

ОЦЕНКА ОТБОРНЫХ ФОРМ ЗЕМЛЯНИКИ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗНОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ (ГЕН *RPF1*)

Лыжин А.С., Лукьянчук И.В.

«Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина», г. Мичуринск, Россия

e-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru

ASSESSMENT OF STRAWBERRY SELECTED FORMS BY RESISTANCE TO RED STELE ROOT ROT (*RPF1* GENE)

Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V.

"I.V. Michurin Federal Scientific Center", Michurinsk, Russia

e-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru

Аннотация. Показаны результаты анализа аллельного состояния гена *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили у гибридных форм земляники селекции «ФНЦ им. И.В. Мичурина». Аллель *rpf1* в гомозиготном состоянии (восприимчивость к фитофторозу) идентифицирован у сеянцев 932-29 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Фейерверк), 933-4 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Рубиновый кулон), 62-7, 62-23 (Былинная × Фейерверк), 65-2, 65-15 (Олимпийская надежда × Былинная), 35-16 (922-67 × Maryshka). Гетерозиготное сочетание аллелей гена *Rpf1* выявлено у гибридных сеянцев 69-29 (Фейерверк × Былинная), 62-41 (Былинная × Фейерверк), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная), что позволяет использовать их в селекции на устойчивость к *P. fragariae* var. *fragariae* в качестве ценных исходных форм.

Ключевые слова: земляника, отборные формы, устойчивость, фитофтороз, молекулярные маркеры

Annotation. The results of the analysis of allelic state of the *Rpf1* red stele root rot resistance gene in strawberry hybrid forms created in the "I.V. Michurin FSC" were shown. Allele *rpf1* in homozygous state (susceptibility to red stele root rot) was identified in strawberry seedlings 932-29 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Feyerverk), 933-4 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Rubinovyy kulon), 62-7, 62-23 (Bylinnaya × Feyerverk), 65-2, 65-15 (Olimpiyskaya nadezhda × Bylinnaya) and 35-16 (922-67 × Maryshka). Heterozygous combination of *Rpf1* gene alleles was identified in strawberry hybrids 69-29 (Feyerverk × Bylinnaya), 62-41 (Bylinnaya × Feyerverk), 72-24, 72-71 (Privlekatelnaya × Bylinnaya), 65-17, 65-24 (Olimpiyskaya nadezhda × Bylinnaya), which allows them to be used in breeding for resistance to *P. fragariae* var. *fragariae* as valuable initial forms.

Key words: strawberry, selected forms, resistance, red stele root rot, molecular markers

ВВЕДЕНИЕ

Одно из наиболее опасных грибных заболеваний земляники — фитофторозная корневая гниль, возбудителем которой является *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman [2, 9]. Согласно перечню Европейско-средиземноморской организации по защите растений (EPPO) *P. fragariae* var. *fragariae* относится к карантинным патогенам класса A2 [7].

Симптомы поражения растений земляники возбудителем фитофтороза включают покраснение осевого цилиндра и отмирание кончиков корней, угнетение ростовых процессов, увядание и гибель растений [3].

У сортов и форм земляники устойчивость к фитофторозной корневой гнили обусловлена наличием в геноме расоспецифических олигогенов, которые соответствуют определенным генам авирулентности патогена [11], из которых наибольший вклад в формирование устойчивости вносят гены *Rpf1*, *Rpf2* и *Rpf3* [12].

Идентификация генетических детерминант устойчивости земляники к *P. fragariae* var. *fragariae* позволяет вести отбор устойчивых генотипов с использованием диагностических ДНК маркеров [6].

Целью настоящего исследования является анализ аллельного полиморфизма гена *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили у гибридных сеянцев земляники для идентификации ценных форм и вовлечения в селекционный процесс по созданию устойчивых к грибным патогенам генотипов.

МЕСТО, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в 2020–2023 гг. В качестве биологических объектов использованы перспективные гибридные сеянцы земляники, полученные в «Федеральном научном центре имени И.В. Мичурина».

Выявление в геноме земляники аллелей гена *Rpf1* проводили методом ДНК-анализа с использованием диагностических маркеров OPO-16C [5] и SCAR-R1A [6].

Маркер SCAR-R1A (ампликон размером 285 п.н.) соответствует аллелю резистентности *Rpf1*, и целевой фрагмент синтезируется только при его наличии в геноме земляники. Маркер OPO-16C (ампликон размером 438 п.н.) соответствует аллелю *rpf1*, экспрессия которого не приводит к формированию устойчивости.

Таблица 1 — Аллельный состояние гена *Rpf1* у гибридных форм земляники

Отборная форма	Комбинация скрещивания	Маркер SCAR-R1A	Маркер OPO-16C	Генотип
933-4	<i>F. virginiana</i> subsp. <i>platypetala</i> (Rydb.) Staudt × Рубиновый кулон	0	1	<i>rpf1rpf1</i>
932-29	<i>F. virginiana</i> subsp. <i>platypetala</i> (Rydb.) Staudt × Фейерверк	0	1	<i>rpf1rpf1</i>
69-29	Фейерверк × Былинная	1	1	<i>Rpf1rpf1</i>
62-7	Былинная × Фейерверк	0	1	<i>rpf1rpf1</i>
62-23		0	0	<i>rpf1rpf1</i>
62-41		1	1	<i>Rpf1rpf1</i>
72-24	Привлекательная × Былинная	1	1	<i>Rpf1rpf1</i>
72-71		1	1	<i>Rpf1rpf1</i>
65-2	Олимпийская надежда × Былинная	0	0	<i>rpf1rpf1</i>
65-15		0	0	<i>rpf1rpf1</i>
65-17		1	1	<i>Rpf1rpf1</i>
65-24		1	1	<i>Rpf1rpf1</i>
35-16	922-67 × Maryshka	0	0	<i>rpf1rpf1</i>

Комбинация указанных маркеров позволяет выявить аллельное состояние гена *Rpf1* у изучаемых генотипов земляники.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно проведённым исследованиям маркер OPO-16C идентифицирован у гибридных форм земляники межвидового [932-29 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Фейерверк), 933-4 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Рубиновый кулон)], а также межсортового [69-29 (Фейерверк × Былинная), 62-7, 62-41 (Былинная × Фейерверк), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная)] происхождения (табл. 1).

Помимо целевого фрагмента размером 438 п.н. у всех изучаемых генотипов земляники также присутствуют дополнительные ампликоны маркера OPO-16C, которые не являются диагностическими критериями наличия аллеля *rpf1* и не должны учитываться при анализе полученных результатов. Амплификация дополнительных фрагментов маркера OPO-16C подтверждается также другими исследователями [4, 10].

Маркер SCAR-R1A идентифицирован у отборных сеянцев земляники межсортового происхождения 69-29 (Фейерверк × Былинная), 62-41 (Былинная × Фейерверк), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная) (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о гетерозиготном состоянии гена *Rpf1* у форм 69-29 (Фейерверк × Былинная), 62-41 (Былинная × Фейерверк), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная) (оба маркера в генотипе присутствуют) и рецессивном гомозиготном состоянии — у сеянцев 932-29 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Фейерверк), 933-4 (*F. virginiana* subsp. *platypetala* × Рубиновый кулон), 62-7 (Былинная × Фейерверк), (в генотипе присутствует только маркер OPO-16C), 62-23 (Былинная × Фейерверк), 65-2, 65-15 (Олимпийская надежда × Былинная), 35-16 (922-67 × Maryshka) (оба маркера в генотипе отсутствуют).

Другими исследователями также идентифицированы отборные формы земляники с аллелем резистентности *Rpf1* в геноме: CPRO 90025, MD683, MDUS 3184, Yalova-15 (гетерозиготный генотип), CPRO 88239, CPRO 88246, CPRO 88275, Yalova-4 (гомозиготный генотип) [6].

Анализ происхождения изучаемых гибридных сеянцев земляники подтвердил данные молекулярно-генетического тестирования. Сеянцы 69-29 (Фейерверк × Былинная), 62-41 (Былинная × Фейерверк), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная), характеризующиеся наличием в геноме обоих маркеров и, следовательно, гетерозиготным состоянием гена *Rpf1* выделены в комбинациях скрещивания, где донором функционального аллеля *Rpf1* является сорт Былинная, а другие родительские генотипы (Олимпийская надежда, Привлекательная, Фейерверк) функционального аллеля *Rpf1* не имеют [1, 8]. В связи с этим, гибриды земляники с идентифицированным геном *Rpf1* могут иметь только гетерозиготное сочетание аллелей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследований определено аллельное состояние гена *Rpf1* у гибридных сеянцев земляники. Идентифицированы перспективные формы [69-29 (Фейерверк × Былинная), 62-41 (Былинная × Фейерверк), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная)], характеризующиеся устойчивостью к фитопатогенной корневой гнили (предполагаемый генотип — гетерозиготный).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лыжин А.С., Лукьянчук И.В. Анализ полиморфизма генотипов земляники (*Fragaria L.*) по гену устойчивости к фитопатогенной корневой гнили *Rpf1* для идентификации перспективных для селекции и садоводства форм // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. аграр. Навук. 2020. №58(3). С. 311–320. doi: 10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320.

2. Chen Z., Huang J., Zhao J., Liang H. Research Advance on the Red Stele Root Rot of Strawberry // Biotechnology Bulletin. 2007. Vol. 33(3). PP. 37–44. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017.03.006.
3. Gao R., Cheng Y., Wang Y., Wang Y., Guo L., Zhang G. Genome sequence of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, a quarantine plant-pathogenic fungus // Genome announcements. 2015. Vol. 3(2). PP. e00034-15. doi: 10.1128/genomeA.00034-15.
4. Gelvonauskienė D., Rugienius R., Šikšnianas T., Stanienė G., Sasnauskas A., Stanys V. Screening of apple and strawberry plants carrying fungal disease resistance oligogenes using molecular markers // Zemdirbystė/Agriculture. 2007. Vol. 94. No 4. PP. 139–145.
5. Haymes K.M., Henken B., Davis T.M., van de Weg W.E. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpf1*) in the cultivated strawberry // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 94(8). PP. 1097–1101.
6. Haymes K.M., Van de Weg W.E., Arens, P. Maas J.L., Vosman B., Den Nijs A.P.M. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2000. Vol. 125(3). PP. 330–339. doi: 10.21273/JASHS.125.3.330.
7. Hughes K.J.D., Inman A.J., Cooke D.E.L. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK // EPPO Bulletin. 2000. Vol. 30(3–4). PP. 533–538.
8. 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. No 7. PP. 795–799. doi: 10.18699/VJ18.423.
9. Sasnauskas A., Rugienius R., Gelvonauskienė D., Zalunskaitė I., Stanienė G., Šikšnianas T., Stanys V., Bobinas C. Screening of strawberries with the red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance gene *Rpf1* using sequence specific DNA markers // Acta Hort. 2007. Vol. 760. PP. 165–169. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.760.21.
10. Sturzeanu M., Coman M., Ciuca M., Ancu I., Cristina D., Turcu A.G. Molecular characterization of allelic status of the *Rpf1* and *Rca2* genes in six cultivars of strawberries // Acta Hort. 2016. Vol. 1139. PP. 107–112. doi: 10.17660/ActaHortic.2016.1139.19.
11. Van de Weg W.E. A gene-for-gene model to explain interactions between cultivars of strawberry and races of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* // Theoretical and Applied Genetics. 1997. Vol. 94(3–4). PP. 445–451. doi: 10.1007/s001220050435.
12. Whitaker V.M. Applications of molecular markers in strawberry // Journal of Berry Research. 2011. Vol. 1. PP. 115–127. doi: 10.3233/BR-2011-013.