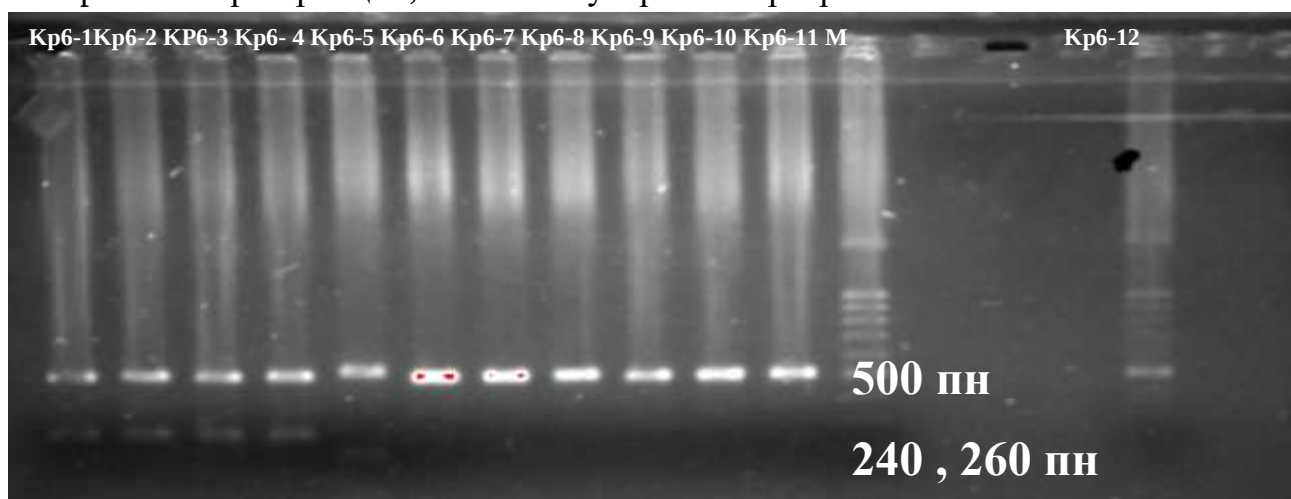


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов амплификации потомства F3 Кр1 –Кр12 после рестрикции BstNI, 1-4 – гетерозиготные генотипы; 5-12 – рецессивные гомозиготы генотипы. М – молекулярный маркер GeneRuler 1 kb DNA

Заключение

1. В результате скрининга 32 молекулярных маркеров 15 генов устойчивости (*Tm-2*, *Tm-2²*, *Cf-2/5*, *CF6*, *y-3/Ty-3a*, *Ty-2*, *I2*, *Ve*, *R1*, *R3a*, *Ph-3*, *SW5*, *Mi23* и *Ol1*) к 9 наиболее значимым заболеваниям томата (*L. esculentum*): фузариозу (возбудитель - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), вертициллезу (возбудитель - *Verticillium dahliae*), кладоспориозу (возбудитель - *Cladosporium fulvum*), фитофторозу (возбудитель - *Phytophthora infestans*), бронзовости (возбудитель - *Тосновир*ус бронзовости томата), нематодам (*Meloidogyne*

incognita), мучнистой росе (возбудитель - *O. neolycopersici* sp. nov.), вирусу желтой курчавости листьев томата (возбудитель - *Бегеновирус желтой курчавости листьев томата*) и вирусу томатной мозаики (возбудитель - *вирус томатной мозаики*) - на генетической коллекции индетерминантного розовоплодного томата выявлен полиморфизм 18 молекулярных маркеров ассоциированных с 11 генами устойчивости (*I₂*, *I2C-1* *Ve*, *Mi23*, *Tm-2²*, *Cf-2*, *Cf-5*, *Sw5*, *Ty-2*, *Ol-1* и *Ol-2*).

2. В результате скрининга генетической коллекции линий индетерминантного розовоплодного томата, представленной 16 линиями с функциональной мужской стерильностью и 3 фертильными линиями, с использованием 18 отобранных полиморфных молекулярных маркеров, ассоциированных с 10 генами устойчивости (*I₂*, *Ve*, *Mi23*, *Tm-2²*, *Cf-2*, *Cf-5*, *Sw5*, *Ph-3*, *Ty-2*, *Ol-1*) произведена дифференциация линий по содержанию генов устойчивости: 1) у линий с функциональной мужской стерильностью Роз ст 0-1, Роз ст 1-3, Роз ст2(2), Роз ст3(3), Роз ст 4-431, Роз ст5(1), Роз ст6(3), Роз ст7(3), Роз ст 8-64, Роз ст 9(121), Роз ст 12(1), Роз ст 13(2), Роз ст 15(1), Роз ст 16(3), Роз ст 20(3), Роз ст 22(3) и у фертильной линии РБК1-251 выявлены гены устойчивости *I₂*, *Ve*, *Mi2*, *Tm-2²*, *Cf-5*, *Sw5*, *TYLCV* и *Oll*; у фертильной линии Клубка куба (КК) выявлены гены *I2-I2C-1* и *I2-J2C-1*, *Sw-5*, *Mi-2*; у фертильной линии 518-1133 - только ген *Mi2*.

3. Оценкой на инфекционном фоне устойчивости к фитофторозу генетической коллекции томата Кр-1 – Кр-14, представленной линиями F3 поколения, выявлен фенотипический полиморфизм реакции линий и расщепление по устойчивости/восприимчивости внутри линий: линия Кр-14, проявила полную устойчивость; линии Кр-4, Кр-6, Кр-7, Кр-9, Кр-10, Кр-12 имели расщепление по устойчивости/восприимчивости; линии Кр-1, Кр-2, Кр-5, Кр-8, Кр-11 проявили полную восприимчивость. Анализ расщепления устойчивости/восприимчивости растений позволил установить моногенный доминантный тип наследования устойчивости к фитофторозу линий томата. Молекулярно-генетическим исследованием расщепляющего потомства линии Кр-6 (Кр6-1 – Кр6-12) по генам устойчивости *Ph-3* выявлено, растения Кр6-1, Кр6-2, Кр6-3, Кр6-4 - гетерозиготы по гену *Ph-3/ph-3*.

4. В результате оценки комбинационной способности линий с функциональной мужской стерильностью установлены:

- максимальный положительный эффект ОКС по признаку «число листьев до первого соцветия» у линий Роз ст (12)4 ($g_i = 0,96$ шт.), Роз ст 4-432, ($g_i = 1,31$ шт.) и Роз ст 9-1 ($g_i = 0,89$ шт.);

- максимальный отрицательный эффект ОКС по признаку «продолжительность периода «всходы – начало цветения» у линий Роз ст3-23 и Роз ст 9-121 ($g_i = -1,65$ суток), Роз ст 9-12 2017 ($g_i = -1,98$ суток);

– максимальный отрицательный эффект ОКС по признаку «продолжительность периода «всходы – начало созревания» у линий Роз ст 6-322 ($g_i = -3,23$ суток), Роз ст 4-431 ($g_i = -7,23$ суток), Роз ст3-23 ($g_i = -2,23$ суток), Роз ст8-61($g_i = -2,90$ суток);

– максимальный положительный эффект ОКС по признаку «число плодов на одном растении» у линий Роз ст 6-322 ($g_i=12,87$ шт.), Роз ст 3-11 ($g_i=10,32$ шт.), и Роз ст 4-431 ($g_i=22,76$ шт.);

– максимальный положительный эффект ОКС по признаку «масса товарных плодов на растение» у линий Роз ст 3-11($g_i = 0,77$ кг), Роз ст 7-3 ($g_i = 0,77$ кг) и Роз ст 4-432 ($g_i = 0,77$ кг).

5. Изучение корреляции проявления признаков число листьев до первого соцветия (шт.), продолжительность периода «всходы-цветение» (сут.), продолжительность периода «всходы-созревание» (сут.), число плодов на растении (шт.), продуктивность (кг), с использованием данных испытания F1-гибридов позволило установить: положительную связь средней силы $r=0,58$ признаков «число плодов на растении» и «продолжительность периода «всходы-созревание»; связь в других сочетаниях признаков или отсутствовала, или была низкой, что свидетельствует о возможности комбинирования указанных признаков в желаемых сочетаниях.

6. Комплексным анализом проявления хозяйственно ценных признаков: число листьев до 1 соцветия, продолжительность периода «всходы – начало цветения», продолжительность периода «всходы – начало созревания», число плодов на растении, масса товарных плодов на растении, выделены 3 перспективные гибридные комбинации индетерминантного розовоплодного томата Роз ст (0-12) x РБК1-264, Роз ст 9-1 x РБК1-264 и Роз ст 4-431 x 518-1133 с групповой устойчивостью к фузариозу (ген I_2), вирусу бронзовости (ген $Sw5$), вертициллезу (ген Ve), вирусу табачной мозаики (ген $Tm-2^2$), клядоспориозу (гены $Cf-2/5$), нематодe (ген $Mi2$), мучнистой росе (ген $Ol-1$) вирусу желтой курчавости листьев томата (ген $Tu3a$).

Рекомендации для селекции и производства

1. Использовать для селекции индетерминантных розовоплодных томатов в качестве доноров групповой устойчивости фертильную линию РБК1-251 и линии с функциональной мужской стерильностью Роз ст 0-1, Роз ст 1-3, Роз ст2(2), Роз ст3(3), Роз ст 4-431, Роз ст5(1), Роз ст6(3), Роз ст7(3), Роз ст 8-64, Роз ст 9 (121), Роз ст 12(1), Роз ст 13(2), Роз ст 15(1), Роз ст 16(3), Роз ст 20(3), Роз ст 22 (3) содержащие гены устойчивости I_2 , Ve , $Mi2$, $Tm-2^2$, $Cf-5$, $Sw5$, $Ph-3$, $TYLCV$ и Oll .

2. Использовать для селекции на устойчивость к фитофторозу (возбудитель - *Phytophthora infestans*) линию Кр-14 – донор моногенной доминантной устойчивости к фитофторозу, содержащей ген $Ph3$.

3. Перспективные гибридные комбинации Роз ст (0-12) × РБК1-264, Роз ст 9-1 × РБК1-264 и Роз ст 4-431 × 518-1133 рекомендуется передать на расширенное экологическое и производственное испытание с целью последующей государственной регистрации и внедрения в промышленное овощеводство.

Публикации в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Хунвану Виньину Никэз. Молекулярно-генетический скрининг маркеров генов устойчивости в генетической коллекции томатов / Хунвану Виньину Никэз, С. Г. Монахос // Достижения науки и техники АПК. - 2024. - Т. 38. - № 12. - С. 4–10. doi: 10.53859/02352451_2024_38_12_4

2. Хунвану Виньину Никэз. Фенотипический и молекулярно-генетический скрининг устойчивости образцов томата к фитофторозу / Хунвану Виньину Никэз, Г.Ф. Монахос, С.Г. Монахос //Овощи России. 2024;(5):12 <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2024-5-12-17>

Публикации в прочих научных изданиях

1. Хунвану Виньину Никэз. Комбинационная способность инбредных линий томата по хозяйственно-ценным признакам и выделение перспективных гибридных комбинаций / Хунвану Виньину Никэз, С. Г. Монахос // В сборнике : трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика Г.И. Тараканова «Российский государственный аграрный университет –МСХА имени К.А. Тимирязева», 2023. – С. 103-107.

2. Хунвану Виньину Никэз. Молекулярно-генетический скрининг коллекций стерильных и фертильных линий индетерминантных розовых томатов по генам устойчивости к наиболее значимым заболеваниям / Хунвану Виньину Никэз, С. Г. Монахос // В сборнике: 23-я Всероссийская конференция молодых учёных, 2023. – С. 49-50.