

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-6-16-21>
УДК 635.64:631.524.86

**И.Н. Шамшин*, Е.В. Грошева,
М.В. Маслова, Р.М. Самойлова**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Мичуринский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ) 393760, Российская Федерация, Тамбовская область, г. Мичуринск, ул. Интернациональная, д.101

*Автор для переписки:
ivan_shamshin@mail.ru

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства сельского хозяйства РФ № АААА-А20-120121700029-9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в планировании и постановке эксперимента, а также в анализе экспериментальных данных и написании статьи.

Для цитирования: Шамшин И.Н., Грошева Е.В., Маслова М.В., Самойлова Р.М. Создание новых форм томата с генами устойчивости к грибным болезням на основе маркерной селекции. *Овощи России*. 2021;(6):16-21. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-6-16-21>

Поступила в редакцию: 08.10.2021
Принята к печати: 18.10.2021
Опубликована: 25.11.2021

**Ivan N. Shamshin*, Ekaterina V. Grosheva,
Marina V. Maslova, Rufina M. Samoilova**

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Michurinsky State Agrarian University" (Michurinsky GAU) 101, Internationalnaya Str., Michurinsk. Tambov region, Russian Federation, 393760

*Corresponding Author:
ivan_shamshin@mail.ru

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation No. АААА-А20-120121700029-9.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Authors' Contribution. All authors contributed to the planning and setting up the experiment, as well as in the analysis of experimental data and writing of the article.

For citations: Shamshin I.N., Grosheva E.V., Maslova M.V., Samoilova R.M. Creation of new tomato forms with fungal disease resistance genes based on marker selection. *Vegetable crops of Russia*. 2021;(6):16-21. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-6-16-21>

Received: 08.10.2021
Accepted for publication: 18.10.2021
Published: 25.11.2021

Создание новых форм томата с генами устойчивости к грибным болезням на основе маркерной селекции



Резюме

Цель. Исследования направлены на получение новых форм томата с комплексом генов устойчивости к грибным болезням в сочетании со штамбовым типом куста и темной окраской плодов на основе маркер-опосредованной селекции.

Методы. Объект исследований – сорта и гибридные формы томата из коллекции Мичуринского ГАУ. Молекулярно-генетический анализ проводили с использованием следующих методов. Экстрагирование ДНК осуществляли из молодых листьев с применением набора для выделения НК «Проба НК» производства ООО «Агродиагностика» согласно протоколу производителя. Для проведения ПЦР использованы наборы производства компании Fermentas. Идентификацию гена устойчивости к кладоспориозу Cf-19 проводили с использованием ДНК-маркера P7. Наличие гена устойчивости к фузариозному увяданию определяли с помощью маркера I-2/5. Визуализацию результатов амплификации осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле.

Результаты. При проведении исследований была проанализирована коллекция сортов и гибридных форм томата Мичуринского ГАУ с целью идентификации генов устойчивости к кладоспориозу Cf-19 и фузариозному увяданию I-2. Всего проанализировано 52 генотипа. Установлено, что для большинства образцов (41 образец) характерно гетерозиготное состояние гена Cf-19. Все индетерминантные и полудетерминантные формы имели оба аллеля. Из 23 представленных в коллекции детерминантных форм у 10 отмечен только один аллель, соответствующий рецессивной гомозиготе. Среди всех анализируемых генотипов томата не отмечено доминантных гомозиготных форм. Изучение коллекции позволило выявить нескольких аллелей гена I-2. Всего амплифицировано четыре фрагмента, соответствующих различным аллелям. Всего устойчивых генотипов в коллекции выделено 50. У 42 образцов томата идентифицированы два аллеля гена I-2 (633/693 п.н.). Четыре сорта гомозиготны по одному аллелю (633 п.н.), обуславливающему устойчивость. Три сорта имеют второй аллель (566 п.н.) устойчивости. Один генотип имеет только аллель определяющий восприимчивость (693 п.н.).

На основании молекулярного анализа, а также оценки типа куста и окраски плода был проведен отбор исходных форм с последующей гибридизацией. Получено 67 гибридных растений томата. Оценка наличия генов устойчивости показала, что большинство полученных гибридов являются устойчивыми к кладоспориозу и фузариозу. Это обусловлено наличием доминантных аллелей генов Cf-19 и I-2 в гетерозиготном состоянии. Среди полученных гибридов выделены растения со штамбовым типом куста. Всего таких растений получено 13. Проведенная работа позволила получить гибридные формы томата, сочетающие признаки устойчивости к двум возбудителям грибных болезней и штамбовый тип куста. Эти формы планируется использовать в дальнейшей селекционной работе.

Ключевые слова: томат, маркер-опосредованная селекция, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum*, ДНК-маркер

Creation of new tomato forms with fungal disease resistance genes based on marker selection

Abstract

Relevance. The presented studies are aimed at obtaining new forms of tomato with a complex of genes for resistance to fungal diseases in combination with a standard type of bush and dark coloring of fruits based on marker-mediated selection.

Methodology. The biological objects of the study are varieties and hybrid forms of tomato from the collection of the Michurinsky SAU. Molecular genetic analysis was performed using the following methods. DNA extraction was carried out from young leaves using a kit for isolation of NC Sample NC manufactured by Agrodiagnostika LLC according to the manufacturer's protocol. Fermentas production kits were used for PCR. Identification of the cladosporiosis resistance gene was Cf-19 performed using the DNA marker R7. The presence of a fusarium wilting resistance gene was determined by a I-2/5 marker. The amplification results were visualized by agarose gel electrophoresis.

Results. During the research, a collection of varieties and hybrid forms of tomato of the Michurinsky GAU was analyzed in order to identify genes for resistance to cladosporiosis Cf-19 and fusarium wilt I-2. A total of 52 genotypes were analyzed. It was found that most samples (41 samples) are characterized by a heterozygous state of the Cf-19 gene. All indeterminate and semi-determinant forms had both alleles. Of the 23 determinant forms presented in the collection, 10 had only one allele corresponding to recessive homozygote. Among all analyzed tomato genotypes, no dominant homozygous forms were noted. The study of the collection revealed several alleles of the I-2 gene. In total, four fragments corresponding to various alleles were amplified. A total of 50 resistant genotypes have been identified in the collection. Two alleles of the I-2 gene (633/693 bp) were identified in 42 tomato samples. Four varieties are homozygous in one allele (633 bp), which determines resistance. Three varieties have a second resistance allele (566 bp). One genotype has only an allele defining susceptibility (693 bp). On the basis of molecular analysis, as well as an assessment of the type of bush and fetal color, initial forms were selected with subsequent hybridization. 67 hybrid tomato plants were obtained. Evaluation of the presence of resistance genes showed that most of the resulting hybrids are resistant to cladosporiosis and fusariosis. This is due to the presence of dominant alleles of Cf-19 and I-2 genes in a heterozygous state. Among the resulting hybrids, plants with a bush type of bush were identified. A total of 13 such plants were obtained.

Conclusion. Thus, the work carried out allowed to obtain hybrid forms of tomato combine the signs of resistance to two pathogens of fungal diseases and the stem type of the bush. These forms are planned to be used in further selection work.

Keywords: tomato, marker-mediated selection, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum*, DNA-marker

Введение

Грибные болезни томата являются одной из главных причин снижения урожайности. Они наносят значительный ущерб, как в защищенном грунте, так и в открытом. Основным способом борьбы с возбудителями заболеваний остается обработка химическими препаратами. Однако постоянное применение пестицидов индуцирует появление устойчивых к ним популяций вредных организмов [1, 2]. Кроме того, томат активно используется для диетического питания детей и взрослых. Это требует минимализации химической нагрузки [3]. Поэтому оптимальным вариантом является использование устойчивых сортов.

Одним из способов ускоренного создания высокопродуктивных форм томата с комплексом генов резистентности является маркерная селекция. Отбор растений непосредственно по анализу генома позволяет проводить пирамидирование генов в достаточно короткие сроки в сравнении с традиционными методами селекции.

Кладоспориоз томата – заболевание, вызываемое грибом *Cladosporium fulvum*. Он поражает листья томата, проникая через устьица. После заражения мицелий *C. fulvum* разрастается в клетках листа, и широко колонизирует межклеточные пространства. Через 10-14 дней конидии гриба прорастают на поверхность листовой пластины и способны к повторному заражению. Заболевание снижает интенсивность дыхания и приводит к гибели растения [4].

Во время колонизации листьев *C. fulvum* выделяет много низкомолекулярных белков в апопласт листа. Было показано, что некоторые из этих белков функционируют как детерминанты авирулентности (*Avr*) конкретных генотипов томатов [5]. Наличие гена устойчивости *Cf* позволяет синтезировать белок способный распознавать различные продукты гена *Avr*, кодируемые возбудителем. Возникает гиперчувствительный ответ. В результате на месте инфицирования образуются типичные некротические пятна и дальнейший рост гиф прекращается [6].

С момента открытия гена *Cf-1* в 1930 годах сообщалось о 24 идентифицированных генах устойчивости к кладоспориозу томата [7]. Большинство из них локализованы на коротких плечах 1 и 6 хромосомы [8]. К настоящему времени наиболее изученными остаются гены *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-5* и *Cf-9*. Они клонированы, для значительной части из них известна нуклеотидная структура и размер [6]. Исследователи объединяют гены *Cf* в два мультигенных семейства *Hcr2s* и *Hcr9s*. Гены *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-9* и *Cf-9DC* принадлежат к семейству генов *Hcr9s* [9, 6], тогда как гены *Cf-2* и *Cf-5* принадлежат к семейству *Hcr2* [10, 11].

Идентифицировано и картировано еще несколько генов устойчивости к *C. fulvum*, которые активно используются в селекции томата. Так в локусе *Hcr9s* на хромосоме 1 выявлен ген *Cf-10*. Доказана его роль в физиологической и транскрипционной регуляции устойчивости к кладоспориозу [8]. На хромосоме 8 установлено наличие еще одного гена *Cf-12*. Растения томата с ним проявляют высокую степень устойчивости к возбудителю [12]. Ген *Cf-19*, расположенный на хромосоме 1 является гомологом гена *Cf-9* (*Hcr9*) и позволяет растению противостоять расам 1,2,4,5 *C. fulvum*. Данный ген является доминантным. На сегодняшний день не зарегистрировано поражений генотипов томата с геном *Cf-19* [13].

Для идентификации *Cf-19* разработан молекулярный маркер P7. Он был успешно протестирован в селекционной работе и показал высокую эффективность. Авторы рекомендуют использовать его при маркер-опосредованном отборе [13].

Еще одним вредоносным заболеванием томата является фузариозное увядание. Его вызывает грибок *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). *F. oxysporum* проникает в растения обычно

через микротрещины, возникающие при формировании боковых корней, или поранения, а также через корневые волоски.

Идентифицировано три расы возбудителей фузариоза [14]. Первая и вторая расы широко распространены по всему миру, а третья имеет ограниченное распространение в странах с жарким климатом [15]. В теплицах России преобладает раса 1 (90%), раса 2 встречается в 10% случаев заражения томата фузариозом [16].

В культурные сорта томата включены три гена устойчивости к болезни (*I*, *I-2*, *I-3*), взятые из дикорастущих видов. Гены *I* и *I-2* расположены на 11 хромосоме и получены от *S. pimpinellifolium*. Они придают устойчивость к расам 1 и 2 соответственно. Ген *I-3*, локализованный на 7 хромосоме, впервые идентифицирован у вида *S. pennellii*. Он дает возможность противостоять расе 1-3 возбудителя [17].

Гены устойчивости к фузариозу вырабатывают белок, взаимодействующий с эффекторными белками генов *Avr1*, *Avr2* и *Avr3* *F. oxysporum*. Эти эффекторы представляют собой небольшие белки с дисульфидной связью, которые секретируются в клеточный сок при заражении. При этом ген *Avr3* срабатывает только тогда, когда грибок находится в контакте с живыми клетками растений. Взаимодействие генов томата и возбудителя заболевания приводит к иммунитету, индуцируемому эффектором (effector-triggered immunity ETI), что предотвращает быстрое заражение растения [18].

Наибольшее значение в селекции томата на устойчивость к фузариозу имеет ген *I-2*. Именно его наличие в генотипе дает резистентность у большинства современных сортов [19-22]. Для его идентификации и ускорения отбора новых форм проведен ряд работ по поиску молекулярных маркеров [23-25].

В нашей стране доля томатов, выращенных в открытом грунте, остается значительной. Поэтому риск потери урожая от грибных инфекций высокий. Целесообразным является переход на сорта с комплексом генов устойчивости. Создание таких генотипов возможно с использованием пирамидирования генов на основе молекулярного анализа. В представленной работе изложены исследования коллекции томата Мичуринского ГАУ с применением молекулярных маркеров генов устойчивости к кладоспориозу и фузариозу, а также дальнейшее использование отобранных генотипов для получения новых форм томата для открытого грунта.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе учебно-исследовательского тепличного комплекса и лаборатории молекулярно-генетического анализа плодовых растений Мичуринского ГАУ. Исходные формы и гибриды томата культивировались в торфо-почвенной смеси в емкостях объемом 7 литров в условиях поликарбонатного укрытия. Были проанализированы по одному растению каждого сорта. Листья отбирали из коллекционных образцов на стадии рассады до высадки на постоянное место. Отобранные растения использовали для последующей селекционной работы. Всего проанализировано 52 сорта томата из коллекции Мичуринского ГАУ. Два сорта были отобраны для гибридизации и получено гибридное потомство. Проанализировано с использованием молекулярных маркеров 67 гибридных растений.

Выделение ДНК проводили из молодых листьев с использованием набора для экстрагирования нуклеиновых кислот «Проба НК» производства ООО «Агродиагностика» согласно протоколу.

Для оценки использованы молекулярные маркеры гена устойчивости к фузариозу (*I-2*) томата [24, 26]. Последовательность праймерных пар представлена в таблице 1.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность пар праймеров, используемых в работе
Table 1. Nucleotide sequence of primer pairs used in operation

Название Name	Прямая последовательность Forward sequence	Обратная последовательность Reverse sequence
P7	AGTGCAGAAATGGGTTGTGTA	CCGGAGATCAAGCTCAACCA
I-2/5	CAAGGAACTGCGTCTGTCTG	ATGAGCAATTTGTGGCCAGT

Реакционная смесь для ПЦР со всеми праймерами объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTP, 2,5 мМ MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 10х стандартного ПЦР-буфера. Реакцию для обоих пар праймеров проводили в приборе SimpliAmp (Life Technology) по программе:

- для маркера P7 – 94°C – 4 мин, 35 циклов 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 1 мин и финальная элонгация в течение 7 мин при 72°C;

- для маркера I-2/5 – 5 мин 94°C, 35 циклов 30 с 94°C, 30 с 55°C, 1 мин 72°C и финальная элонгация в течение 7 мин при 72°C.

Результаты амплификации разделялись путем электрофореза в 2% агарозном геле. После электрофореза гель анализировали в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора.

Отбор исходных форм растений по признаку роста и окраске плодов томата осуществляли на основании визуальной оценки.

Результаты и обсуждения

Для создания новых генотипов томата была проанализирована коллекция сортов Мичуринского ГАУ по ряду признаков. Проведен отбор по наличию генов устойчивости к кладоспориозу и фузариозу. Кроме признака устойчивости исходные формы отбирали по силе роста (штамбовые формы) и окраске плодов (темная-красная или фиолетовая).

Отбор по наличию генов устойчивости проводили с использованием ДНК-маркеров. В результате проведенного анализа получены четкие воспроизводимые результаты.

Коллекция исходных форм томата Мичуринского ГАУ проанализирована с использованием маркера P7 с целью идентификации гена устойчивости к кладоспориозу *Cf-19*. Маркер является кодоминантным и позволяет выявить аллельное состояние гена. Для апробации маркера было проведено его тестирование на 345 гибридах томата F₂, полученных от скрещивания двух контрастных форм [26]. Также данный маркер был успешно использован при анализе 964 линий томатов разных семеноводческих компаний Китая [27].

Эффективность работы данного маркера была нами ранее проверена и проведено сравнение с результатами искусственного заражения. Все контрольные образцы с маркером P7 обладали устойчивостью [28].

В результате проведения реакции амплифицируется два фрагмента длиной 250 и 300 п.н. Первый фрагмент соответствует рецессивному аллелю, второй – доминантному [26]. Результаты проведенного анализа сортов томата представлены в таблице 2.

Исследование показало, что для большинства сортов и гибридов томата коллекции Мичуринского ГАУ (41 образец) характерно гетерозиготное состояние исследуемого гена. Можно отметить аллельное разнообразие гена *Cf-19* у генотипов с различным типом куста. Все индетерминантные и полудетерминантные формы имели оба аллеля. Из 23 представленных в коллекции детерминантных форм у 10 отмечен только один аллель, соответствующий рецессивной гомозиготе.

Среди всех анализируемых генотипов томата не отмечено доминантных гомозиготных форм. Вероятно, это объясняется отсутствием целенаправленного отбора по признаку устойчивости к кладоспориозу.

Наличие гена устойчивости к фузариозу *I-2* проводили с использованием кодоминантного маркера *I-2/5*. Данный маркер, как и P7, рекомендован для маркерного отбора и широко используется при селекционной работе. Так маркер *I-2/5* использован в оценке 10 линий томата турецкими селекционерами для дальнейшего пирамидирования генов устойчивости к фузариозу [21]. Исследователи института в Бейруте применяли его при анализе 40 исходных линий томата для идентификации гена *I-2*. При исследовании было установлено наличие гена в 39 линиях [20]. 27 генотипов томата изучено с использованием маркера *I-2/5* белорусскими исследователями для оценки исходного материала [23].

Изучение коллекции томата Мичуринского ГАУ позволило выявить нескольких аллелей гена *I-2*. Всего амплифицировано четыре фрагмента различного размера: 633 п. н. (аллель *I-2*), 566 п. н. (аллель *I-2C*) – аллели устойчивости; 693 п. н. – аллель, определяющий восприимчивость [16]. Кроме того, был идентифицирован фрагмент размером 700 п.н., ранее не отмечавшийся исследователями. Результаты анализа отображены в таблице 2.

Всего устойчивых генотипов в коллекции идентифицировано 50. У 42 образцов томата идентифицированы два аллеля гена *I-2* (633/693 п.н). Четыре сорта Сибирский скороспелый, Микадо сибирико, Иван Купала и Зефир в шоколаде гомозиготны по аллелю *I-2* (633 п.н.). У детерминантных сортов Каротинка, Рио-Гранде и индетерминантного сорта Итальянское спагетти амплифицирован фрагмент размером 566 п.н. (аллель *I-2C*). При этом сорт Рио-Гранде является гомозиготной формой, а у сорта Итальянское спагетти в генотипе присутствуют оба аллеля, обуславливающие устойчивость. Один генотип имеет только аллель определяющий восприимчивость (693 п.н.).

У части исследуемых генотипов имеются дополнительные фрагменты. Так, у сортов Виват и Япончик выявлен фрагмент в 700 п.н. Возможно, что эти фрагменты являются дополнительными локусами гена *I-2* и требуют дальнейшего изучения.

Из исследуемых генотипов томата были отобраны исходные формы для последующей гибридизации. Основной целью проводимой селекционной работы является создание сорта с комплексом генов устойчивости к грибным болезням, а также штамбовым типом куста и темной окраски плода. Штамбовые генотипы представлены в коллекции тремя сортами и одним гибридом F₁ (табл. 2). Наиболее перспективным является сорт Красавец селекции Мичуринского ГАУ. Он обладает компактным, в сравнении с остальными сортами коллекции, типом куста и хорошо зарекомендовал себя на протяжении ряда лет испытаний по ряду ценных признаков. В качестве генетического источника признака темной окраски плодов был выбран сорт Сибирский тигр (Siberian tiger). Оба отобранных генотипа устойчивы к фузариозному увяданию, что обусловлено присутствием гена *I-2* в доминантном аллельном состоянии. Сорт Сибирский тигр так же обладает

Таблица 2. Результаты анализа исходных форм томата с использованием молекулярных маркеров
 Table 2. Results of analysis of initial tomato forms using molecular markers

№ п/п No p/p	Сорт, гибрид томата Variety, tomato hybrid	Маркер P7. Размер фрагмента, п.н. Marker P7. Fragment size, bp	Маркер I-2/5. Размер фрагмента, п.н. Marker I-2/5. Fragment size, bp	Окраска зрелого плода Color of mature fruit	Тип куста Bush Type
1	Буй-Тур	250/300	633/693	Красная	Детерминантный/штамбовый
2	Волгоградский штамбовый	250/300	633/693	Красная	Детерминантный/штамбовый
3	Элтон Джон F ₁	250/300	633/693	Желтая	Детерминантный/штамбовый
4	Красавец	250	633/693	Красная	Детерминантный/штамбовый
5	Тамерлан	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
6	Метелица	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
7	Морковный	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
8	Сибирский скороспелый	250/300	633	Красная	Детерминантный
9	Джина	250	633/693	Красная	Детерминантный
10	Дар Заволжья	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
11	Жирдяй F ₁	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
12	Благородный принц	250	693	Красная	Детерминантный
13	Каротинка	250/300	633/566	Оранжевая	Детерминантный
14	Непрядва	250	633/693	Красная	Детерминантный
15	Золотничок	250	633/693	Оранжевая	Детерминантный
16	Орлик	250	633/693	Оранжевая	Детерминантный
17	Виват	250	693/700	Оранжевая	Детерминантный
18	Япончик	250	633/566	Красная	Детерминантный
19	Рио-Гранде	250	566	Красная	Детерминантный
20	Непас 9	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
21	Властелин степей F ₁	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
22	Ажур F ₁	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
23	Первоклашка	250/300	633/693	Розовая	Детерминантный
24	Красный петух	250/300	633/693	Красная	Детерминантный
25	Рябчик	250/300	633/693	Красная с желтыми опосами	Детерминантный
26	Демидов	250/300	633/693	Розовая	Детерминантный
27	Японская роза	250/300	633/693	Розовая	Детерминантный
28	Сокол	250/300	633/693	Оранжевая	Индетерминантный
29	Славянский шедевр	250/300	633/693	Красная	Индетерминантный
30	Золотая капля	250/300	633/693	Желтая	Индетерминантный
31	Мечта Алисы	250/300	633/693	Желто-оранжевая	Индетерминантный
32	Черное сердце (Brad's black heart)	250/300	633/693	Темно-красный с фиолетовым осованием	Индетерминантный
33	Синяя груша	250/300	633/693	Нижняя часть красно- коричневая, верхняя - фиолетовая	Индетерминантный
34	Белле F ₁ (Belle F ₁)	250/300	633/693	Красная	Индетерминантный
35	Японский краб	250/300	633/693	Розовая	Индетерминантный
36	Сибирский тигр (Siberian tiger)	250/300	633/693	Темно-розовый с фиолетовыми штрихами	Индетерминантный
37	Золотой Кенигсберг	250/300	633/693	Желтая	Индетерминантный
38	Итальянское спагетти	250/300	633/566	Светло-красный цвет с тёмно-зелёным пятном у плодоножки	Индетерминантный
39	Паскаль из Пикардии (Pascal de Picardie)	250/300	633/693	Малиново-красная с фиолетовыми плечиками	Индетерминантный
40	Зефир в шоколаде	250	633	Красно-коричневая с зелеными штрихами у основания	Индетерминантный
41	Корнабель F ₁	250/300	633/693	Красная	Индетерминантный
42	Розовый гигант	250/300	633/693	Розовая	Индетерминантный
43	Черная принцесса	250/300	633/693	Буровато-коричневая	Индетерминантный
44	Микадо сибирико	250/300	633	Розовая	Индетерминантный
45	Иван Купала	250/300	633	Красная	Индетерминантный
46	Черный кот F ₁	250/300	633/693	Красно-коричневая	Индетерминантный
47	Черный мавр	250/300	633/693	Красно-коричневая	Полудетерминантный
48	Лодочка	250/300	633/693	Розовая	Полудетерминантный
49	Глаша	250/300	633/693	Розовая	Полудетерминантный
50	Оранжевые сливки	250/300	633/693	Оранжевая	Полудетерминантный
51	Король ранних	250/300	633/693	Красная	Полудетерминантный

устойчивостью к кладоспориозу, являясь гетерозиготой по гену *Cf-19*.

От скрещивания сортов Красавец Ч Сибирский тигр получено 67 гибридных растений (F_1). Все растения были проанализированы на наличие генов *Cf-19* и *I-2*. Анализ показал присутствие двух аллелей гена устойчивости к кладоспориозу (*Cf-19*) у всех гибридных форм томата. По гену *I-2* наблюдается разнообразие. У большинства исследуемых генотипов отмечены оба аллеля гена. Два растения гомозиготны по доминантным аллелям *I-2* и *I-2C*.

Среди полученных гибридов выделены растения со штамбовым типом куста. Всего таких растений получено 13 (рис. 1). Остальные растения были индетерминантного типа (рис. 2)



Рис. 1. Гибриды томата F_1 со штамбовым типом куста
Fig. 1. Hybrids of tomato F_1 with shtambovy type of bush



Рис. 2. Гибриды томата F_1 с индетерминантным типом куста
Fig. 2. Tomato F_1 hybrids with an indeterminant type of bush

У всех штамбовых растений окраска плода была монохроматической, как у исходного сорта Красавец (рис.3). Все индетерминантные растения имели плоды с окраской как у сорта Сибирский тигр (рис.4).

Результаты молекулярного анализа штамбовых гибридов показал наличие устойчивости к кладоспориозу и фузариозу у всех растений, обусловленные наличием доминантных аллелей генов *Cf-19* и *I-2*.



Рис.3. Окраска плодов у штамбовых гибридов F_1
Fig.3. Fruit decoration in shtambovy hybrids F_1



Рис.4. Окраска плодов у индетерминантных гибридов F_1
Fig.4. Fruit colour in indeterminant hybrids F_1

Таким образом, полученные гибридные формы томата сочетают признаки устойчивости к двум возбудителям грибных болезней и штамбовый тип куста. Эти формы планируются использовать в дальнейшей селекционной работе.

Закключение

Проведенное исследование позволило проанализировать аллельное разнообразие генов устойчивости к кладоспориозу и фузариозу томата в коллекции сортов и гибридов Мичуринского ГАУ. На основании молекулярного исследования были отобраны исходные формы для селекции. С их использованием получены гибриды, сочетающие в себе два гена устойчивости и другие ценные признаки.

В дальнейшем селекционная работа с использованием данных гибридов будет продолжена. Для создания штамбового типа томата с темной окраской плодов планируется получение гибридов второго поколения от наиболее перспективных форм F_1 с учетом данных молекулярного анализа.

Об авторах:

Иван Николаевич Шамшин – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетического анализа плодовых растений, <https://orcid.org/0000-0002-4464-1876>, Scopus ID 56708633300, Researcher ID AAZ-9047-2021, автор для переписки, Ivan_Shamshin@mail.ru

Екатерина Владимировна Грошева – лаборант лаборатории молекулярно-генетического анализа плодовых растений, <https://orcid.org/0000-0001-6992-2407>, Researcher ID AAA7122-2020.

Марина Витальевна Маслова – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории «Биофотоника», <https://orcid.org/0000-0002-5400-5937>, Researcher ID E-4506-2015

Руфина Мамедхановна Самойлова – учебный мастер кафедры садоводства, биотехнологий и селекции сельскохозяйственных культур.

About the authors:

Ivan N. Shamshin – Cand. Sci. (Biology), Head of the laboratory of the molecular and genetic analysis of fruit plants, <https://orcid.org/0000-0002-4464-1876>, Scopus ID 56708633300, Researcher ID AAZ-9047-2021, Corresponding Author, Ivan_Shamshin@mail.ru

Ekatereina V. Grosheva – Laboratory Assistant of the laboratory of molecular genetic analysis of fruit plants, <https://orcid.org/0000-0001-6992-2407>, Researcher ID AAA7122-2020.

Marina V. Maslova – Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher of Biofotonika laboratory, <https://orcid.org/0000-0002-5400-5937>, Researcher ID E-4506-2015

Rufima M. Samoilova – Educational Master of the Department of horticulture, biotechnology and crop selection

• Литература / References

- Litvinov S.S. [Phytopathological problems in modern vegetable production]. *Plant protection and quarantine*. 2015; 4. (in Russ.)
- Seitbatalova A.I., Sadanov A.K., Shemshura O.N., Kaptagai R.Zh., Ismailova E.T. [The influence of pre-treatment of seeds with isopropyl alcohol on the resistance of tomatoes to mushroom diseases in the field]. *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan series biology and medicine*. 2017;5(233):222-227. (in Russ.)
- Polyxenova V.D. [Induced resistance of plants to pathogens and abiotic stress factors: on the example of tomato]. *Bulletin of the Belarusian State University*. 2009;(1):48-60. (in Russ.)
- Iida Y., van 't Hof P., Beenen H., Mesarich C., Kubota M., Stergiopoulos I., de Wit P. J. Novel mutations detected in avirulence genes overcoming tomato Cf resistance genes in isolates of a Japanese population of *Cladosporium fulvum*. *PLoS one*. 2015;10(4). DOI 10.1371/journal.pone.0123271
- Thomas C.M., Jones D.A., Parniske M., Harrison K., Balint-Kurti P., Hatzixanthis K., Jones J.D. Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in Cf-4 and Cf-9. *The Plant Cell*. 1997;9(12):2209-2224. DOI 10.1105/tpc.9.12.2209.
- Chai X., Xu X., Wang D., Xue D., Li J. Mapping and candidate gene screening of *Cladosporium fulvum* resistance gene Cf-12 in tomato (*Solanum lycopersicum*) by high-throughput sequencing. *Plant Breeding* 2020;139(5):977-987. DOI 10.1111/pbr.12852
- Zhang D., Bao Y., Sun Y., Yang H., Zhao T., Li H., Xu X. Comparative transcriptome analysis reveals the response mechanism of Cf-16-mediated resistance to *Cladosporium fulvum* infection in tomato. *BMC plant biology*. 2020;20(1):1-16. DOI 10.1186/s12870-020-2245-5
- Liu G., Liu J., Zhang C., You X., Zhao T., Jiang J., Xu X. Physiological and RNA-seq analyses provide insights into the response mechanism of the Cf-10-mediated resistance to *Cladosporium fulvum* infection in tomato. *Plant molecular biology*. 2018;96(4):403-416. DOI 10.1007/s11103-018-0706-0.
- Kruijt M., Brandwagt B.F., De Wit P.J. Rearrangements in the Cf-9 disease resistance gene cluster of wild tomato have resulted in three genes that mediate Avr9 responsiveness. *Genetics*. 2004;168(3):1655-1663. DOI 10.1534/genetics.104.028985.
- 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;6(3):348-357.
- Dixon M.S., Jones D.A., Keddie J.S., Thomas C.M., Harrison K., Jones J.D. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*. 1996;84(3):451-459. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81290-8.
- Xue D.Q., Chen X.L., Zhang H., Chai X.F., Jiang J.B., Xu X.Y., Li J.F. Transcriptome analysis of the Cf-12-mediated resistance response to *Cladosporium fulvum* in tomato. *Frontiers in plant science*. 2017;(7):2012. DOI 10.3389/fpls.2016.02012.
- Zhao T., Liu W., Zhao Z., Yang H., Bao Y., Zhang D., Xu X. Transcriptome profiling reveals the response process of tomato carrying Cf-19 and *Cladosporium fulvum* interaction. *BMC plant biology*. 2019;19(1):1-12. DOI 10.1186/s12870-019-2150-y.
- Jordatilde D.O., de Almeida C.M.A., Malafaia C.B., da Silva M.L.R.B., dos Santos Correia M.T., de Menezes Lima V.L., da Silva, M.V. Identification of races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by molecular markers. *African Journal of Microbiology Research*. 2013;7(20):2324-2331. DOI10.5897/AJMR12.2234.
- Gonzalez-Cendales Y., Catanzariti A.M., Baker B., McGrath D.J., Jones D.A.. Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to Fusarium wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*. 2016;17(3):448-463. DOI10.1111/mpp.12294
- Eroshevskaya A.S., Egorova A.A., Milyukova N.A., Pyrsikov A.S. Molecular-genetic analysis of tomato hybrids F₁ on resistance to fusariosis. *Potatoes and vegetables*. 2021;(5):37-40. (In Russ.)
- Takken F., Rep M. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*. 2010;11(2):309-314.
- Catanzariti A.M., Lim G.T., Jones D.A. The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. *New Phytologist*. 2015;207(1):106-118. DOI 10.1111/nph.13348.
- Gardner R.G. Mountain Spring tomato; NC8276 and NC84173 tomato breeding lines. *HortScience*. 1992;27(11):1233-1234.
- El Mohtar C.A., Atamia H.S., Dagher R.B., Abou-Jawdah Y., Salus M.S., Maxwell D.P. Marker-assisted selection of tomato genotypes with the I-2 gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. *Plant disease*. 2007;91(6):758-762. DOI 10.1094/PDIS-91-6-0758.
- Simsek D., Pinar H., Mutlu N. Development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (FOL) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici* (FORL) resistant tomato lines with the aid of marker assisted selection. *Current Trends in Natural Sciences*. 2018;7(13):281-285.
- Pidigam S., Thuraga V., Munnam S.B., Amarapalli G., Kuraba G., Pandravada S.R., Sudini H.K. Genetic diversity, population structure and validation of SSR markers linked to Sw-5 and I-2 genes in tomato germplasm. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2021;1-16. DOI 10.1007/s12298-021-01037-8.
- Adzhieva V.F., Grushetskaya Z.E., Malyshev S.V., Nekrashevich N.A., Babak O.G., Kilchevsky A.V. [Creation of a complex of DNA markers for tomato genes that determine the content of carotenoids and resistance to diseases and pests]. II International. научн. - практ. conf. "Modern trends in the selection and seed production of vegetable crops. Traditions and perspectives." Moscow, Russia. August 2-4, 2010; p. 47. (in Russ.)
- Yu S.C., Zou Y.M. A co-dominant molecular marker of Fusarium wilt resistance gene I-2 derived from gene sequence in tomato. *Yi Chuan= Hereditas*. 2008;30(7):926-932. DOI 10.3724/sp.j.1005.2008.00926.
- Arens P., Mansilla C., Deinum D., Cavellini L., Moretti A., Rolland S., Vosman B. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and applied genetics*. 2010;120(3):655-664. DOI 10.1007/s00122-009-1183-2.
- Zhao T., Jiang J., Liu G., He S., Zhang H., Chen X., Xu X. Mapping and candidate gene screening of tomato *Cladosporium fulvum*-resistant gene Cf-19, based on high-throughput sequencing technology. *BMC plant biology*. 2016;16(1):1-10. DOI 10.1186/s12870-016-0737-0.
- Nevamea A. Y. M., Xiaa L., Wentinga Z., Nchongboh C. G., Wenhua L., Hasand M. M., Longtinga S. Validation of some disease-resistance molecular markers associated with multiple diseases in tomato for marker-assisted selection program. *Scienceasia*. 2020;46(1):19-29. DOI 10.2306/scienceasia1513-1874.2020.006.
- Shamshin I.N., Maslova M.V., Gryazneva Yu.V. [Analysis of genetic collection of tomato varieties and hybrid forms by resistance to cladosporiosis using DNA markers]. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. 2019;180(3):63-70. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-3-63-70 (in Russ.)