

**АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОТБОРНЫХ ФОРМ ЗЕМЛЯНИКИ
САДОВОЙ ПО ГЕНУ *RPF1* УСТОЙЧИВОСТИ К *PHYTOPHTHORA*
FRAGARIAE VAR. *FRAGARIAE***

Лыжин Александр Сергеевич,

кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник

Ranenburzhetc@yandex.ru

Лукьянчук Ирина Васильевна,

кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник

irina.lk2011@yandex.ru

ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Показаны результаты молекулярно-генетического анализа перспективных гибридных сеянцев земляники по гену *Rpf1* устойчивости к фитофторозу. Маркер SCAR-R1A, сцепленный с геном *Rpf1*, идентифицирован у форм 69-29 (Фейерверк × Былинная), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), которые могут использоваться в качестве источников устойчивости к *P. fragariae* var. *fragariae* для маркер-опосредованной селекции. У остальных изученных гибридов маркер SCAR-R1A не выявлен (предполагаемый генотип – *rpf1rpf1*).

Ключевые слова: земляника; гибридные сеянцы; устойчивость; молекулярные маркеры; фитофторозная корневая гниль; ген *Rpf1*

Введение

Фитофторозная корневая гниль – опасное карантинное заболевание земляники, возбудителем которого является облигатный паразит из отдела *Oomycota* – *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*. Симптомы поражения – угнетение роста, мелколистность, увядание и, впоследствии, гибель растений вследствие разрушения корневой системы [1, 5, 7]. Устойчивость земляники к различным расам *P. fragariae* var. *fragariae* контролируется несколькими расоспецифическими олигогенами. В настоящее время считается, что формирование резистентности земляники к фитофторозной корневой гнили в основном обусловлено функционированием трёх генов – *Rpf1*, *Rpf2*, *Rpf3* [9].

Одним из актуальных направлений интенсификации процесса целенаправленного конструирования новых форм является сочетание методов классической селекции с технологиями селекции на основе ДНК-маркеров (marker assisted selection). Преимущество технологии ДНК-маркирования заключается в оценке наличия селекционно-значимых признаков не по их фенотипическому проявлению, формирующемуся под воздействием условий окружающей среды, а непосредственно по наличию в геноме целевых аллелей. Кроме того, применение систем молекулярных маркеров позволяет выявлять полиморфизм ДНК, устанавливать генетические взаимоотношения и происхождение сортов и форм, а также идентифицировать новые гены и локусы количественных признаков.

В настоящем исследовании представлены результаты анализа перспективных отборных форм земляники (*Fragaria* × *ananassa*) генетической коллекции ФГБНУ «ФНЦ им И.В. Мичурина» по гену *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили с использованием диагностических ДНК-маркеров.

Материалы и методы

Исследования были проведены в 2020-2021 гг. В качестве биологических объектов использованы перспективные отборные формы земляники садовой, полученные в «Федеральном научном центре имени И.В. Мичурина».

Экстракция тотальной ДНК земляники осуществлялась с использованием модифицированного СТАВ метода [8].

Идентификацию гена *Rpf1* проводили с использованием SCAR маркера R1A [6]. Целевым фрагментом маркера SCAR-R1A является ампликон размером 285 п.н., который соответствует доминантному аллелю *Rpf1* (генотип *Rpf1Rpf1* или *Rpf1rpf1*). У форм с гомозиготным состоянием аллеля *rpf1* целевой фрагмент отсутствует [6].

Контролем присутствия в геноме аллеля устойчивости *Rpf1* являлся повид земляники виргинской (*F. virginiana* ssp *platypetala*), характеризующийся согласно проведённым ранее исследованиям [4] гетерозиготным генотипом (*Rpf1rpf1*).

Праймеры для идентификации гена *Rpf1* имели следующую нуклеотидную последовательность:

for	5'-
TGCATCATTAATGTAGAAGTCTTT-3'	
rev	5'-
TGATGCGACATACAAAAATATTAG-3'	

Реакционная смесь общим объёмом 15 мкл, содержала 1,5 мМ Таq-буфера, 2,0 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2,5 мМ хлорида магния, 0,2 U Таq-полимеразы, 0,2 мкМ прямого и обратного праймера и 20 нг геномной ДНК.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе T100 (BIO-RAD) по программе: начальная денатурация 3 мин при 94°C, далее 25 циклов: 30 с при 94°C, 45 с при 60°C, 60 с при 72°C; далее финальная элонгация 7 мин при 72°C.

Разделение продуктов амплификации проводили электрофоретическим методом в агарозном геле (концентрация агарозы – 2%, буферная система – 1x TBE). Определение размера ампликонов проводили с использованием Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Результаты и обсуждение

В результате проведённого анализа целевой продукт маркера SCAR-R1A (285 п.н.) выявлен у гибридов 69-29 (Фейерверк × Былинная), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная) (рис. 1, табл. 1).

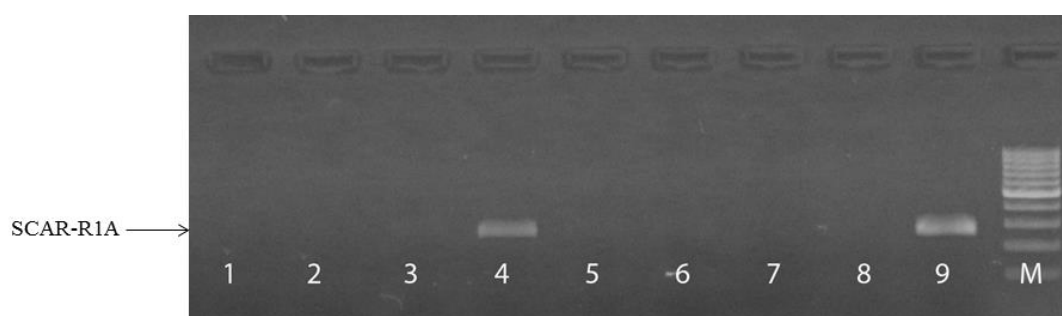


Рисунок 1 – Электрофоретический спектр маркера SCAR-R1A генотипов земляники
1 – 26-5, 2 – 928-12, 3 – 933-4, 4 – 72-71, 5 – 69-13, 6 – 35-16, 7 – 932-29, 8 – 72-57, 9 – 69-29, М – маркер молекулярного веса

Таблица 1

Результаты анализа гена *Rpf1* у отборных форм земляники садовой

Форма	Происхождение	SCAR-R1A	Генотип
933-4	<i>F. virginiana</i> ssp. <i>platypetala</i> × <i>F.</i> × <i>ananassa</i>	–	<i>rpf1rpf1</i>
932-29		–	<i>rpf1rpf1</i>
928-12	298-19-9-43 × Привлекательная	–	<i>rpf1rpf1</i>
26-5	Рубиновый кулон × 298-19-9-43	–	<i>rpf1rpf1</i>
35-16	922-67 × Maryshka	–	<i>rpf1rpf1</i>
69-13	Фейерверк × Былинная	–	<i>rpf1rpf1</i>
69-29		+	<i>Rpf1rpf1</i>
69-48		–	<i>rpf1rpf1</i>
72-13	Привлекательная × Былинная	–	<i>rpf1rpf1</i>
72-24		+	<i>Rpf1rpf1</i>
72-57		–	<i>rpf1rpf1</i>
72-71		+	<i>Rpf1rpf1</i>

Источником гена *Rpf1* для указанных форм земляники является сорт Былинная, который согласно проведённым ранее исследованиям [4] имеет гетерозиготный генотип (*Rpf1rpf1*). Сорта Фейерверк и Привлекательная согласно данным проведённого ранее ДНК анализа характеризуются рецессивным гомозиготным генотипом (*rpf1rpf1*) [2, 3]. В связи с вышеизложенным, комбинации скрещивания Фейерверк × Былинная и Привлекательная × Былинная имеют вид *rpf1rpf1* × *Rpf1rpf1* и, следовательно,

отборные формы 69-29 (Фейерверк × Былинная), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная) характеризуются гетерозиготным состоянием гена *Rpf1*.

У гибридных семян 933-4, 932-29 (*F. virginiana* ssp. *platypetala* × *F.* × *ananassa*), 928-12 (298-19-9-43 × Привлекательная), 69-13, 69-48 (Фейерверк × Былинная), 72-13, 72-57 (Привлекательная × Былинная), 26-5 (Рубиновый кулон × 298-19-9-43), 35-16 (922-67 × Maryshka) целевой продукт маркера SCAR-R1A отсутствует, что характеризует их генотип как гомозиготный по аллелю *rpf1*.

Заключение

Таким образом, среди проанализированных гибридных форм земляники садовой устойчивостью к фитофторозному увяданию по гену *Rpf1* характеризуются отборные формы 69-29 (Фейерверк × Былинная), 72-24, 72-71 (Привлекательная × Былинная), которые могут использоваться в качестве источников устойчивости к *P. fragariae* var. *fragariae* для маркер-опосредованной селекции.

Список литературы

1. Александров И.Н. Фитофтороз земляники / И.Н. Александров, О.В. Скрипка, И.П. Дудченко, Т.А. Сурина, С.В. Никифоров // Защита и карантин растений. – 2007. – №5. – С. 32-34.

2. Лукьянчук И.В. Анализ генетической коллекции земляники (*Fragaria* L.) по генам *Rca2* и *Rpf1* с использованием молекулярных маркеров / И.В. Лукьянчук, А.С. Лыжин, И.И. Козлова // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. №7. С. 795–799. doi: 10.18699/VJ18.423

3. Лыжин А.С. Молекулярно-генетический анализ сортов и форм земляники по генам устойчивости к фитофторозному увяданию *Rpf1* и антракнозу *Rca2* / А.С. Лыжин, И.В. Лукьянчук, Е.В. Жбанова // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2019. – № 60(6). – С. 31-40. doi: 10.30679/2219-5335-2019-6-60-31-40

4. Лыжин А.С. Анализ полиморфизма генотипов земляники (*Fragaria L.*) по гену устойчивости к фитопторозной корневой гнили *Rpf1* для идентификации перспективных для селекции и садоводства форм / А.С. Лыжин, И.В. Лукьянчук // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. Навук. – 2020. – Т. 58. – №3. – С. 311-320. doi: 10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320
5. Gao R. Genome sequence of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, a quarantine plant-pathogenic fungus / R. Gao, Y. Cheng, Y. Wang, Wang Y., Guo L., Zhang G. // Genome announcements. – 2015. – V. 3(2). – P. e00034-15.
6. Haymes K.M. Development of SCAR Markers Linked to a *Phytophthora fragariae* Resistance Gene and Their Assessment in European and North American Strawberry Genotypes / K.M. Haymes, W.E. Van de Weg, P. Arens, J.L. Maas, B. Vosman, A.P.M. Den Nijs // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 2000. – Vol. 125(3). – P. 330-339. doi: 10.21273/JASHS.125.3.330
7. Newton A.C. Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil / A.C. Newton, J.M. Duncan, N.H. Augustin, D.C. Guy, D.E.L. Cooke // Plant pathology. – 2010. – V. 59(3). – P. 472-479.
8. Puchooa D.A. Simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) / D.A. Puchooa // African Journal of Biotechnology. – 2004. – Vol. 3, №4. – P. 253-255.
9. Whitaker V.M. Applications of molecular markers in strawberry / V.M. Whitaker // Journal of Berry Resaerch. – 2011. – V. 1. – P. 115-127.

**ANALYSIS OF STRAWBERRY PROMISING SELECTED FORMS BY *RPF1*
GENE OF RESISTANCE TO *PHYTOPHTHORA FRAGARIAE* VAR.
*FRAGARIAE***

Lyzhin Alexander Sergeevich,
Cand. Sci. (Agr.), Leading researcher
Ranenburzhetc@yandex.ru

Luk'yanchuk Irina Vasilevna
Cand. Sci. (Agr.), Senior researcher
irina.lk2011@yandex.ru

FSSI "I.V. Michurin FSC",
Russia, Michurinsk

Abstract. The results of the molecular genetic analysis of strawberry promising hybrid seedlings for the *Rpf1* red stele root rot resistance genes were shown. Marker SCAR-R1A, linked to *Rpf1* gene, was identified in the strawberry forms 69-29 (Feyerverk × Bylinnaya), 72-24 and 72-71 (Privlekatelnaya × Bylinnaya), which can be used as a source in marker-assisted selection for red stele root rot resistance. In the remaining studied strawberry hybrids the marker SCAR-R1A was not detected (putative genotype *rpf1rpf1*).

Key words: strawberry; hybrid seedlings; molecular markers; resistance; red stele root rot; *Rpf1* gene