



Convention on  
Biological Diversity



# Детекция генетической устойчивости растений к возбудителям болезней

## Detection of plant genetic resistance to pathogens

Olga Babak

Ph.D. (Biol.), Associated  
Professor, Leading  
researcher

Laboratory of Ecological  
Genetics and Biotechnology

Institute of Genetics and Cytology  
National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk, Belarus

14.02.2024

## Преимущества маркер-сопутствующей селекции:

- Позволяет вести отбор материала на ранних этапах онтогенеза по признакам, фенотипическое проявление которых происходит в конце вегетационного периода;
- Повышение эффективности отбора как на стадии подбора родительских форм для гибридизации, так и отбора нового материала в расщепляющихся поколениях;
- Уменьшение количества изучаемого материала;
- Позволяет не проводить оценку материала на инфекционных фонах.

## Advantages of Marker-Assisted Selection (MAS):

- It allows the accurate material selection in the early stages of ontogenesis by the traits that have a phenotypic manifestation at the end of a vegetative period;
- Use of MAS proves to be very effective both in the selection of parental lines for hybridization and the subsequent analysis of hybrid populations;
- Reduced amount of material under study;
- Allows to avoid assessing material against infectious backgrounds.



– 93-94 % (1/16) selection  
by two traits

→

– 98 % (1/64)  
by three traits



Fig. Selection of pepper plants with favourable alleles at the initial growth stage in F<sub>2</sub> population

# Уровни формирования устойчивости к болезням

## Levels of disease resistance development

- Общие механизмы устойчивости к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды
- General mechanisms of resistance to abiotic and biotic environmental factors



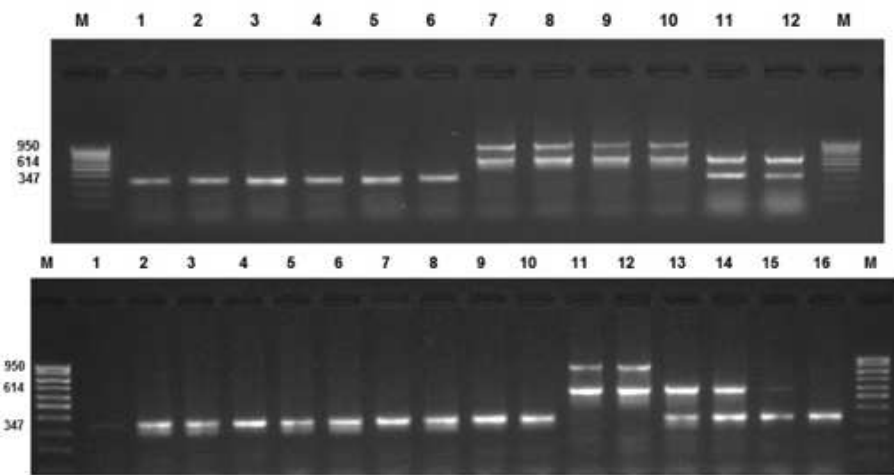
- Генетическая устойчивость к конкретным патогенам
- Genetic resistance to specific pathogens

Разработка методов ПЦР-анализа  
генов, модифицирующих накопление  
антоцианов у культур семейства  
*Solanaceae*

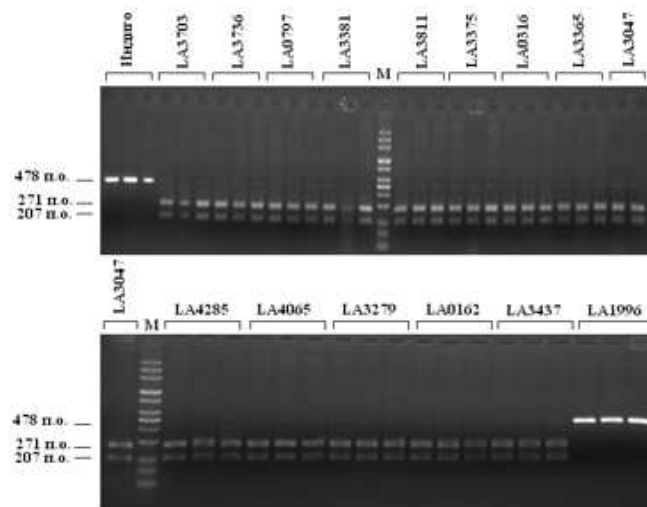
Development of methods for the PCR  
analysis of genes modifying the  
anthocyanin pigments  
accumulation in *Solanaceae* crops

# Approbation of DNA markers to *SIMYB12* and *Ant1* genes determining the accumulation of flavonoids in tomato fruits

Markers to the *Anthocyanin1* gene, which regulates the accumulation of anthocyanins (Levin et al., 2008), and to the *SIMYB12* gene, which determines the accumulation of naringenin chalcone in the skin of tomato fruits, have been successfully tested (Kim et al., 2015).



DNA amplification results of tomato forms with functional PCR markers A-MYB12-603del-aF1/R6 and B-MYB12-603del-aF1/aR5 to *SIMYB12* gene (*Y* and *y*) alleles.



DNA amplification results of tomato forms with *ANT1F/ANT1R* primers and subsequent restriction with the *NcoI* enzyme



Malinovskyi koktel variety with *ant1* and *y* alleles



Indigo tomato variety with *Ant1* and *Y* alleles

## Comparative genomics in the development of methods for PCR gene analysis

Comparative analysis of gene sequences is an initial stage in the development of an effective SCAR -marker for the PCR identification of alleles and screening of breeding plant material for favorable alleles.





## Регуляторные гены, модифицирующие качественный и количественный состав ПИГМЕНТОВ

### Regulatory genes modifying the qualitative and quantitative composition of pigments

Gene, alleles	Phenotypic features of genes that control the accumulation of pigments in fruits	
<i>Ant1/ant1</i>	<i>Anthocyanin1</i>	R2R3MYB TF gene. High/low anthocyanin accumulation in the skin of fruits.
<i>An2aft /Myb75</i>	<i>Anthocyanin2</i>	R2R3MYB TF gene. High/low anthocyanin accumulation in different parts of a plant.
<i>SlMybATV</i> <i>Atv/atv</i>	<i>Atroviolacea</i>	R3MYB TF gene. High/low anthocyanin accumulation in different parts of a plant

Resequencing of *Ant1*, *An2* and *Atv* MYB TF genes was performed on the collection of *S. lycopersicum* accessions and related wild tomato species with different anthocyanins' accumulation in fruits.

New molecular markers for the DNA typing of  
*Ant1* (SCAR Ant1.1-FAM),  
*An2* (SCAR An2-AFT (OM), SCAR An2-4F/R),  
*Atv* (SCAR Atv2)

# ORTHOLOGOUS ANTHOCYANIN 1 GENE IN SOLANACEAE CROPS



A search for orthologs to the allele *Ant1* (EF433416) in the [GenBank](#) database revealed the following, closest by the nucleotide composition, sequences:

mRNA XM\_016689227 – Myb113-like TF (Myb113-like1) in *C. [annuum](#)*

mRNA NM\_001324618 – Myb113-like TF (Myb113-like2) in *C. [annuum](#)*;

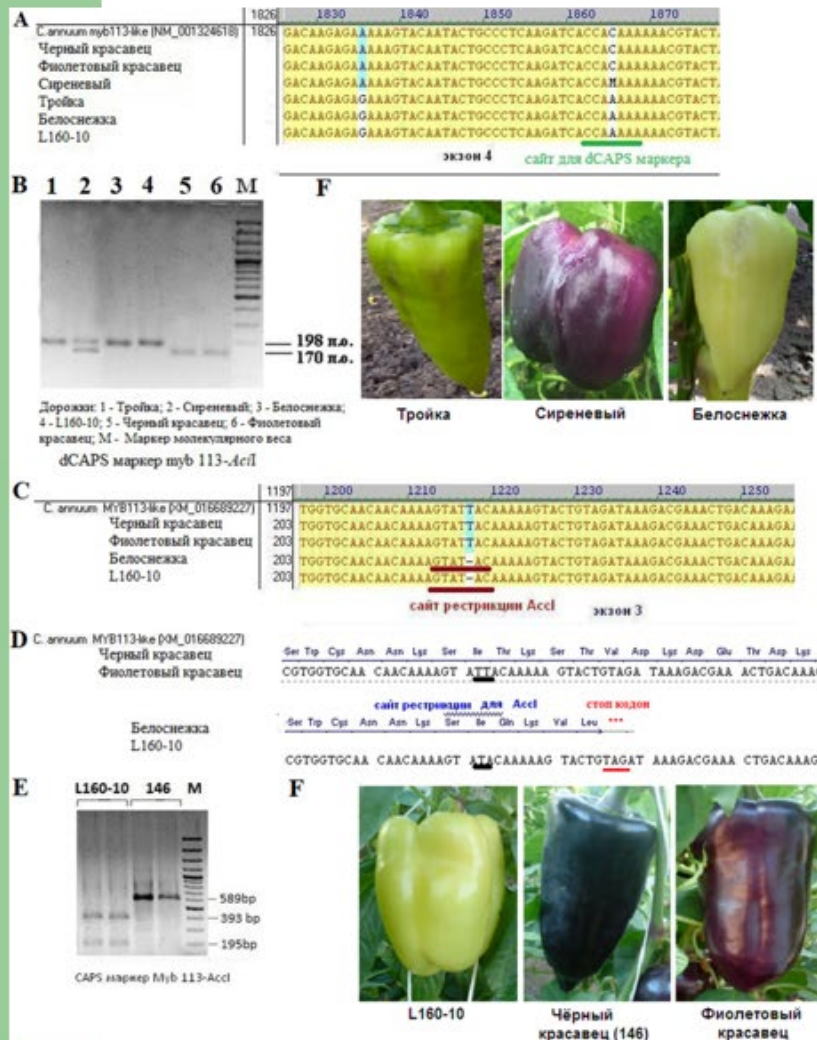
mRNA KT259043 Myb1-like TF in *S. [melongena](#)*.

Nucleotide <a href="#">sequence</a> ( <a href="#">accession number</a> )	Query cover	Percent identify
Capsicum annuum Myb113-like transcription factor (mRNA) (XM_016689227)	65%	82,44%
Capsicum annuum Myb113-like transcription factor (mRNA) (NM_001324618)	56%	85,63%

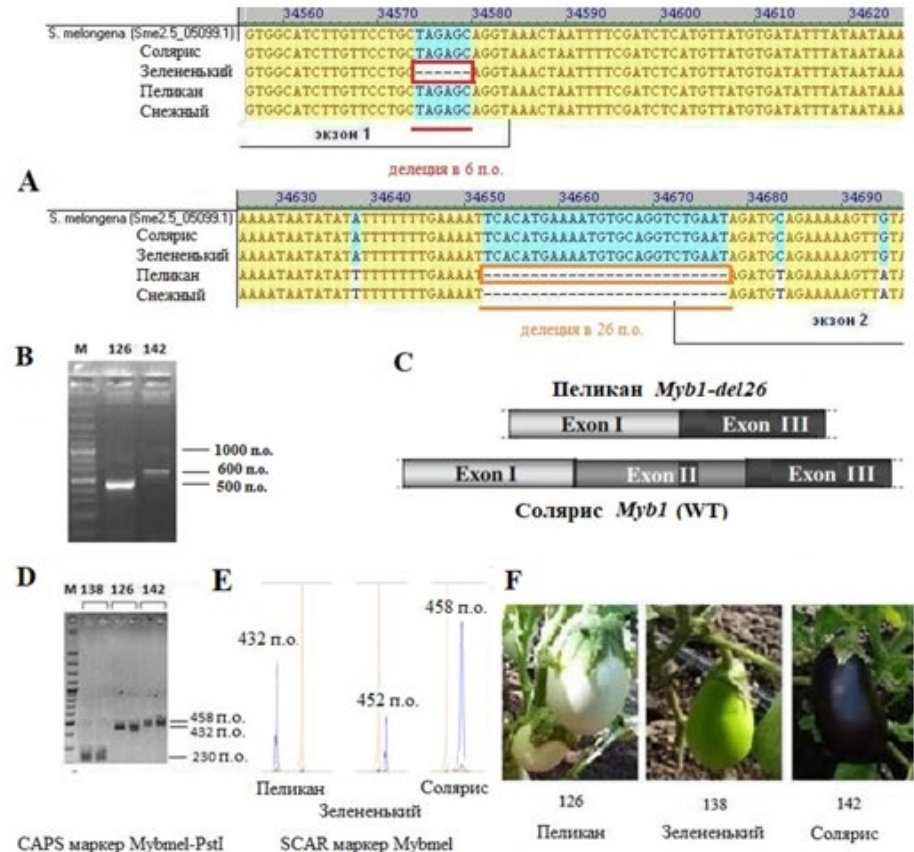
Nucleotide <a href="#">sequence</a> ( <a href="#">accession number</a> )	Query cover	Percent identity
<i>Solanum melongena</i> Myb1 (mRNA) (KF727476)	92%	82,14%
<i>Solanum melongena</i> Myb1 (mRNA) (KT259043)	91%	81,96%
<i>Solanum melongena</i> Myb1 (DNA) (KT727965)	91%	79,72%



# Development of methods for the molecular marking of R2R3MYB TF alleles in pepper and eggplant



Study of the *Myb113-like* polymorphism of genes in *C. Annum* and their phenotypic manifestation.



Study of the *Myb1* gene polymorphism in *S. melongena* and its phenotypic manifestation.

CAPS markers for pepper genes: *Myb113-like1*<sup>T/delT</sup>, *Myb113-like2*<sup>C/A</sup>; SCAR marker *Myb113-like1 prom700/848*  
 CAPS marker for eggplant *Myb1* gene *MybMel-PstI*, SCAR marker *Myb1Mel*

# Phenotypic manifestation of identified polymorphisms in *S. melongena* fruits



*Solaris* (*Myb1*)



*Zelenenkij*  
(*Myb1-del6*)



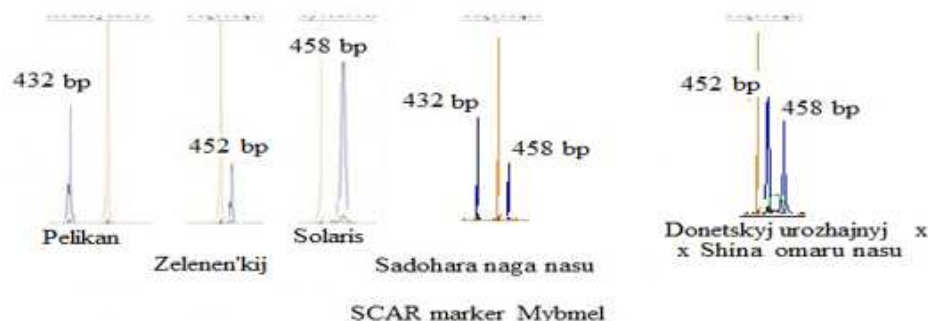
*Jokuwose t. s.nasu* (*Myb1-Snezhnyi del6*)  
(*Myb1-del26*)



*Noire hative*  
(*Myb1*)



*Sadohara naga nasu*  
(*Myb1-del26/ Myb1*)



DNA identification of *Myb1-del6* (452 bp), *Myb1-del26* (432 bp), and *Myb1* (458 bp) alleles on the genetic analyzer using the SCAR marker to the collection eggplant accessions.

Identification of DNA Markers of Anthocyanin Biosynthesis Disorders Based on the Polymorphism of *Anthocyanin 1* Tomato Orthologs Genes in Pepper and Eggplant. / Babak O., Nikitinskaya T., Nekrashevich N., Yatsevich K., Kilchevsky A. *Crop Breed Genet Genom.* 2020; 2(3):e200011. <https://doi.org/10.20900/cbgg20200011>

## Поиск генов-ортологов у капустных культур

## Search for orthologous genes in cabbage crops

Выполнен поиск и сравнительный Blast анализ нуклеотидных последовательностей 8 генов Myb-факторов семейства *Solanaceae* (роды *Solanum* и *Capsicum*) и генов Myb-факторов семейства *Brassicaceae* (роды *Brassica* и *Raphanus*). Выявлена наиболее близкая по нуклеотидной структуре к ранее изученным генам у пасленовых последовательность, кодирующая MYB114 ТФ капустных культур.

A search and comparative Blast analysis of the nucleotide sequences of 8 Myb-factor genes of the *Solanaceae* family (genus *Solanum* and *Capsicum*) and Myb-factor genes of the *Brassicaceae* family (*Brassica* and *Raphanus* genera) were performed. The sequence encoding the MYB114 TF of cabbage crops was identified to be the closest in nucleotide structure to previously studied genes in Solanaceae.

Идентичность генов MYB-транскрипционных факторов представителей семейств *Solanaceae* и *MYB114 Brassicaceae* по результатам BLAST анализа

Ген <i>Myb114</i> [ <i>Brassica oleracea</i> (wild cabbage)] – GenBank: XM_013771565		
Описание видовой принадлежности гена	Область перекрытия	Идентичность
1	2	3
<i>Solanum melongena</i> Myb1 mRNA, complete cds	29%	77.66%
<i>Solanum melongena</i> cultivar Zi Chang anthocyanin R2R3-MYB transcription factor (MYB2) mRNA, complete cds	29%	77.32%
PREDICTED: <i>Capsicum annuum</i> transcription factor MYB113-like (LOC107844901), mRNA; <i>Myb113-like 1</i>	31%	75.57%
<i>Capsicum annuum</i> transcription factor MYB113-like (LOC107844888), mRNA; <i>Myb113-like 2</i>	30%	75.00%
<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Ailsa Craig anthocyanin 1 (ANT1) mRNA, complete cds	30%	81.35%
<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Purple Smudge MYB transcription factor AN2 (An2) gene, partial cds	19%	75.59%

# Myb114 gene polymorphism



Рис. Фенотипическое проявление антоциановой окраски у разновидностей капусты огородной.

Study of the *Myb114* Gene Polymorphism in the Cole Crops (*Brassica oleracea* L.) in Connection with the Anthocyanin Biosynthesis Regulation Based on the Comparison with the MYB Factors of Vegetable Nightshades (*Solanaceae*) / D.A. Fateev, A.M. Artemyeva, O.G. Babak, A.V. Kilchevsky et. al./ / Russian Journal of Genetics, 2023, Vol. 59, No. 1, pp. 30–39.

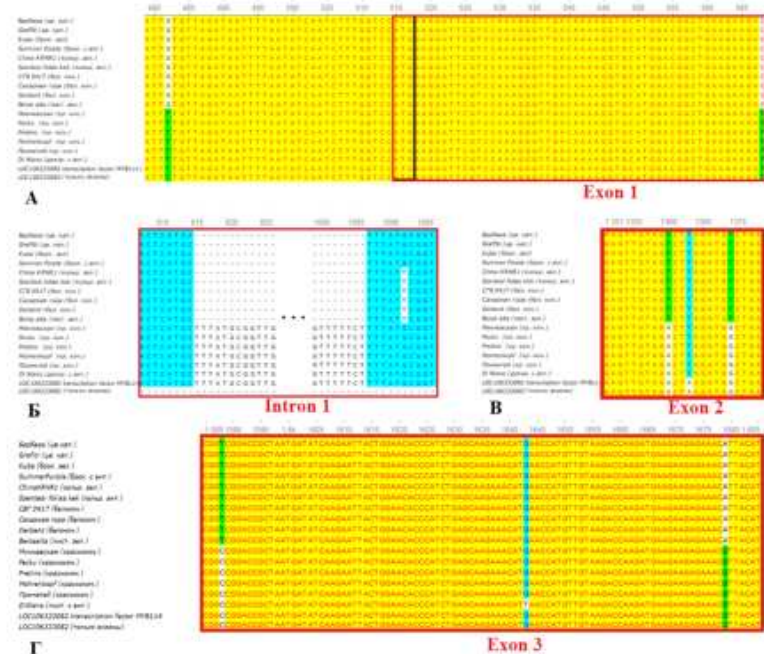


Рис. Полиморфизм аллелей гена *Myb114* *B. oleracea* у форм с различным накоплением антоцианов: А – в первом экзоне, Б – в первом интроне, В – во втором экзоне, Г – в третьем экзоне.

Разработан новый молекулярный маркер MYB114.2 и Протокол ДНК-типирования аллелей гена *Myb 114*, который может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов.

Апробация и применение  
методов ДНК-маркирования  
устойчивости к патогенам

Testing and application of DNA  
marking methods for resistance to  
pathogens

# Литературные источники молекулярных маркеров

## Literary sources of molecular markers

- Panthee D.R. et al. A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato/ D.R. Panthee, M.R. Foolad // Euphytica – 2012. – Vol. 184 – P.165–179
- Je Min Lee, Chang-Sik Oh, and Inhwa Yeam Molecular Markers for Selecting Diverse Dis-ease Resistances in Tomato Breeding Programs // Plant Breed. Biotech. – 2015. – Vol. 3(4). – P. 308-322
- Ahmed H. El-Sappah, Islam M. M., *et.al.* Tomato Natural Resistance Genes in Controlling the Root-Knot Nematode Genes 2019, 10, 925; doi:10.3390/genes10110925  
[www.mdpi.com/journal/genes](http://www.mdpi.com/journal/genes)
- Djian-Caporalino C. et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome / C. Djian-Caporalino, A. Fazari, M.J. Arguel, T. Vernie, C. Vandecasteele, I. Faure, G. Brunoud, L. Pijarowski, A. Palloix, V. Lefebvre, P. Abad // Theor. Appl. Genet. – 2007. – V. 114. – P. 473–486
- Kang W. et al. Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.) / N. Hoang, H. Yang, J. Kwon, S. Jo, J. Seo, K. Kim, D. Choi, B. Kang // Theor. Appl. Genet. – 2010. – V. 120. – P. 1587–1596. – DOI 10.1007/s00122-010-1278-9

# Контрольные образцы

## Control accessions

- Дикие родственные виды, из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова

Wild related species from the collection of the N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR)

- Образцы Калифорнийского Центра генетических ресурсов томата (США)

Accessions from the collection of C.M. Rick Tomato Genetics Resource Center (California, USA)

## ДНК-типирование 22 аллелей устойчивости к болезням томата:

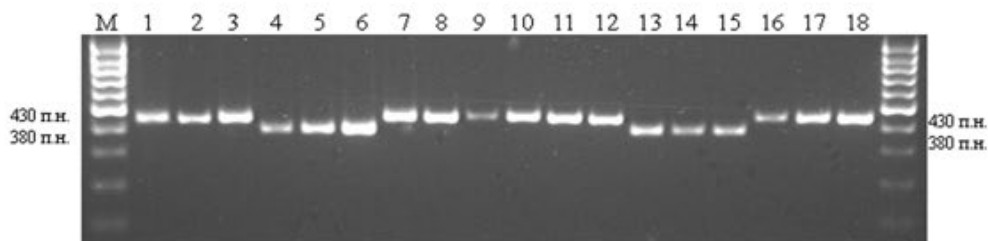
мелойдогинозу *Mi 1.2, Mi 9*;  
фузариозу *I-2, I-2C, I-3, I-7*;  
кладоспориозу *Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9, 9 DC*;  
фитофторе *Ph-2, Ph-3*;  
вертициллезу *Ve*;  
вирусу мозаики томата *Tm1, Tm2* и *Tm2<sup>2</sup>*;  
вирусу бронзовости *Sw-5b*;  
вирусу желтой пятнистости томата (TYLCD) *Ty-2, Ty-3*;  
Бактериальной пятнистости *Rx4*;  
Бактериальной крапчатости *Pto*;

## DNA-typing of tomato samples using the following known in the literature markers of disease resistance alleles:

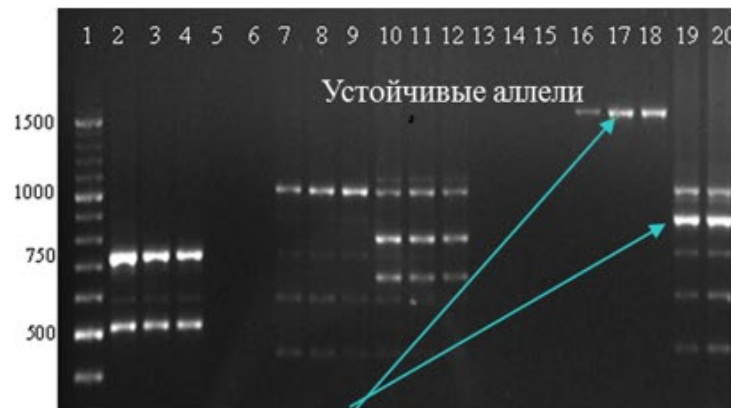
*Mi-1.2, Mi-9* – meloidoginosis, caused by *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*,  
*I-2, C, I-2C, I-3, I-7* – fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*,  
*Cf2, Cf4, Cf5, Cf9, 9DC* – cladosporiosis, leaf mold caused by *Cladosporium fulvum* Cke,  
*Ve* – verticillium wilt caused by *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium daltliae*,  
*Ph2, Ph3* – late blight caused by *Phytophthora infestans*,  
*Rx4* – bacterial spot (BS) of tomato, caused by *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, and *X.perforans*  
*Pto* – bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae*,  
*Sw-5b* – spotted wilt caused by *Tomato spotted wilt virus* (TSWV),  
*Tm-1, Tm-2/Tm-2<sup>2</sup>* – tomato mosaic caused by *Tomato mosaic virus* (ToMV),  
*Ty2, Ty3* – yellow curl leaf caused by *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).



# DNA-typing of tomato samples using the markers Mi1.2 and 2/5Cf



Продукты амплификации ДНК сортов и линий томата с функциональным SCAR маркером к гену *Mi 1.2*, контролирующему устойчивость к 3-м видам корневой нематоды, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, и *M. arenaria*. 1, 2, 3 – Апшерон, 4, 5, 6 –ТХ-144, 7, 8, 9 –170-ТХ-1, 10, 11, 12 –54-ТХ-4, 13, 14, 15 – 140-ТХ, 16, 17, 18 – 247-ТХ.



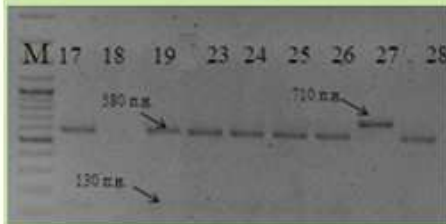
Продукты амплификации ДНК генотипов томата с праймерами к генам *cf 2* и *cf 5* устойчивости к кладоспориозу: 1 – маркер молекулярного веса, 2-4- *L. pimpinellifolium*, 5-6- Перфектпил, 7-9 – Топкани, 10-12 Медина, 13-15- Радикал, 16-18 – сорт-стандарт с геном *Cf 2*, 19-20- сорт-стандарт с геном *Cf 5*.



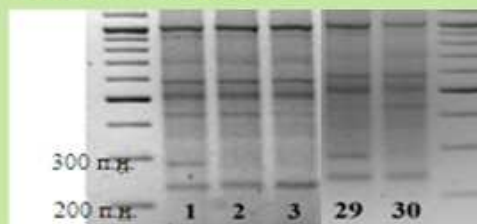
## ДНК-типирование генов устойчивости у перца: DNA-typing of pepper R-genes

- к корневым нематодам (*Meloidogyne* spp.: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*) - *Me1*;
- к корневым гнилям, вызываемым *Phytophthora capsici* - *Ph.caps.root* ;
- к фитофторе плодов (*Phytophthora capsici*);
- к антракнозу (*Colletotrichum acutatum*);
- к Y вирусу картофеля - *pvr1* и мучнистой росе (*L. taurica*) – *pm*;
- к вирусу мозаики огурца (CMV - *Cucumber mosaic virus*) - *Cmr1*;
- к вирусу пятнистого увядания (*Tospovirus*, *Tomato spotted wilt virus*, TSWV) – *Tsw*;
- к вирусу легкой крапчатости перца (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) - *L4*;
- к вирусу крапчатости сосудов чили (*Cvr1*)
- к бактериальной пятнистости - *Bs3*

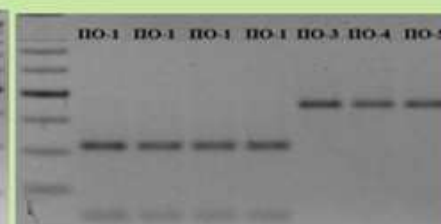
\* к гену *pvr1* устойчивости к Y вирусу картофеля и гену *pm* устойчивости к мучнистой росе (710 п.н. – R-аллель)



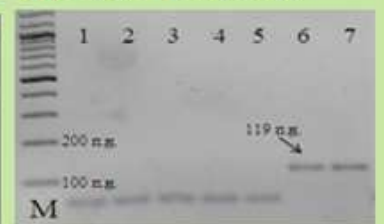
\* к гену *Tsw* устойчивости к вирусу пятнистого увядания томата (300 п.н. – R-аллель)



\* к гену *Cmr1* устойчивости к вирусу огуречной мозаики (320/176 п.н. – R-аллель)

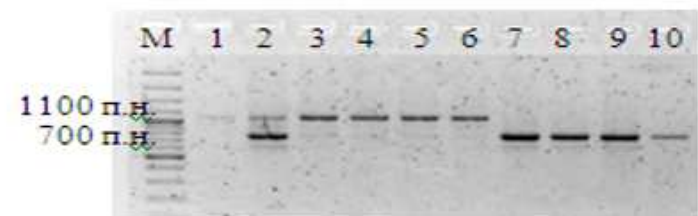


\* к гену *Me1* устойчивости к галловой нематоде (119 п.н. – R-аллель)



\* к гену (*Pun1*) капсаиин-синтазы, определяющему остроту плодов.

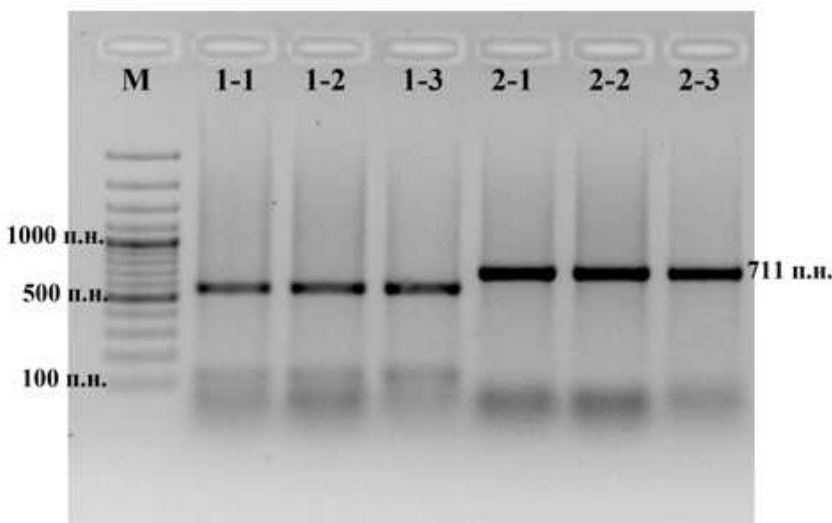
Маркер позволяет разделять острые и сладкие формы перца



1-2 – Созвездие (*C. frutescens*), 3-4 – Огненная дева (*C. chinense*); 5-6 – Халапеньо (*C. annuum*); 7-8 – Л-160-10 (*C. annuum*); 9-10 – Преголь (*C. annuum*);

# ДНК-маркеры к генам перца, определяющим устойчивость к Y вирусу картофеля (ген *pvr1*) и мучнистой росе (ген *pt*)

## DNA-typing of pepper samples using the *pvr1* marker



Идентификация генов *Pvr1* и *pt*.

Продукт 711 п.н. – устойчивость к Y вирусу картофеля, 530 п.н. – устойчивость к мучнистой росе (гриб *Leveillula taurica*)



Растение перца, пораженное мучнистой росой



Растение перца, пораженное Y вирусом картофеля

У устойчивых к Y вирусу картофеля форм перца фрагмент амплификации размером 711 п.н. не режется и остается неизменным (аллель R).

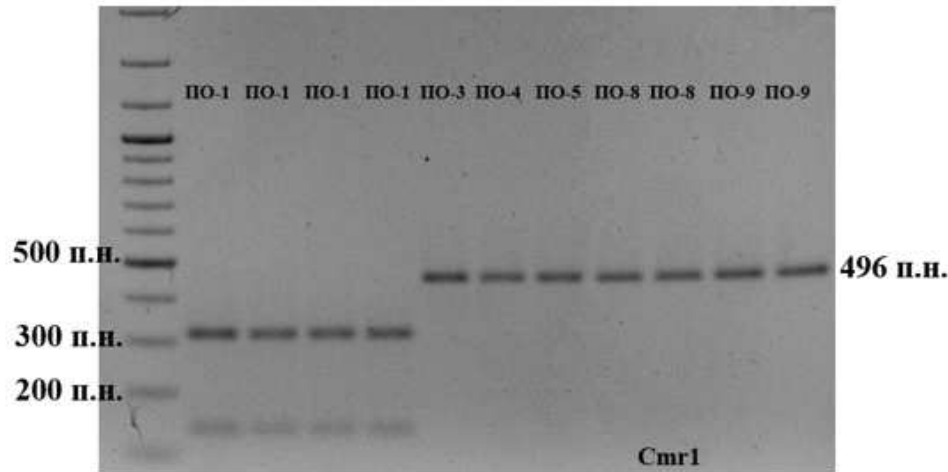
У устойчивых к мучнистой росе форм фрагмент амплификации режется ферментом *BseMI* на два фрагмента размером  $\approx 130$  п.н. и  $\approx 580$  п.н. (аллель S).

Гетерозиготные по данному признаку образцы перца устойчивы и к мучнистой росе и к Y вирусу картофеля.

В изучаемой коллекции перца сладкого устойчивым к Y вирусу картофеля оказался только 1 сорт перца – *ZongKao*. Все остальные образцы были устойчивыми к мучнистой росе.

# ДНК-маркер к гену перца, определяющим устойчивость к вирусу огуречной мозаики (ген *Cmr1*)

## DNA-typing of pepper samples using the *Cmr1* marker



Продукты амплификации ДНК сортов перца с CAPS маркером к гену *Cmr1*, контролирующему устойчивость к вирусу огуречной мозаики (продукт 320 п.н.)

В изучаемой коллекции R-аллель гена *Cmr1* был выявлен только у одной формы перца Огненная дева вида *Capsicum chinense*.

Устойчивые формы перца содержат сайт рестрикции, узнаваемый ферментом *HinfI*. В результате его применения исходный продукт амплификации режется на два фрагмента размером 320 п.н. и 176 п.н. (аллель R). У неустойчивых форм продукт амплификации 496 п.н. остается целым (аллель S).



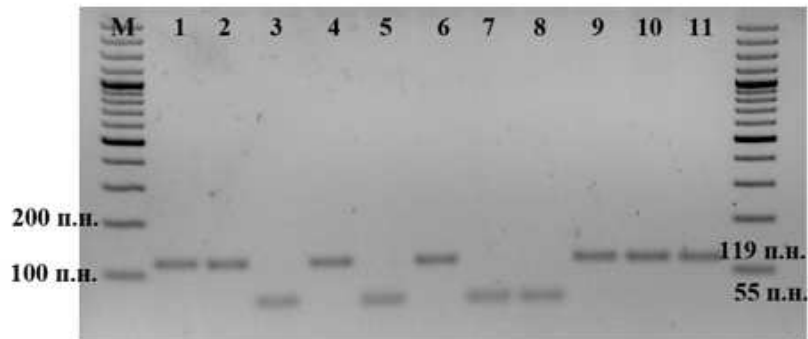
Растение перца, пораженное вирусом огуречной мозаики



Плоды перца пораженные вирусом огуречной мозаики

# ДНК-маркер к гену перца, определяющий устойчивость к галловой нематодe (ген Me1)

## DNA-typing of pepper samples using the CAPS marker Me1\_MaeII



Продукты амплификации ДНК сортов перца с CAPS маркером к гену *Me1*, контролирующему устойчивость к галловой нематодe (119 п.н. продукт) 3-х видов, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, и *M. arenaria*.

**Корни растений перца пораженных галловой нематодой (А) и здоровых (Б)**

У устойчивых к галловой нематодe форм перца продукт размером 119 п.н. остается неизменным (аллель R).

У неустойчивых форм перца в результате рестрикции с ферментом *MaeII* образуются два фрагмента размером 56 п.н. и 58 п.н. (аллель S).

## International projects

Международная программа научных исследований «Изучение генетических ресурсов растений пшеницы, ячменя и овощных культур (морковь, салат и перец) для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства» 2020-2023

«Генотипирование перца EVA – IGC» 2021

PGRFA – Plant Genetic Resources for Food and Agriculture

European PGRFA Evaluation network (EVA)

AGREEMENT «Pepper genotyping EVA – IGC»

Применяя методы MAS, 170 образцов *Capsicum* spp. были оценены на наличие в генотипах 11 маркеров устойчивости к болезням

Using MAS methods, 170 samples of *Capsicum* spp. were assessed for the presence of 11 disease resistance markers in genotypes

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Horticultural Research Institute “Liliana Dimitrova” of the Republic of Cuba

2023-2025 «Изучение генетического полиморфизма генов устойчивости к болезням у форм томата кубинской и белорусской селекции для повышения эффективности селекционных программ».

2023-2025 “Study of genetic polymorphism of disease resistance genes in the tomato forms of Cuban and Belarusian origin to improve the efficiency of breeding programs”

## Marker assisted selection in tomato breeding

Based on the study of the genetics of economically valuable traits of tomato, molecular markers were developed and tested to increase the breeding efficiency:

- 23 SCAR и CAPS markers to identify alleles associated with carotenoids and flavonoids accumulation, as well as fruit colouration (*rin*, *nor*, *nor<sup>A</sup>*, *r*, *at*, *t*, *og*, *og<sup>c</sup>*, *B*, *Del*, *gf-3*, *gf-5*, *hp-1*, *hp-2<sup>dg</sup>*, *u/U*, *Udel-52*, *gs*, *Y/y*, *Ant1/ant1*, *Ant2<sub>Aft</sub>* /*Myb75*, *Atv/atv*);

4- habit formation markers (*Sp/sp*, *d*, *bl*, *ls*);

- 22 pathogen resistance markers (*I-2*, *I-2C*, *I-3*, *I-7*, *Mi-1.2*, *Mi-9*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9*, *9DC*, *Ph-2*, *Ph-3*, *Ve*, *Tm1*, *Tm2*, *Tm2<sup>2</sup>*, *Sw-5*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Rx4*, *Pto*);

-The functional male sterility allele marker (*ps2*);

-Three markers associated with the fruit shape (*Ovate*, *FAS*, *LC*).



“Technology for marker-assisted selection of tomato forms with high biochemical and technological properties of fruits” has been developed to accompany the breeding process.

Using the methods of classical and marker assisted breeding, 50 tomato hybrids and varieties were obtained jointly with the Institute of Vegetable Growing of the National Academy of Sciences of Belarus and the Belarusian State Agricultural Academy and included in the State Register of Varieties and Hybrids of the Republic of Belarus.



# Marker assisted selection in pepper breeding

Molecular markers of economically valuable alleles in pepper have been developed and tested:

- 7 markers to identify alleles associated with carotenoids and flavonoids accumulation, and fruit colouration (*Ccs+*/*Ccs-*, *Cl/cl*, *APRR2-like(A/G)*, *Myb113-like1<sup>T/delT</sup>*, *Myb113-like1 prom*, *Myb113-like2<sup>C/A</sup>*);
- 10 pathogen resistance markers (*Me1*, *Ph.caps.root*, *Ph.caps.*, *pvr1*, *pm*, *Cmr1*, *TSWV*, *PMMoV*, *Bs3*, *L4*);
- A marker of capsaicin accumulation in pepper fruits *Pun1-1*

Using the methods of classical and marker assisted breeding, 15 hybrids and sweet pepper varieties and 3 hot pepper varieties were obtained and included in the State Register of Varieties and Hybrids of the Republic of Belarus (and also one eggplant variety).



Hot pepper varieties:  
Vasilek,  
Dydysh,  
Zakhar.



Hybrid F1 Eggplant  
Siniya  
Ptitsa.



Sweet pepper varieties: Goretski krasny, Chyrvony magnat, Lada, and Kinzhal.



Thank you  
for your attention!

