

2. I.Yu. Parnikoza, N.Yu. Miryuta, D.N. Maidanyuk, S.A. Loparev, S.G. Korsun, I.G. Budzanivska, T.P. Shevchenko, V.P. Polischuk, V.A. Kunakh, I.A. Kozeretka. Habitat and leaf cytogenetic characteristics of *Deschampsia antarctica* Desv. in the Maritime Antarctica // Polar Science. – 2007. – V. 1. – P. 121–128
3. M. Nei. Genetic distance between populations // American Naturalist. – 1972. – V. 106. – P. 283–292.
4. M. van de Wouw, P. van Dijk, Ad H.L. Huiskes Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.) // J. Biogeogr. – 2008. – V.35, №2. – P.365-376.
5. K. J. Chwedorzewska, P. T. Bednarek, J. Puchalski. Molecular variations of Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. from King George Island (Antarctica) // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2004. – V. 73. № 1 – P. 23–29.
6. K. J. Chwedorzewska, P. T. Bednarek. Genetic variability in the antarctic hairgrass from Maritime Antarctic and Subantarctic // Pol. J. Ecol. – 2008. – V. 56, № 2. – P. 209–216.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДНК-ТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ *rin*, *nor* И *alc*, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЛЕЖКОСТИ ПЛОДОВ ТОМАТА

**С.В. Малышев, О.Г. Бабак, Н.А. Некрашевич, А.В. Кильчевский**

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

*s.malyshev@igc.bas-net.by*

Одним из современных направлений в селекции тепличных томатов является создание высокотранспортабельных и лёжких гибридов. Получение таких гибридов увеличивает устойчивость зрелых плодов к перезреванию, размягчению, т.е. их способность сохраняться на растении в течение длительного времени (не менее 25 дней), повышает отдачу товарного урожая, увеличивает срок поступления свежих томатов из теплиц, позволяет перевозить тепличную продукцию на дальние расстояния без потери качества.

В селекции по данному направлению большой интерес представляет использование генов *nor* (*non-ripening*), *rin* (*ripening inhibitor*), *Nr* (*never ripe*), *alc* (*alcobaca*), *gr* (*green ripe*) и др., которые в гетерозиготном состоянии значительно улучшают сохранность плодов томата на растении [1]. В настоящее время изучен характер наследования генов *nor*, *rin*, контролирующих задержку созревания плодов томата, и их взаимодействие с генами, определяющими структуру урожая, раннеспелость и лежкость [2]. Мутант *alcobaça* изучен недостаточно и менее использовался в селекции в сравнении с *rin* и *nor*. Он был отобран как ландраса в Португалии и интродуцирован в 1967 в Бразилии, где и были впервые описаны его фенотипические особенности [3].

Целью нашей работы является разработка методов ДНК-типирования генов *nor*, *rin* и *alc*, позволяющих выявлять индивидуальные аллели на ранних стадиях развития растения.

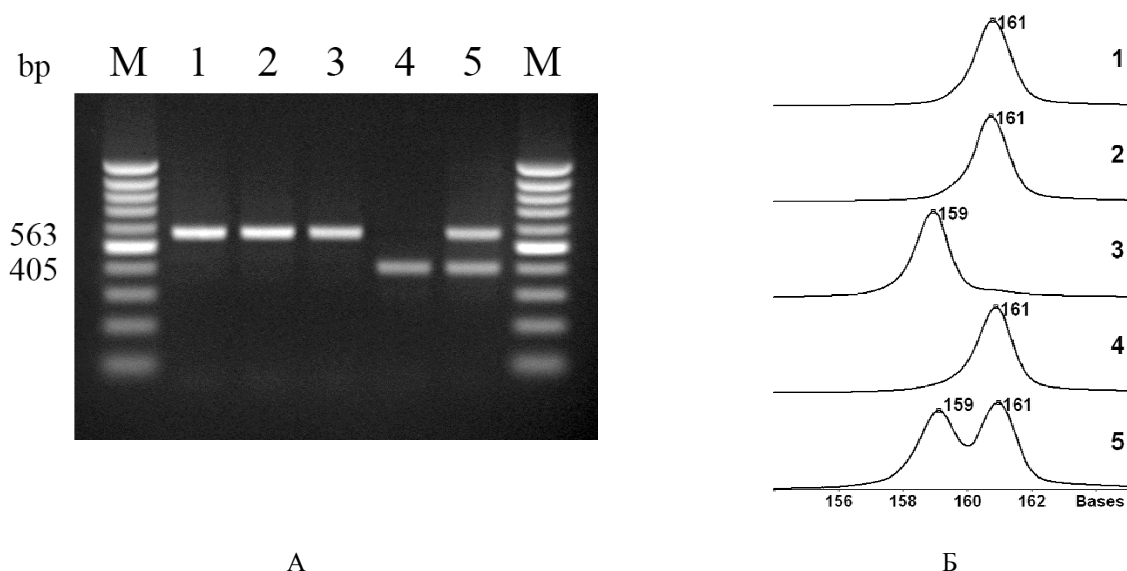
Семена томатных линий, гомозиготных по *rin* (Мо-577), *nor* (Мо-948) and *alc* (Мо-950) мутациям были получены из ВНИИССОК, Россия. Тотальную геномную ДНК экстрагировали с использованием Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). Дизайн праймеров проводили с использованием программы Primer 3 (v. 0.4.0). PCR амплификацию выполняли на амплификаторе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Продукты ПЦР анализировались в 1.5% агарозном геле или в 6% полиакриламидном геле с использованием ALFexpress II секвенатора.

Для прямого секвенирования продукты PCR разделяли и вырезали из 1.0 % агарозного геля, и затем очищали с использованием (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences). Реакцию секвенирования проводили в соответствии с Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Продукты секвенирования очищали на колонках Centri-Sep™ (Applied Biosystems), высушивали, растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до 95 °С в течении 2 мин, и затем проводили электрофорез на секвенаторе ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Для разработки аллелеспецифических маркеров к гену *rin* была использована геномная последовательность AX074057 (GeneBank) длиной 13830 п.н. Данная последовательность

содержит два гена *LeMADS-RIN* и *LeMADS-MC*, а также межгенный участок длиной 2600 п.н. Ген *LeMADS-RIN* состоит из 8 экзонов и занимает участок с 1 по 5694 п.н. Известно также, что у мутантной аллели делетирован участок длиной 1,7 п.н., который начинается в середине седьмого интрона гена *LeMADS-RIN* и заканчивается в середине межгенного участка.

Для амплификации нормальной аллели выбран участок с середины 7 экзона до конца 8 экзона длиной 563 п.н (рис. 1А). У мутантной аллели часть этого участка делетирована, следовательно, амплификации быть не должно. Для амплификации мутантной аллели выбран участок с середины 7 экзона до второй половины межгенного участка длиной 2465 п.н. Фрагмент длиной 2,4 п.н. не синтезируется при обычных условиях PCR, тогда как у мутантной аллели амплифицируется укороченный участок длиной 405 п.н (рис. 1А).

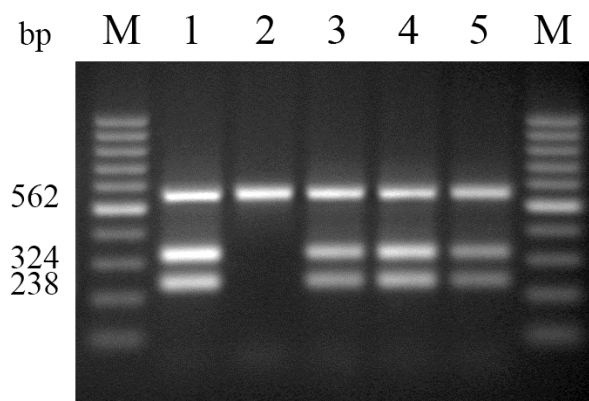


**Рис. 1. А.** STS маркеры для идентификации *rin* гена. **Б.** STS маркер для идентификации *nor* гена (М - GeneRuler 100-bp DNA ladder, 1 – нормальное растение, 2 - Мо-950 (*alc*), 3 - Мо-948 (*nor*), 4 - Мо-577 (*rin*), 5 - F<sub>1</sub> *rin*/+ (А) или *nor*/+ (Б) гибрид).

Для разработки аллелеспецифических маркеров к гену *nor* была использована геномная последовательность AY573803 (GeneBank) длиной 2885 п.н. Данная последовательность содержит ген *LeNAC-NOR*. Транскрибируемая часть *LeNAC-NOR* гена состоит из 3 экзонов.. Известно также, что у мутантной аллели делетирован участок длиной 2 п.н. с 2209 по 2010 п.н., приводящий к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белка.

Для амплификации данного гена выбран участок, содержащий первую половину экзона 3, в котором расположена делеция. При использовании пары праймеров NorF/NorR амплифицируются фрагменты длиной 161 п.н. (норма) и 159 п.н. (мутант) (рис. 2Б).

По поводу наследования мутанта *alcobaça* существуют некоторые противоречия в литературе. Mustchler описала его как рецессивный ген (*alc*) на хромосоме 10, неаллельный гену *nor*, и расположенный на дистанции 17 сМ от последнего [4]. В противоположность Lobo с соавт. описали его как другой аллель в локусе *nor*,



**Рис. 2.** CAPS маркер для идентификации *alc* гена (М - GeneRuler 100-bp DNA ladder, 1 – нормальное растение, 2 - Мо-950 (*alc*), 3 - Мо-948 (*nor*), 4 - Мо-577 (*rin*), 5 - F<sub>1</sub> *alc*/+ гибрид).

отличающийся от *nor*<sup>+</sup> и *nor* и обозначили символом *nor*<sup>A</sup> [3].

Приняв за гипотезу, что мутант *alcobaça* является аллельной формой гена *nor*, было решено секвенировать ген *LeNAC-NOR* у селекционной линии, несущей ген *alc*. С целью получения последовательности ДНК гена *LeNAC-NOR* у мутанта *alcobaça* были подобраны три пары праймеров, фланкирующие экзоны данного гена. Они были успешно использованы для амплификации кодирующей части гена *LeNAC-NOR* у линии Мо-950 и полученные фрагменты затем были секвенированы. Была идентифицирована точечная мутация во втором экзоне, приводящая к аминокислотной замене валин-аспарагин. Данная одиночная трансверсия тимин-аденин у мутантной аллели *nor*<sup>A</sup> гена, которая локализуется в 127 нуклеотиде второго экзона последовательности *LeNAC-NOR* гена, приводит к тому, что мутантная аллель не расщепляется рестрикционной эндонуклеазой *Cfr*10I. Это позволило предложить CAPS маркер для идентификации *nor*<sup>A</sup> гена (рис. 2).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что ген *alc* является новой аллельной формой *LeNAC-NOR* гена.

Работа выполняется в рамках задания 4.1.1 ГП "Биотехнология".

1. Е. Андреева, К. Богданов. Томаты с замедленным созреванием. // ВНИИССОК: Семена, №3, 1999, с.26.
2. A. Seroczynska, K. Niemrowicz-Szczytt. Genetic analysis of selected tomato traits in crosses between cultivated lines and the *Nor* mutant // J. Appl. Genet. – 1998. - V.39. - P.259-273.
3. M. Lobo, M.J. Bassett, L.C. Hannah. Inheritance and characterization of the fruit ripening mutation in 'Alcobaca' tomato // J. Amer. Soc. Hort. Sci. - 1984. - V.109. - P.741-745.
3. M.A. Mustchler. Inheritance and linkage of the 'Alcobaca' ripening mutant in tomato // J. Amer. Soc. Hort. Sci. - 1984. - V. 109. - P.500-503.

## ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЖСОРТОВЫХ ГИБРИДОВ F1 ОВОЩНОГО ГОРОХА ПО ГЕТЕРОЗИСУ И СТЕПЕНИ ДОМИНИРОВАНИЯ

О.В. Марченко<sup>1</sup>, И.Б. Саук<sup>2</sup>, В.С. Анохина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> - РУП «Институт овощеводства НАН Беларуси», Минск, Беларусь

<sup>2</sup> - Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь  
*belniio@mail.ru, anokhina@tut.by*

Овощной горох - одна из наиболее распространенных овощных бобовых культур, обладающая высокими пищевыми и вкусовыми достоинствами. Основная ценность зеленого горошка – белок, содержащий 17 аминокислот, из них 7 незаменимых для человеческого организма. В связи с возрастающим спросом этой культуры у населения резко возросла потребность в селекции сортов адаптивных к условиям Беларуси. Помимо того, что семена гороха являются прекрасным высокобелковым концентрированным кормом, высокими кормовыми достоинствами обладают и его зеленая масса. В гороховой соломе содержится до 34 % безазотистых экстрактивных веществ, 6-8 % белка, причем его переваримость в 2-3 раза выше белка соломы хлебных злаков. Ценность культуры гороха не ограничивается его пищевыми и кормовыми достоинствами. Велико и агротехническое значение гороха. Он улучшает структуру почвы, так как клубеньковые бактерии, образующиеся на его корнях, способны фиксировать азот из воздуха и накапливать его в почве и пожнивных остатках [1].

Возделываемые в Республике сорта овощного гороха различного происхождения неустойчивы к неблагоприятным условиям выращивания, что существенно снижает их продуктивность. Поэтому поиск высоко продуктивных генотипов овощного гороха является актуальной задачей.

Основным методом селекции для создания современных высококачественных сортов является гибридизация. Этот метод позволяет более успешно создавать сорта с комплексом селективно-ценных признаков.