

УДК 634.75:577.2:632.4

DOI: 10.25684/0513-1634-2024-150-58-62

МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ АНАЛИЗ ГИБРИДНЫХ СЕЯНЦЕВ ЗЕМЛЯНИКИ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ (ГЕН *Rca2*)

Александр Сергеевич Лыжин, Ирина Васильевна Лукьянчук

ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина»

393774, Тамбовская обл., г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30

E-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru

Антракнозная гниль плодов (*Colletotrichum acutatum* sensu lato) – опасное заболевание земляники. Одним из способов борьбы с *Colletotrichum acutatum* sensu lato в насаждениях земляники является возделывание сортов с генетической устойчивостью к патогену. К числу генетических факторов устойчивости земляники к антракнозу относится ген *Rca2*, определяющий устойчивость к изолятам *Colletotrichum acutatum* sensu lato 2-й группы патогенности. С использованием диагностического ДНК-маркера STS-Rca2_240 проведен молекулярный скрининг гибридных форм земляники по гену *Rca2* устойчивости к антракнозной гнили плодов. Идентифицированы перспективные гибриды, характеризующиеся гетерозиготным сочетанием аллелей гена *Rca2*: 2/1-24, 2/1-34 ('Quicky' × 'Olympia'), 3/9-5 ('Florence' × 'Faith'), 3/12-2, 3/12-9 ('Алиса' × 'Quicky'), 4/7-10, 4/7-19, 4/7-20 ('Asia' × 'Aprica'), 5/2-26, 5/2-32 ('San Andreas' × 'Monterey').

Ключевые слова: земляника; селекция; устойчивость; антракноз; молекулярные маркеры

Введение

Антракноз (антракнозная гниль) – опасное заболевание земляники садовой, приводящее к значительным потерям урожая (до 75%) плодоносящих насаждений и гибели растений [1, 2]. При этом выделяют антракнозную гниль плодов (возбудитель – *Colletotrichum acutatum* sensu lato) и антракнозную гниль куста (возбудитель – *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato) [3]. В умеренном климатическом поясе наиболее распространён *C. acutatum* [4]. В Россию *C. acutatum* был завезён из Италии в 2003 г. вместе с бессимптомным посадочным материалом [5] и с 2017 г. относится к числу ограниченно распространённых карантинных патогенов [6].

В настоящее время установлено, что устойчивость к антракнозной гнили плодов у земляники контролируется несколькими локусами: *FaRca1* детерминирует устойчивость к изолятам *C. acutatum* 1-й группы патогенности [2], *Rca2* – к изолятам *C. acutatum* 2-й группы патогенности [7]. Для локуса *FaRca1* разработаны HRM (high-resolution melting) маркеры, основанные на SNP полиморфизме окологенной области [2], для гена *Rca2* – SCAR-маркеры STS-Rca2_240 и STS-Rca2_417 [8]. Таким образом, скрининг устойчивых к *C. acutatum* генотипов земляники возможен на ранних этапах развития растений в рамках технологий маркер-опосредованной селекции.

Целью настоящего исследования являлась идентификация аллельного состояния гена *Rca2* устойчивости к *C. acutatum* 1-й группы патогенности у гибридных сеянцев земляники садовой для выявления перспективных форм.

Объекты и методы исследования

Биологическими объектами исследования являлись гибридные сеянцы земляники, созданные в «ФНЦ им. И.В. Мичурина» с использованием в качестве родительских генотипов сортов, интродуцированных из различных эколого-географических регионов происхождения.

Геномную ДНК земляники выделяли из молодых листьев СТАВ методом, модифицированным для культуры земляники [9].

Для идентификации аллеля резистентности гена *Rca2* использовали маркер STS-Rca2_240 (for 5'-gcc acg tca cta gtc aaa ttc aa-3, rev 5'-tca tgg aca gtg gtc tca gc-3). Целевым продуктом маркера STS-Rca2_240 является ампликон размером 240 п.н., соответствующий аллелю резистентности гена (*Rca2*). Для контроля протекания ПЦР и исключения ложноотрицательных результатов маркер STS-Rca2_240 использовался в мультиплексной реакции с маркером EMFv020, целевой продукт которого синтезируется у всех генотипов земляники [8]. Контролем присутствия в геноме аллеля устойчивости *Rca2* являлся сорт Elianny (Нидерланды) [10].

Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США) по описанной ранее [11] программе.

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием. Оценку размера амплифицированных продуктов проводили с использованием ДНК-маркера Step100 (Биолабмикс, Россия). Визуализацию результатов проводили с использованием системы гель-документации ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

В результате проведённых исследований маркер EMFv020, подтверждающий эффективность протекания ПЦР, выявлен у всех анализируемых генотипов земляники. Маркер STS-Rca2_240, соответствующий аллелю резистентности *Rca2*, идентифицирован у гибридных сеянцев 2/1-24, 2/1-34 ('Quicky' × 'Olympia'), 3/9-5 ('Florence' × 'Faith'), 3/12-2, 3/12-9 ('Алиса' × 'Quicky'), 4/7-10, 4/7-19, 4/7-20 ('Asia' × 'Aprica'), 5/2-26, 5/2-32 ('San Andreas' × 'Monterey'). Пример идентификации представлен на рисунке 1, результаты – в таблице 1.

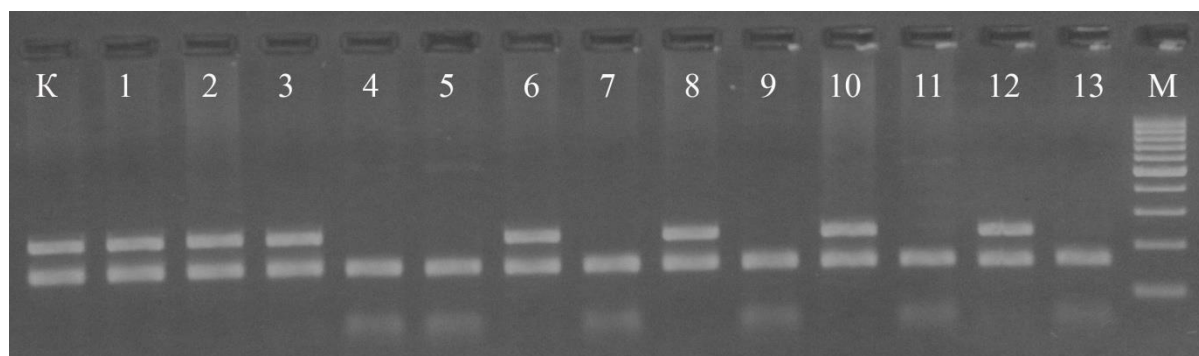


Рис. 1 Электрофоретический профиль маркерных фрагментов гена *Rca2* у гибридных сеянцев земляники садовой

К – контроль (Elianny), 1 – 5/2-32, 2 – 4/7-20, 3 – 5/2-26, 4 – 5/2-23, 5 – 4/7-17, 6 – 4/7-10, 7 – 4/7-8, 8 – 3/12-9, 9 – 4/7-16, 10 – 3/12-2, 11 – 3/9-12, 12 – 3/9-5, 13 – 3/4-7, М – маркер молекулярного веса ДНК

Анализ происхождения гибридных форм с идентифицированным маркером STS-Rca2_240 показал, что предполагаемыми источниками целевого аллеля в комбинациях скрещивания 'Quicky' × 'Olympia' и 'Asia' × 'Aprica' являются использованные в качестве опылителей сорта Olympia и Aprica, а в комбинациях скрещивания 'Florence' × 'Faith' и 'Алиса' × 'Quicky' – материнские сорта Florence и Алиса, так как согласно данным молекулярного скрининга [11, 12] использованные в качестве второй родительской формы сорта Quicky, Faith и Asia характеризуются наличием аллеля *rca2* в гомозиготном состоянии. В комбинации скрещивания 'San Andreas' × 'Monterey' источник аллеля резистентности неизвестен, так как для исходных родительских форм

нет данных молекулярного скрининга на наличие маркера STS-Rca2_240. В связи с вышеизложенным, гибридные сеянцы 2/1-24, 2/1-34 ('Quicky' × 'Olympia'), 3/9-5 ('Florence' × 'Faith'), 3/12-2, 3/12-9 ('Алиса' × 'Quicky'), 4/7-10, 4/7-19, 4/7-20 ('Asia' × 'Aprica') предположительно имеют гетерозиготное сочетание аллелей гена *Rca2*, а формы 5/2-26 и 5/2-32 ('San Andreas' × 'Monterey') могут иметь гомозиготный по аллелю резистентности или гетерозиготный генотип (табл. 1).

Таблица 1

Результаты маркер-опосредованного скрининга гибридных сеянцев земляники садовой по гену устойчивости к антракнозу *Rca2*

Генотип	Комбинация скрещивания	Маркер STS-Rca2_240	Маркер EMFv020
Elianny (контроль)	Нет доступной информации	1	1
2/1-12	'Quicky' × 'Olympia' (NF 638)	0	1
2/1-24		1	1
2/1-25		0	1
2/1-32		0	1
2/1-34		1	1
2/2-32		0	1
2/2-41	'Faith' × 'Tea' (NF 633)	0	1
2/3-12	'Scala' (SG0203) × 'Tea'	0	1
3/4-6	'Malwina' × 'Tea'	0	1
3/4-7		0	1
3/9-5	'Florence' × 'Faith'	1	1
3/9-12		0	1
3/12-2	'Алиса' × 'Quicky'	1	1
3/12-9		1	1
4/7-8	'Asia' (NF 421) × 'Aprica'	0	1
4/7-10		1	1
4/7-16		0	1
4/7-17		0	1
4/7-19		1	1
4/7-20		1	1
5/2-23	'San Andreas' × 'Monterey'	0	1
5/2-26		1	1
5/2-32		1	1

Кроме того, полученные данные позволили уточнить аллельное состояние гена *Rca2* у некоторых родительских форм: в комбинациях скрещивания 'Quicky' × 'Olympia', 'Florence' × 'Faith' и 'Asia' × 'Aprica' выделены гибридные формы как с аллелем резистентности (2/1-24, 2/1-34, 3/9-5, 4/7-10, 4/7-19, 4/7-20), так и без него (2/1-12, 2/1-25, 2/1-32, 3/9-12, 4/7-8, 4/7-16, 4/7-17), что возможно только в случае если комбинации скрещивания имеют вид Аа × аа. Следовательно, сорта Olympia, Florence и Aprica характеризуются гетерозиготным сочетанием аллелей гена *Rca2*.

Маркер-опосредованная селекция садовой земляники на устойчивость к патогенам ведётся также другими исследователями: в частности, М. Sturzeanu с соавторами в комбинации скрещивания 'Benton' × 'Cambridge Favourite' идентифицированы перспективные гибридные сеянцы, совмещающие в геноме аллели резистентности двух генов – *Rca2* (устойчивость к антракнозу) и *Rpf1* (устойчивость к фитофторозу) [13]. Перспективным направлением селекции является также создание форм, характеризующихся гомозиготным состоянием целевых аллелей, так как их использование в дальнейшей гибридизации позволит получить 100% сеянцев с генами устойчивости. В «ФНЦ им. И.В. Мичурина» в рамках реализации данных направлений

проведен подбор и гибридизация исходных родительских форм, получены гибридные семена, в дальнейшем планируется скрининг гибридных семян по сцепленным с целевыми аллелями резистентности ДНК-маркерам.

Выводы

С использованием диагностического ДНК-маркера STS-Rca2 240 проведён скрининг гибридных форм земляники садовой на наличие гена *Rca2* устойчивости к антракнозной чёрной гнили. Уточнена генотипическая структура исходных родительских форм по гену *Rca2*: сорта Olympia, Florence и Aprica имеют гетерозиготный генотип. Идентифицированы перспективные сеянцы, характеризующиеся гетерозиготным сочетанием аллелей гена *Rca2*: 2/1-24, 2/1-34 ('Quicky' × 'Olympia'), 3/9-5 ('Florence' × 'Faith'), 3/12-2, 3/12-9 ('Алиса' × 'Quicky'), 4/7-10, 4/7-19, 4/7-20 ('Asia' × 'Aprica'), 5/2-26, 5/2-32 ('San Andreas' × 'Monterey').

Список литературы

1. Кузнецова А.А., Дудченко И.П., Копина М.Б. Антракноз земляники, классические и современные методы диагностики // Современные подходы и методы в защите растений. – 2018. – С. 70-73.
2. Лыжин, А.С., Лукьянчук И.В., Жбанова Е.В. Полиморфизм сортов земляники (*Fragaria* × *ananassa*) по гену устойчивости к антракнозу *Rca2* // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 2019. – Т. 180, № 1. – С. 73-77. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77.
3. Лыжин А.С., Лукьянчук И.В. Молекулярный скрининг маркера гена устойчивости к антракнозной чёрной гнили (ген *Rca2*) генетической коллекции земляники // Дальневосточный аграрный вестник. – 2022. – Т. 16, № 3. – С. 12-19. DOI: 10.22450/199996837_2022_3_12
4. Лыжин А.С., Лукьянчук И.В. Анализ сортов земляники садовой по устойчивости к антракнозу с использованием диагностических ДНК-маркеров // Аграрная Россия. – 2022. – № 9. – С. 16-20. DOI: 10.30906/1999-5636-2022-9-16-20
5. Холод Н.А., Кащиц Ю.П., Добренков Е.А., Семёнова Л.Г. Оценка устойчивости сортов земляники садовой к антракнозной черной гнили в южном регионе // Плодоводство и виноградарство юга России. – 2018. – № 51(3). – С. 140-148. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-140-148.
6. Ahmed M.F.A., El-Fiki I.A.I. Effect of biological control of root rot diseases of strawberry using *Trichoderma* spp. // Middle East Journal of Applied Sciences. – 2017. – Vol. 7(3). – P. 482-492.
7. Lerceteau-Kohler E., Roudeillac P., Markocic M., Guérin G., Praud K., Denoyes-Rothan B. The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) // Acta Hort. – 2002. – Vol. 567(2). – P. 615-618. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.132
8. Lerceteau-Kohler E., Guerin G., Denoyes-Rothan B. Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm // Theor Appl Genet. – 2005. – Vol. 111. – P. 862-870. DOI: 10.1007/s00122-005-0008-1
9. Luk'yanchuk I.V., Lyzhin A.S., Kozlova I.I. Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria* L.) for *Rca2* and *Rpf1* genes with molecular markers // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2018. – Vol. 22(7). – P. 795-799. DOI: 10.18699/VJ18.423
10. Salinas N., Fan Z., Peres N., Lee S., Whitaker V.M. FaRCa1 confers moderate resistance to the root necrosis form of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum*

acutatum // HortScience. – 2020. – Vol. 55(5). – P. 693-698. DOI: 10.21273/HORTSCI14807-20

11. Jacobs R.L., Adhikari T.B., Pattison J., Yencho G.C., Fernandez G.E., Louws F.J. Assessing rate-reducing foliar resistance to anthracnose crown rot and fruit rot in strawberry // Plant disease. – 2020. – Vol. 104(2). – P. 398-407. DOI: 10.1094/PDIS-04-19-0687-RE

12. Karimi K., Arzanlou M., Pertot I. Weeds as potential inoculum reservoir for *Colletotrichum nymphaeae* causing strawberry anthracnose in Iran and Rep-PCR fingerprinting as useful marker to differentiate *C. acutatum* complex on strawberry // Frontiers in microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 129. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00129

13. Sturzeanu M., Ciuca M., Cristina D., Turcu A.G. Use of RAPD and SCAR markers for identification of strawberry genotypes with red stele resistance genes *Rpf1* and fruit rot resistance genes *Rca2* in the hybrid progenies // IX International Strawberry Symposium. – 2021. – Vol. 1309. – P. 93-100. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1309.15

Статья поступила в редакцию 01.07.2023 г.

Lyzhin A.S., Lukyanchuk I.V. Marker-assisted analysis of strawberry hybrid seedlings according to anthracnose resistance (*Rca2* gene) // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2024. – № 150. – P. 58-62

Anthracnose fruit rot (*C. acutatum*) is a dangerous strawberry disease. One of the ways to control *C. acutatum* in strawberry plantations is the cultivation of cultivars with genetic resistance to this pathogen. Among the genetic factors of strawberry anthracnose resistance is the *Rca2* gene, which determines resistance to *C. acutatum* isolates of the pathogenicity group 2. Using the diagnostic DNA marker STS-Rca2_240, molecular screening of strawberry hybrid forms according to the *Rca2* anthracnose fruit rot resistance gene was carried out. Promising strawberry hybrids characterized by a heterozygous combination of alleles of the *Rca2* gene were identified: 2/1-24, 2/1-34 ('Quicky' × 'Olympia'), 3/9-5 ('Florence' × 'Faith'), 3/12-2, 3/12-9 ('Alisa' × 'Quicky'), 4/7-10, 4/7-19, 4/7-20 ('Asia' × 'Aprica'), and 5/2-26 and 5/2-32 ('San Andreas' × 'Monterey').

Key words: strawberry; breeding; resistance; anthracnose, molecular markers