Научная статья
УДК 634.75:577.2:632.4
DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-o3

(cc) BY

Идентификация аллелей резистентности генов *Rca2* и *Rpf1* у селекционных форм земляники садовой межсортового гибридного происхождения

А. С. Лыжин, И. В. Лукъянчук

Федеральный научный центр имени И. В. Мичурина, Мичуринск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Александр Сергеевич Лыжин, Ranenburzhetc@yandex.ru

Актуальность. Создание сортов с генетической устойчивостью к грибным патогенам – одно из важнейших направлений селекционной работы по землянике. Перспективным направлением ускоренного отбора ценных образцов является молекулярный скрининг на наличие в генотипе диагностических ДНК-маркеров, сцепленных с целевыми аллелями селектируемых генов. **Цель работы:** определение аллельного состояния генов *Rca2* (устойчивость к антракнозу) и *Rpf1* (устойчивость к фитофторозу) у селекционных форм земляники садовой для выявления генотипов, устойчивых к *Colletotrichum acutatum* Simmonds и *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman. **Материал и методы.** Объектом исследований являлись селекционные формы земляники межсортового гибридного происхождения. В результате 22-х комбинаций скрещивания получены селекционные формы в количестве 61, у которых был изучен аллельный состав генов устойчивости. Для идентификации аллеля устойчивости к антракнозу *Rca2* использовали маркер STS-Rca2_240. Аллель *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили был идентифицирован с помощью маркера SCAR-R1A. **Результаты.** Хотя бы один из двух генов выявлен у 20 селекционных форм (32,8%). Маркер STS-Rca2_240 выявлен у 15 сеянцев из шести гибридных комбинаций (‘Vicoda’ × ‘Roxana’, ‘Florence’ × ‘Faith’, ‘Asia’ × ‘Aprica’, ‘San Andreas’ × ‘Monterey’, ‘Алиса’ × ‘Quicky’, ‘Quicky’ × ‘Olympia’), что составляет 22,9%. Маркер SCAR-R1A выявлен у пяти селекционных форм из четырёх комбинаций скрещивания (‘Привлекательная’ × ‘Былинная’, ‘Фейерверк’ × ‘Былинная’, ‘Былинная’ × ‘Фейерверк’, ‘Былинная’ × ‘Олимпийская надежда’), что составляет 8,2%. Установлено, что все формы с идентифицированными маркерными фрагментами для генов резистентности характеризуются гетерозиготным сочетанием аллелей. **Заключение.** Перспективными источниками доминантных аллелей резистентности *Rca2* являются селекционные формы: 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’), 9/1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32, 9/1-37 (‘Vicoda’ × ‘Roxana’), в случае *Rpf1* – селекционные формы 72-24, 72-71 (‘Привлекательная’ × ‘Былинная’), 69-29 (‘Фейерверк’ × ‘Былинная’), 62-41 (‘Былинная’ × ‘Фейерверк’), 61-15 (‘Былинная’ × ‘Олимпийская надежда’).

***Ключевые слова*:** *Fragaria* × *ananassa*, гибридные сеянцы, антракнозная чёрная гниль, фитофторозная корневая гниль, ДНК-маркеры

Благодарности: Работа выполнена в рамках Государственного задания «ФНЦ имени И.В. Мичурина» по проекту FGSU-2022-0002 «Разработать модели идеального сорта по основным промышленным садовым культурам, усовершенствовать методы направленной и маркер-опосредованной селекции и на их основе создать новые генотипы с повышенной устойчивостью к комплексу биотических и абиотических стрессоров, с высокой продуктивностью и улучшенным качеством плодов, конкурентоспособных на российском и мировом рынках».

Для цитирования: Лыжин А.С., Лукъянчук И.В. Идентификация аллелей резистентности генов *Rca2* и *Rpf1* у селекционных форм земляники садовой межсортового гибридного происхождения. *Биотехнология и селекция растений.* 2023;6(3):35-43. DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-o3

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их местам работы.

© Лыжин А.С., Лукъянчук И.В., 2023

Original article
DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-o3

Identification of *Rca2* and *Rpf1* resistance alleles in strawberry breeding forms of intervarietal hybrid origin

Alexander S. Lyzhin, Irina V. Luk'yanchuk

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

Corresponding author: Alexander S. Lyzhin, Ranenburzhetc@yandex.ru

Background. The creation of varieties with genetic resistance to fungal pathogens is one of the most important directions in strawberry breeding. A promising direction of accelerated selection of valuable specimens is the molecular screening of genotypes for the presence of diagnostic DNA markers linked to target genes of agro-biological traits. **The objectives** of the work were to determine the allelic status of the *Rca2* (resistance to anthracnose) and *Rpf1* (resistance to red stele root rot) genes in strawberry breeding forms for identifying genotypes resistant to *Colletotrichum acutatum* Simmonds and *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman. **Material and methods.** The object of research was strawberry breeding forms of intervarietal hybrid origin. As a result of 22 crossing combinations, 61 breeding forms were obtained, in which the allelic composition of resistance genes was studied. The *Rca2* anthracnose resistance allele was identified by means of the STS-Rca2_240 marker. The *Rpf1* red stele root rot resistance allele was identified with the help of the SCAR-R1A marker. **Results.** At least one of the two genes was identified in 20 selected strawberry forms (32.8%). The STS-Rca2_240 marker was identified in 15 strawberry seedlings (22.9%) from six hybrid combinations 'Vicoda' × 'Roxana', 'Florence' × 'Faith', 'Asia' × 'Aprica', 'San Andreas' × 'Monterey', 'Alisa' × 'Quicky', 'Quicky' × 'Olympia'). The SCAR-R1A marker was identified in five strawberry seedlings (8.2%) from four hybrid combinations ('Privlekatelnaya' × 'Bylinnaya', 'Feyerverk' × 'Bylinnaya', 'Bylinnaya' × 'Feyerverk', 'Bylinnaya' × 'Olimpiyskaya nadezhda'). It has been established that all strawberry selected forms with identified marker fragments for resistance genes are characterized by a heterozygous combination of alleles. **Conclusions.** Promising sources of resistance alleles are strawberry breeding forms 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'), 5/2-26, 5/2-32 ('San Andreas' × 'Monterey'), 9/ 1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32, 9/1-37 'Vicoda' × 'Roxana') in the case of *Rca2* gene, and 72-24, 72-71 (Privlekatelnaya × Bylinnaya), 69-29 ('Feyerverk' × 'Bylinnaya'), 62-41 ('Bylinnaya' × 'Feyerverk'), 61-15 ('Bylinnaya' × 'Olimpiyskaya nadezhda') in the case of *Rpf1* gene.

Keywords: *Fragaria* × *ananassa*, hybrid seedlings, anthracnose, red stele root rot, DNA markers

Acknowledgments: The work was carried out within the framework of the State Assignment to the I.V. Michurin FSC under the project FGSU-2022-0002 "To develop models of an ideal cultivar for the main commercial horticultural crops, improve methods of targeted and marker-assisted selection, and produce on their basis new genotypes with increased resistance to a set of biotic and abiotic stressors, with high productivity and improved fruit quality, competitive in the Russian and world markets"

For citation: Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V. Identification of *Rca2* and *Rpf1* resistance alleles in strawberry breeding forms of intervarietal hybrid origin. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2023;6(3):35-43. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2023-3-o3

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V., 2023

Введение

Земляника (*Fragaria* L.) – наиболее популярная и экономически выгодная ягодная культура. Род *Fragaria* насчитывает около 25 видов различного уровня плоидности (2x, 4x, 5x, 6x, 8x, 10x) с базовым числом хромосом x=7 (Staudt, 2009). Культивируемые сорта и формы земляники относятся к синтетическому октоплоидному виду *F.* × *ananassa* Duch. (8x=56), который возник в результате спонтанной гибридизации *F. virginiana* Duch. и *F. chiloensis* (L.) Duch. (Hancock et al., 2003).

В настоящее время в условиях интенсификации отрасли садоводства, имеющей приоритетной целью увеличение объемов производства плодово-ягодной продукции высокого качества и относительную оптимизацию ресурсных затрат, важнейшее значение имеет сорт. В мире насчитывается более 3000 сортов земляники, в России – более 300 (Stolbanova, 2006). По состоянию на 2023 год, в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации внесено 130 сортов земляники садовой (State Register, 2023). При этом, несмотря на преобладание в Госреестре сортов отечественной селекции, промышленные насаждения в основном представлены интенсивными сортами иностранного происхождения – ‘Polka’, ‘Elsanta’, ‘Kimberly’, ‘Florence’, ‘Marmolada’ и другие (Marchenko, 2020). Кроме того, в условиях усиливающейся дестабилизации климата, участившихся эпифитотий болезней различной этиологии, а также возросших требований к качеству продукции, не все существующие сорта в полной мере отвечают современным требованиям, что обуславливает необходимость проведения интенсивной селекционной работы с целью создания новых отечественных высококонкурентоспособных сортов земляники.

Успешное решение задачи совершенствования сортимента земляники неразрывно связано с углублением генетических исследований, привлечением и созданием качественно нового исходного материала, совершенствованием методов подбора родительских пар. Важным этапом селекционного процесса является подбор исходных родительских форм для гибридизации. Такие формы должны не только характеризоваться комплексом селекционно-значимых признаков, но и способностью передавать их потомству, что позволяет повысить эффективность конструирования ценных генотипов.

Одним из перспективных направлений повышения эффективности селекционного процесса является сочетание методов классической селекции с ДНК-маркерным анализом исходных форм и гибридных растений. 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 (Whitaker, 2011; Porter et al., 2023).

К числу агробиологических признаков, по которым рекомендуется вести селекцию земляники садовой с помощью молекулярных маркеров, относятся устойчивость к антракнозной чёрной гнили (возбудитель *Colletotrichum acutatum* Simmonds) и фитофторозной корневой гнили, вызываемой *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman (Bassil et al., 2017; Sturzeanu et al., 2021). Указанные фитопатогены на территории Российской Федерации относятся к перечню карантинных организмов (Aleksandrov et al., 2007; Kuznetsova et al., 2018), в связи с чем оценка устойчивости растений на естественном инфекционном фоне невозможна, а сложность борьбы с ними в производственных насаждениях обуславливает необходимость создания и возделывания сортов с генетически детерминированной устойчивостью (Parikka, 2004; Whitaker et al., 2017).

Целью настоящего исследования являлось определение аллельного состояния генов *Rca2* (устойчивость к антракнозу) и *Rpf1* (устойчивость к фитофторозу) у селекционных форм земляники садовой для выявления генотипов, устойчивых к *C. acutatum* и *P. fragariae* var. *fragariae*.

Материал и методы

Объектом исследований являлась 61 селекционная форма земляники садовой межсортового происхождения из 22-х комбинаций скрещивания. Селекционные формы созданы в Федеральном научном центре имени И.В. Мичурина.

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев, экстракцию проводили CTAB-методом, модифицированным для культуры земляники (Luk’yanchuk et al., 2018).

Для идентификации гена *Rca2* использовали маркер STS-Rca2_240 (целевой продукт – ампликон размером 240 пн, сцепленный с аллелем резистентности), для контроля протекания ПЦР и исключения ложноотрицательных результатов – маркер EMFv020. Соответствующие этим маркерам фрагменты амплифицировали с использованием мультиплексной ПЦР (Lerceteau-Kohler et al., 2005). В качестве положительного контроля использовали устойчивый к антракнозу сорт ‘Elianny’, имеющий в генотипе доминантный аллель *Rca2* (Lyzhin et al., 2019). Ген *Rpf1* выявляли с помощью маркера SCAR-R1A. Аллелю резистентности соответствует ампликон размером 285 пн (Haymes et al., 2000). Положительным контролем являлся сорт ‘Былинная’, характеризующийся наличием доминантного аллеля резистентности *Rpf1* в гетерозиготном состоянии (Lyzhin, Luk’yanchuk, 2020).

Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США) с использованием описанных ранее реактивов и программ амплификации (Lyzhin, Luk’yanchuk, 2020; 2022a).

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера (ТБЕ). Размер продук-

тов амплификации определяли с помощью ДНК-маркера Step100 (Биолабмикс, Россия). Визуализацию результатов амплификации проводили с использованием системы гель-документации ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Результаты

В результате проведённого молекулярно-генетического анализа маркер STS-Rca2_240, сцепленный с геном *Rca2*, доминантный аллель которого обуславливает устойчивость к антракнозной чёрной гнили, выявлен у 15 сеянцев из шести гибридных комбинаций: 'Vicoda' × 'Roxana', 'Florence' × 'Faith', 'Asia' × 'Aprica', 'San Andreas' × 'Monterey', 'Алиса' × 'Quicky', 'Quicky' × 'Olympia', что составляет 22,9%. При этом пять из 15 селекционных форм (33,3%) выделены в комбинации 'Vicoda' × 'Roxana', а три формы (20,0%) – в комбинации 'Asia' × 'Aprica'. Результаты представлены в таблице. Пример идентификации приведён на рисунке 1.

Таблица. Аллельный полиморфизм локусов устойчивости к антракнозной чёрной гнили и фитофторозной корневой гнили у селекционных форм земляники

Table. Allelic polymorphism in loci for resistance to anthracnose and red stele root rot in strawberry breeding forms

№	Селекционная форма/ Breeding form	Комбинация скрещивания/ Crossing combination	Ген *Rca2*/ *Rca2* gene	Ген *Rpf1*/ *Rpf1* gene
			Маркер STS-Rca2_240/ STS-Rca2_240 marker	Маркер SCAR-R1A/ SCAR-R1A marker
1	911-16	'Фейерверк' × 'Фестивальная Ромашка'	0	0
2	72-24	'Привлекательная' × 'Былинная'	0	1
3	72-71		0	1
4	69-29	'Фейерверк' × 'Былинная'	0	1
5	62-41	'Былинная' × 'Фейерверк'	0	1
6	61-15	'Былинная' × 'Олимпийская надежда'	0	1
7	56-5	'Gigantella Maxim' × 'Привлекательная'	0	0
8	56-17		0	0
9	56-19		0	0
10	21-14	'Урожайная ЦГЛ' × 'Рубиновый кулон'	0	0
11	1/6-41	'Vima Zanta' × 'Polka'	0	0
12	2/1-12	'Quicky' × 'Olympia'	0	0
13	2/1-24		1	0
14	2/1-25		0	0
15	2/1-32		0	0
16	2/1-34		1	0
17	2/2-8-16	'Привлекательная' × 'Polka'	0	0
18	2/2-32	'Faith' × 'Tea'	0	0
19	2/2-41		0	0
20	2/3-12	'Scala' × 'Tea'	0	0
21	3/2-3	'Vima Zanta' × 'Привлекательная'	0	0
22	3/2-62		0	0
23	3/4-6	'Malwina' × 'Tea'	0	0
24	3/4-7		0	0
25	3/9-5	'Florence' × 'Faith'	1	0
26	3/9-12		0	0
27	3/12-2	'Алиса' × 'Quicky'	1	0
28	3/12-9		1	0
29	4/7-8	'Asia' × 'Aprica'	0	0
30	4/7-10		1	0
31	4/7-16		0	0
32	4/7-17		0	0
33	4/7-19		1	0
34	4/7-20		1	0

№	Селекционная форма/ Breeding form	Комбинация скрещивания/ Crossing combination	Ген *Rca2*/ *Rca2* gene	Ген *Rpf1*/ *Rpf1* gene
			Маркер STS-Rca2_240/ STS-Rca2_240 marker	Маркер SCAR-R1A/ SCAR-R1A marker
35	5/1-105	'Polka' × 'Vima Zanta'	0	0
36	5/2-23	'San Andreas' × 'Monterey'	0	0
37	5/2-26		1	0
38	5/2-32	'San Andreas' × 'Monterey'	1	0
39	7/2-16	'Asia' × 'Maya'	0	0
40	7/2-17	'Asia' × 'Maya'	0	0
41	7/2-48		0	0
42	7/2-78		0	0
43	7/2-79		0	0
44	7/2-93		0	0
45	8/2-41	'Vicoda' × 'Roxana'	0	0
46	8/2-48		0	0
47	8/2-49		0	0
48	8/2-55		0	0
49	8/2-69		0	0
50	8/2-102		0	0
51	8/2-109		0	0
52	8/2-112		0	0
53	9/1-11		1	0
54	9/1-12		1	0
55	9/1-13		1	0
56	9/1-32		1	0
57	9/1-37		1	0
58	9/2-2	'Kimberly' × 'Honeoye'	0	0
59	9/2-7		0	0
60	9/2-10		0	0
61	9/2-41		0	0

Примечание: 1 – целевой аллель присутствует, 0 – целевой аллель отсутствует

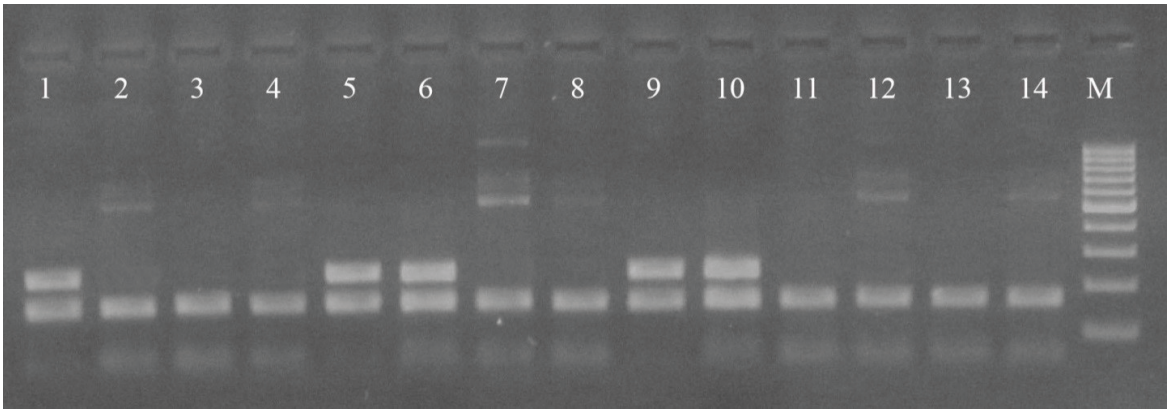

Рис. 1. Электрофоретический профиль фрагментов ДНК маркера гена *Rca2* у селекционных форм земляники

1) 'Elianny' (контроль); 2) 7/2-16; 3) 56-19; 4) 6/3-6; 5) 9/1-11; 6) 9/1-13; 7) 9/2-7; 8) 1/6-41; 9) 9/1-12; 10) 9/1-37; 11) 8/2-109; 12) 8/2-112; 13) 8/2-102; 14) 2/2-8. M – маркер молекулярного веса фрагментов ДНК

Fig. 1. Electrophoretic profile of the *Rca2* gene marker fragments in strawberry breeding forms

1) 'Elianny' (control); 2) 7/2-16; 3) 56-19; 4) 6/3-6; 5) 9/1-11; 6) 9/1-13; 7) 9/2-7; 8) 1/6-41; 9) 9/1-12; 10) 9/1-37; 11) 8/2-109; 12) 8/2-112; 13) 8/2-102; 14) 2/2-8; M – DNA molecular weight marker

Маркер SCAR-R1A, сцепленный с *Rpf1*, геном устойчивости к фитофторозному увяданию, выявлен у пяти селекционных форм из четырёх комбинаций скрещивания ('Привлекательная' × 'Былинная', 'Фейерверк' × 'Былинная', 'Былинная' × 'Фейерверк', 'Былинная' × 'Олимпийская надежда'), что составляет 8,2%. Пример полученных электрофоретических спектров маркера SCAR-R1A представлен на рисунке 2, результаты идентификации – в таблице.

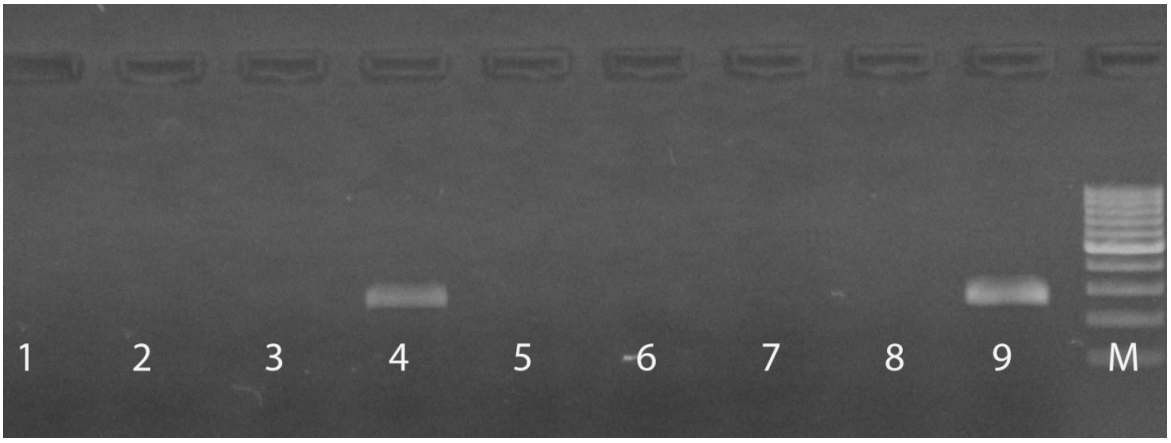

Рис. 2. Электрофоретический профиль фрагментов ДНК маркера гена *Rpf1* у селекционных форм земляники

1) 298-19-9-43; 2) 928-12; 3) 933-4; 4) 62-41; 5) 56-5; 6) 35-16; 7) 932-29; 8) 26-5; 9) 69-29. М – маркер молекулярного веса фрагментов ДНК

Fig. 2. Electrophoretic profile of the *Rca2* gene marker fragments in strawberry breeding forms

1) 298-19-9-43; 2) 928-12; 3) 933-4; 4) 62-41; 5) 56-5; 6) 35-16; 7) 932-29; 8) 26-5; 9) 69-29. M – DNA molecular weight marker

Хотя бы один из двух генов выявлен у 20 селекционных форм, что составляет 32,8% от общего количества проанализированных генотипов. Остальные изученные формы характеризовались гомозиготным состоянием аллелей *rca2* и *rpf1* и, следовательно, восприимчивостью к *C. acutatum* и *P. fragariae* var. *fragariae*.

Обсуждение

Устойчивость земляники к возбудителям различных заболеваний в большинстве случаев контролируется полигенно. Однако, для некоторых патогенов также выявлены моногенные факторы устойчивости. К их числу относятся локусы *FaRCa1* (Salinas et al., 2020) и *Rca2* (Lerceteau-Kohler et al., 2002), контролирующие устойчивость земляники к антракнозу, а также гены семейства *Rpf* (*Rpf1*, *Rpf2*, *Rpf3*) (Van de Weg, 1997a; Van de Weg, 1997b), контролирующие устойчивость к фитофторозу. Наличие моногенно детерминированной устойчивости к антракнозу и фитофторозу позволяет направлено подбирать исходные формы для гибридизации и прогнозировать наследование целевых аллелей в гибридном потомстве.

Проведённый ранее (Lyzhin, Luk'yanchuk, 2022a; b) анализ исходных родительских форм земляники на наличие диагностического маркера STS-Rca2_240 показал, что сорт 'Roxana' характеризуется гетерозиготным сочетанием аллелей гена *Rca2*, у сортов 'Aprica' и 'Monterey' аллель резистентности *Rca2* находится в гомозиготном или гетерозиготном состоянии, сорта 'Faith', 'Asia', 'Quicky', 'Vicoda' имеют гомозиготный генотип по аллелю *rca2*. Присутствие диагностического маркера STS-Rca2_240 у сорта 'Roxana' подтверждается также работами других авторов (Miller-Butler et al., 2019; Khrabrov et al., 2021). Для сортов 'Алиса', 'Florence', 'San Andreas' и 'Olympia' данные об аллельном состоянии гена *Rca2* отсутствуют.

В связи с вышеизложенным, источником аллеля резистентности *Rca2* для гибридных сеянцев в комбинации скрещивания 'Vicoda' × 'Roxana' является сорт 'Roxana', в комбинации 'Florence' × 'Faith' – сорт 'Florence', в комбинации 'Asia' × 'Aprica' – сорт 'Aprica', в комбинации 'San Andreas' × 'Monterey' – сорт 'Monterey', в комбинации 'Алиса' × 'Quicky' – сорт 'Алиса', в комбинации скрещивания 'Quicky' × 'Olympia' – сорт 'Olympia'.

Таким образом, данные комбинации имеют вид *Rca2–* × *rca2rca2* и, следовательно, селекционные формы: 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'); 9/1-11; 9/1-12; 9/1-13; 9/1-32; 9/1-37 ('Vicoda' × 'Roxana') с идентифицированным маркером STS-Rca2_240 характеризуются гетерозиготным сочетанием аллелей гена *Rca2*.

Необходимо отметить, что в гибридных комбинациях 'Quicky' × 'Olympia', 'Florence' × 'Faith', 'Asia' × 'Aprica', 'San Andreas' × 'Monterey' и 'Vicoda' × 'Roxana' также были отобраны формы, у которых маркер STS-Rca2_240 отсутствует: 2/1-12; 2/1-25; 2/1-32; 3/9-12; 4/7-8; 4/7-16; 4/7-17; 5/2-23; 8/2-41; 8/2-48; 8/2-49; 8/2-55; 8/2-69; 8/2-102; 8/2-109; 8/2-112. Кроме того, селекционные формы 3/4-6; 3/4-7 ('Malwina' × 'Tea') и 21-14 ('Урожайная ЦГЛ' × 'Рубиновый кулон'), полученные с участием источников гена *Rca2*, таких как сорта 'Malwina' и 'Рубиновый кулон'

(Lyzhin, Luk'yanchuk, 2022b), аллель резистентности не унаследовали и являются гомозиготами по аллелю *rca2*.

Отобранные гибриды: 911-16 ('Фейерверк' × 'Фестивальная Ромашка'); 72-24; 72-71 ('Привлекательная' × 'Былинная'); 69-29 ('Фейерверк' × 'Былинная'); 62-41 ('Былинная' × 'Фейерверк'); 61-15 ('Былинная' × 'Олимпийская надежда'); 56-5; 56-17; 56-19 ('Gigantella Maxim' × 'Привлекательная'); 1/6-41 ('Vima Zanta' × 'Polka'); 2/2-8-16 ('Привлекательная' × 'Polka'); 2/2-32; 2/2-41 ('Faith' × 'Tea'); 2/3-12 ('Scala' × 'Tea'), 3/2-3, 3/2-62 ('Vima Zanta' × 'Привлекательная'); 5/1-105 ('Polka' × 'Vima Zanta'); 7/2-16; 7/2-17; 7/2-48; 7/2-78; 7/2-79; 7/2-93 ('Asia' × 'Maya'); 9/2-2; 9/2-7; 9/2-10; 9/2-41 ('Kimberly' × 'Honeoye') – содержат аллель *rca2* в гомозиготном состоянии. Полученные данные подтверждаются анализом исходных родительских форм – сортов 'Былинная', 'Олимпийская надежда', 'Привлекательная', 'Фейерверк', 'Фестивальная Ромашка', 'Asia', 'Faith', 'Gigantella Maxim', 'Honeoye', 'Kimberly', 'Polka', 'Vima Zanta', у которых маркер STS-Rca2_240 не выявлен (Lyzhin et al, 2019; Khrabrov et al., 2021; Lyzhin, Luk'yanchuk, 2022a; b). Сорта 'Tea', 'Scala' и 'Maya' на наличие диагностического маркера STS-Rca2_240 не были проверены.

ДНК-маркеры, сцепленные с геном *Rca2*, активно применяются как для анализа генетических коллекций сортов земляники, так и гибридных сеянцев для идентификации устойчивых к *C. acutatum* форм. С использованием маркера STS-Rca2_240 доминантный аллель гена *Rca2* выявлен у сортов 'Capitola', 'Chandler', 'Dover', 'Oso Grande', 'Seascape', 'Selva' (Lerceteau-Kohler et al., 2005), 'Benton' (Sturzeanu et al., 2016). Кроме того, в комбинации скрещивания 'Benton' × 'Cambridge Favourite' было отобрано 17 форм (Sturzeanu et al., 2021), а Кельдибековой с соавторами (Keldibekova et al., 2024) в гибридных комбинациях 'Alba' × 'Росинка' и 'Росинка' × 'Darselect' 136 гибридов, характеризующихся наличием аллеля резистентности *Rca2*.

Все сеянцы с идентифицированным геном *Rpf1* выделены в комбинациях скрещивания с участием сорта 'Былинная' ('Былинная' × 'Фейерверк', 'Фейерверк' × 'Былинная', 'Привлекательная' × 'Былинная' и 'Былинная' × 'Олимпийская надежда'), который согласно данным молекулярно-генетического анализа (Lyzhin, Luk'yanchuk, 2020) имеет гетерозиготный генотип. Сорта 'Фейерверк', 'Привлекательная' и 'Олимпийская надежда' имеют генотип, гомозиготный по аллелю *rpf1*. Поэтому отобранные формы 62-41 ('Былинная' × 'Фейерверк'), 69-29 ('Фейерверк' × 'Былинная'), 72-24; 72-71 ('Привлекательная' × 'Былинная') и 61-15 ('Былинная' × 'Олимпийская надежда') характеризуются гетерозиготным сочетанием аллелей *Rpf1 rpf1*. Остальные проанализированные формы имеют генотип, гомозиготный по аллелю *rpf1*. Для сеянцев: 56-5; 56-17; 56-19 ('Gigantella Maxim' × 'Привлекательная'), 1/6-41 ('Vima Zanta' × 'Polka'), 2/2-8-16 ('Привлекательная' × 'Polka'), 3/2-3; 3/2-62 ('Vima Zanta' × 'Привлекательная') и 5/1-105 ('Polka' × 'Vima Zanta') – полученные результаты подтверждаются анализом исходных форм (Lyzhin, Luk'yanchuk, 2020; 2021).

Другими исследователями также идентифицированы генотипы земляники с аллелем резистентности *Rpf1*: сорта 'Allstar', 'Annapolis', 'Cornwallis', 'Darrow', 'Guardian', 'Hood', 'Redchief', 'Tristar' (Haymes et al., 2000), 'Benton', 'Idea', 'Mira' (Sturzeanu et al., 2016), селекционные формы CPRO 77191 ('Guardian' × 'Sivetta'), CPRO 88218 ('Bogota' × 'Scot'), CPRO 88239 ('Bogota' × 'Yalova-4'), CPRO 90025 ('Allstar' × 'Korona') (Haymes et al., 2000), 11(12); 11(47); 11(48); 11(57) ('Ранняя плотная' × 'Говоровская') (Keldibekova et al., 2024).

Сеянцев, совмещающих в генотипе два гена резистентности, в анализируемой выборке нами идентифицировано не было. Это объясняется тем, что в изучаемых комбинациях скрещивания целевые аллели находятся в разных группах сцепления. Однако препятствий для комбинирования в одном генотипе аллелей генов *Rpf1* и *Rca2* нет. Для получения гибридов земляники с комплексной устойчивостью к *C. acutatum* и *P. fragariae* var. *fragariae* нами планируется проведение гибридизации между селекционными формами, имеющими доминантные аллели разных локусов устойчивости.

Заключение

Согласно результатам молекулярно-генетического анализа устойчивостью к антракнозной чёрной гнили, детерминируемой геном *Rca2,* характеризуются селекционные формы 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'); 9/1-11; 9/1-12; 9/1-13; 9/1-32; 9/1-37 ('Vicoda' × 'Roxana'); устойчивостью к фитофторозной корневой гнили (ген *Rpf1*) – селекционные формы 72-24; 72-71 ('Привлекательная' × 'Былинная'); 69-29 ('Фейерверк' × 'Былинная'); 62-41 ('Былинная' × 'Фейерверк'); 61-15 ('Былинная' × 'Олимпийская надежда'). Указанные гибриды являются перспективными источниками аллелей резистентности для использования в селекции по созданию сортов земляники с комплексной устойчивостью к патогенам.

References/Литература

Aleksandrov I.N., Skripka O.V., Dudchenko I.P., Surina T.A., Nikiforov S.V. Red stele root rot in strawberry. *Plant Protection and Quarantine*. 2007;5:32-34. [in Russian] (Александров И.Н., Скрипка О.В., Дудченко И.П., Сурина Т.А., Никифоров С.В. Фитофтороз земляники. *Защита и карантин растений*. 2007;5:32-34).

Bassil N.V., Hummer K.E., Finn C.E. Lessons learned from DNA-based tool development and use in a genebank. *Acta Horticulturae*. 2017;1156:25-36. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1156.4

Hancock J.F., Callow P.W., Serce S. Variation in the horticultural characteristics of native *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* from North and South America. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2003;128(2):201-208. DOI: 10.21273/

JASHS.128.2.0201
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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2000;125(3):330-339. DOI: 10.21273/JASHS.125.3.330
Keldibekova M., Bezlepkina E., Zubkova M., Dolzhikova M. DNA-screening of strawberry cultivars and hybrids (*Fragaria ananassa* Duch.) for resistance to fungal diseases. *Pakistan Journal of Botany*. 2024;56(2):29. DOI: 10.30848/PJB2024-2(29)
Khrabrov I.E., Antonova O.Yu., Shapovalov M.I., Semenova L.G. Molecular screening of the VIR strawberry varieties collection for the presence of a marker for the anthracnose black rot resistance gene *Rca2*. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(4):15-24. [in Russian] (Храбров И.Э., Антонова О.Ю., Шаповалов М.И., Семенова Л.Г. Молекулярный скрининг сортовой коллекции земляники ВИР на наличие маркера гена устойчивости к антракнозной черной гнили *Rca2*. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(4):15-24). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-o3
Kuznetsova A.A., Dudchenko I.P., Kopina M.B. Strawberry anthracnose, classical and modern diagnostic methods. In: *Modern approaches and methods in plant protection; 2018 November 12-14; Ekaterinburg, Russia;* Ekaterinburg: Ural Federal University; 2018. p.78-81. [in Russian] (Кузнецова А.А., Дудченко И.П., Копина М.Б. Антракноз земляники, классические и современные методы диагностики. В кн.: *Современные подходы и методы в защите растений; 12-14 ноября 2018; Екатеринбург, Россия*; Екатеринбург: Уральский федеральный университет; 2018. С.78-81). URL: http://hdl.handle.net/10995/66377 [дата обращения 19.06.2023].
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 Horticulturae*. 2002;567(2):615-618. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.132
Lerceteau-Kohler E., Guerin G., Denoyes-Rothan B. Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111:862-870. DOI: 10.1007/s00122-005-0008-1
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;22(7):795-799. DOI: 10.18699/VJ18.423
Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V., Zhbanova E.V. Polymorphism of the *Rca2* anthracnose resistance gene in strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa*). *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(1):73-77. [in Russian] (Лыжин А.С., Лукъянчук И.В., Жбанова Е.В. Полиморфизм сортов земляники (*Fragaria × ananassa*) по гену устойчивости к антракнозу *Rca2*. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):73-77). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77
Lyzhin A., Luk'yanchuk I. Analysis of polymorphism of strawberry genotypes (*Fragaria* L.) according to the strawberry red root spot resistance gene *Rpf1* for identification of strawberry forms promising for breeding and horticulture. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus. Agrarian series*. 2020;58(3):311-320. [in Russian] (Лыжин А.С., Лукьянчук И.В. Анализ полиморфизма генотипов земляники (*Fragaria* L.) по гену устойчивости к фитофторозной корневой гнили *Rpf1* для идентификации перспективных для селекции и садоводства форм. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук*. 2020;58(3):311-320). DOI: 10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320
Lyzhin A., Luk'yanchuk I. Marker-assisted screening of promising forms in the strawberry breeding. *E3S Web of Conferences*. 2021;254:03002. DOI: 10.1051/e3sconf/202125403002
Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V. Analysis of *Fragaria × ananassa* Duch. varieties for anthracnose resistance using diagnostic DNA markers. *Agrarian Russia*. 2022a;9:16-20. [in Russian] (Лыжин А.С., Лукъянчук И.В. Анализ сортов земляники садовой по устойчивости к антракнозу с использованием диагностических ДНК-маркеров. *Аграрная Россия*. 2022a;9:16-20). DOI: 10.30906/1999-5636-2022-9-16-20
Lyzhin A., Luk'yanchuk I. Assessment of anthracnose resistance (*Rca2* gene) at foreign strawberry varieties using DNA markers. In: *Agroecological aspects of sustainable development of the agro-industrial complex. Proceedings of the XIX International Scientific Conference; 2022 March 14-18; Bryansk, Russia*; Bryansk: Bryansk State Agrarian University; 2022b. p.81-85. [in Russian] (Лыжин А.С., Лукъянчук И.В. Оценка устойчивости к антракнозу (ген *Rca2*) сортов земляники зарубежной селекции с использованием ДНК-маркеров. В кн.: *Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК. Материалы XIX международной научной конференции; 14-18 марта 2022; Брянск, Россия*; Брянск: Брянский государственный аграрный университет; 2022b. С.81-85).
Marchenko L.A. Strawberry: evolution of the domestic assortment and direction of selection. *Agrarian bulletin of the Urals*. 2020;12(203):50-60. [in Russian] (Марченко Л.А. Земляника садовая: оценка отечественного сортимента и направления селекции. *Аграрный вестник Урала*. 2020;12(203):50-60). DOI: 10.32417/1997-4868-2020-203-12-50-60
Miller-Butler M.A., Smith B.J., Kreiser B.R., Blythe E.K. Comparison of anthracnose resistance with the presence of two SCAR markers associated with the *Rca2* gene in strawberry. *Horticultural Science*. 2019;54(5):793-798. DOI: 10.21273/HORTSCI13805-18
Parikka P. Disease resistance in strawberry breeding programmes - major pathogens in European strawberry production. *Acta Horticulturae*. 2004;649:49-54. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.649.6
Porter M., Fan Z., Lee S., Whitaker V.M. Strawberry breeding for improved flavor. *Crop Science*. 2023;63(4):1949-1963. DOI: 10.1002/csc2.21012
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*. *Horticultural Science*. 2020;55(5):693-698. DOI: 10.21273/HORTSCI14807-20
State Register for Selection Achievements Admitted for Usage (National List). Vol. 1 "Plant varieties" (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh; 2023. [in Russian] (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. «Сорта растений» (официальное издание). Москва: Росинформагротех; 2023).
Staudt G. Strawberry biogeography, genetics and systematics. *Acta Horticulturae*. 2009;842:71-84. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.842.1
Stolbanova N.V. Current state of strawberry breeding in the world. *Fruit Growing*. 2006;18(1):231-241. [in Russian] (Столбанова Н.В. Современное состояние селекции земляники в мире. *Плодоводство*. 2006;18(1):231-241).
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 Horticulturae.* 2016;1139:107-112. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1139.19
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. *Acta Horticulturae*. 2021;1309:93-100. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1309.15
Van de Weg W.E. Resistance to *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in strawberry: the *Rpf2* gene. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997a;94(8):1092-1096. DOI: 10.1007/s001220050520
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*. 1997b;94(3-4):445-451. DOI: 10.1007/s001220050435
Whitaker V.M. Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research*. 2011;1:115-127. DOI: 10.3233/BR-2011-013
Whitaker V.M., Lee S., Osorio L.F., Verma S., Roach J.A., Mangandi J., Noh Y.-H., Gezan S., Peres N. Advances in strawberry breeding at the University of Florida. *Acta Horticulturae*. 2017;1156:1-6. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1156.1

Информация об авторах

Александр Сергеевич Лыжин, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии устойчивости и геномных технологий, Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина (ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»), Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина (ВНИИГиСПР), Россия 393770, Тамбовская область, Мичуринск, ул. ЦГЛ, 8, Ranenburzhetc@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-9770-8731
Ирина Васильевна Лукъянчук, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории частной генетики и селекции растений, Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина (ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»), Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина (ВНИИГиСПР), Россия 393770, Тамбовская область, Мичуринск, ул. ЦГЛ, 8, irina.lk2011@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1626-840X

Information about the authors

Alexander S. Lyzhin, Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Laboratory of Physiology of Resistance and Genomic Technologies, I.V. Michurin Federal Scientific Centre (FSSI "I.V. Michurin FSC"), All Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Plants (ARRIG&BFP), 8, CGL Street, Michurinsk, Tambov Province, 393770 Russia, Ranenburzhetc@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-9770-8731
Irina V. Luk'yanchuk, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, Laboratory of Particular Plant Genetics and Breeding, I.V. Michurin Federal Scientific Centre (FSSI "I.V. Michurin FSC"), All Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Plants (ARRIG&BFP), 8, CGL Street, Michurinsk, Tambov Province, 393770 Russia; irina.lk2011@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1626-840X

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.
Contribution of the authors: *the authors contributed equally to this article.*
Конфликт интересов: *авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*
Conflict of interests: *the authors declare no conflicts of interests.*
Статья поступила в редакцию 20.07.2023; одобрена после рецензирования 15.08.2023; принята к публикации 08.09.2023.
The article was submitted on 20.07.2023; approved after reviewing on 15.08.2023; accepted for publication on 08.09.2023.