

А. С. Лыжин, И. В. Лукьянчук

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

**АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОТИПОВ ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA L.*)
ПО ГЕНУ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗНОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ *RPF1*
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ
И САДОВОДСТВА ФОРМ**

Аннотация: Фитофторозная корневая гниль (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman) – одно из наиболее опасных заболеваний земляники в умеренном климатическом поясе. Важным этапом успешной селекционной работы по созданию устойчивых к фитофторозному увяданию сортов земляники является идентификация исходных форм, несущих гены устойчивости. Применение диагностических ДНК-маркеров целевых генов повысит надежность идентификации и эффективность селекционного процесса по созданию устойчивых генотипов земляники. Цель настоящего исследования – изучение полиморфизма дикорастущих видов р. *Fragaria L.* и сортов земляники садовой (*F. × ananassa* Duch.) по гену *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили с использованием молекулярных маркеров. Объектами исследования являлись дикорастущие виды *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb., *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* и сорта земляники садовой (*F. × ananassa* Duch.) различного эколого-географического происхождения. Экстракция геномной ДНК земляники проводилась из молодых листьев согласно методу Puchooa. Для оценки аллельного состояния гена *Rpf1* использовали маркеры SCAR-R1A (соответствует доминантному аллелю *Rpf1*) и OPO-16C (соответствует рецессивному аллелю *rpf1*). Маркер SCAR-R1A выявлен у дикорастущего вида *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* (регион произрастания – Британская Колумбия, Канада), сорта земляники ананасной Былинная и перспективных отборных форм 62-41 (Былинная × Фейерверк), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная). Указанные генотипы характеризуются гетерозиготным генотипом по гену *Rpf1* – *Rpf1rpf1* (в генотипе присутствуют оба маркера) и могут использоваться в качестве источников устойчивости к фитофторозной корневой гнили для маркер-опосредованной селекции. У остальных изученных генотипов земляники маркер SCAR-R1A отсутствует, что предположительно свидетельствует об их рецессивном гомозиготном генотипе по гену *Rpf1* (*rpf1rpf1*). Результаты исследований могут быть полезными селекционерам земляники садовой и исследователям биоразнообразия растений р. *Fragaria*.

Ключевые слова: земляника садовая, фитофторозная корневая гниль, гены устойчивости, молекулярные маркеры, ген *Rpf1*

Для цитирования: Лыжин, А. С. Анализ полиморфизма генотипов земляники (*Fragaria L.*) по гену устойчивости к фитофторозной корневой гнили RPF1 для идентификации перспективных для селекции и садоводства форм / А. С. Лыжин, И. В. Лукьянчук // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2020. – Т. 58, №3. – С. 311–320. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320>

Alexander S. Lyzhin, Irina V. Luk'yanchuk

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

**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**

Abstract: Red root spot (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman) is one of the most important strawberry diseases in the temperate climate zone. Identification of forms, carrying resistance genes, is an important stage in breeding programs aimed at obtaining red root spot resistant strawberry varieties. Diagnostic DNA markers of target genes will increase reliability of identification and efficiency of strawberry breeding for the creation of resistant genotypes. The purpose of this study is analysis of polymorphism of wild species of *Fragaria L.* genus and strawberry varieties (*F. × ananassa* Duch.) according to the strawberry red root spot resistance gene *Rpf1* using molecular markers. The research subjects were the wild species *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb., *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* and strawberry varieties (*F. × ananassa* Duch.) of different ecological and geographic origin. Total genomic DNA of strawberry was extracted from the fresh leaves using the Puchooa method. To assess the allelic state of *Rpf1* gene, SCAR-R1A marker (linked to the *Rpf1* dominant allele) and OPO-16C marker (linked to the *rpf1* recessive allele) have been used. SCAR-R1A marker was identified in wild species *F. virginiana* Duch.

ssp. *platypetala* (vegetation region: British Columbia, Canada), pineapple strawberry varieties Bylinnaya and promising selected forms 62-41 (Bylinnaya × Feyerverk), 65-17 and 65-24 (Olimpiyskaya nadezhda × Bylinnaya). These genotypes are characterized by heterozygous *Rpf1rpf1* genotype according to *Rpf1* gene (both markers are present in genotype) and can be used as red root spot resistance source in marker-assisted selection. In the remaining studied genotypes of strawberry, SCAR-R1A marker was not detected, which presumably indicated their homozygous recessive genotype *rpf1rpf1* according to *Rpf1* gene. The research results can be useful for breeders of strawberry and researchers of plant biodiversity of p. *Fragaria*.

Keywords: strawberry, red root spot, resistance genes, molecular markers, *Rpf1* gene

For citation: Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I. V. 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. *Vestsi Natsyyanal'nay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2020, vol. 58, no 3, pp. 311–320 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320>

Введение. Фитофторозная корневая гниль (фитофторозное увядание), возбудителем которого является *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman, – одно из наиболее опасных заболеваний земляники в умеренном климатическом поясе [1, 2]. Во многих странах мира (Европейском союзе, Китае, Российской Федерации, США и др.) *P. fragariae* var. *fragariae* является карантинным патогеном [3, 4].

Возбудитель фитофторозного увядания поражает корневую систему, вызывая отмирание придаточных и боковых питающих корней. Характерный признак поражения корней фитофторозом – покраснение осевого цилиндра. У зараженных *P. fragariae* var. *fragariae* растений наблюдается угнетение ростовых процессов, мелколистность, увядание и впоследствии гибель. При этом своевременная визуальная диагностика патогена затруднена сходством симптомов поражения с воздействием стрессовых факторов абиотической природы, а также активным развитием на ослабленных фитофторозом растениях вторичной грибной или бактериальной инфекции [3, 5]. Распространение возбудителя осуществляется подвижными ооспорами с дренажной или поливной водой, почвенным субстратом, а также зараженным посадочным материалом [4, 6]. Покоящиеся ооспоры патогена способны сохраняться в почве при отсутствии растения-хозяина более 10 лет [7].

До настоящего времени основным способом борьбы с *P. fragariae* var. *fragariae* на посадках земляники является применение химических фунгицидов на основе фениламинов или фосфорорганических соединений. Однако многолетнее применение пестицидов приводит к появлению резистентных штаммов *P. fragariae* var. *fragariae*, усиливает стрессовую нагрузку на ослабленные патогеном растения, загрязняет окружающую среду [8]. Кроме того, широкое применение химических пестицидов противоречит мировой тенденции развития земледелия – его биологизации и экологизации [9–11]. При этом генетически детерминированная экологическая устойчивость сортов и форм растений становится необходимым условием экономически целесообразного возделывания сельскохозяйственных культур, а селекция – наиболее эффективным средством устойчивого роста величины и качества урожая [10].

Необходимым условием совершенствования сортимента земляники садовой является углубление генетических исследований, комплексный анализ исходного материала, выявление закономерностей наследования и идентификация доноров хозяйственно ценных признаков, обуславливающих повышение эффективности селекционного процесса и создание генотипов с высоким уровнем экологической адаптации и товарно-потребительских качеств плодов. При этом скрининг перспективного селекционного материала должен базироваться на комплексной оценке новых форм с использованием потенциала современных методов молекулярной генетики.

Важным этапом успешной селекционной работы по созданию устойчивых к фитофторозному увяданию сортов земляники является идентификация исходных форм, несущих гены устойчивости. Устойчивость земляники к *P. fragariae* var. *fragariae* контролируется моногенно несколькими расоспецифическими олигогенами, которые соответствуют определенным генам авирулентности патогена [12]. В настоящее время основная роль в формировании устойчивости генотипов земляники к фитофторозной корневой гнили отводится трем генам – *Rpf1*, *Rpf2*, *Rpf3* [13].

При этом традиционные методы анализа устойчивости генотипов по ее фенотипическому проявлению предполагают либо многолетнюю оценку в условиях естественного инфекционного фона, что на территории Российской Федерации недопустимо ввиду карантинного статуса патогена, либо искусственным заражением в контролируемых условиях отдельными расами *P. fragariae* var. *fragariae*, что также характеризуется рядом сложностей.

Одним из перспективных методов идентификации устойчивых к фитофторозному увяданию генотипов земляники является анализ с использованием диагностических ДНК-маркеров. Преимуществом использования молекулярных маркеров является возможность непосредственной оценки наличия в геноме генетических констант, не подверженных влиянию условий окружающей среды, а также возможность в случае использования кодоминантных ДНК-маркеров анализа аллельного состояния гена, позволяя тем самым прогнозировать возможность передачи признака гибриднему потомству. Наиболее активно молекулярные маркеры применяются при анализе генетического разнообразия, картировании, видовой и сортовой идентификации генотипов земляники, в меньшей степени молекулярные маркеры используются в селекции [13, 14].

Цель исследования – анализ полиморфизма дикорастущих видов р. *Fragaria* L., сортов и отборных форм земляники ананасной (*F. × ananassa* Duch.) по гену *Rpfl* устойчивости к фитофторозной корневой гнили с использованием молекулярных маркеров для идентификации перспективных для селекции форм.

Материалы и методы исследования. Биологическими объектами исследования являлись видовые формы и сорта генетической коллекции земляники ФГБНУ «ФНЦ им. И. В. Мичурина»: 4 дикорастущих вида р. *Fragaria* L., сорт земляники Купчиха (*F. × anashata* Kantor.), 32 сорта земляники садовой (*F. × ananassa* Duch.), из которых 18 генотипов – российской селекции, 14 – зарубежной) (табл. 1), а также перспективные отборные формы селекции ФГБНУ «ФНЦ им. И. В. Мичурина».

Экстракцию геномной ДНК земляники проводили из молодых листьев согласно протоколу Puchooa [15] с модификациями.

Оценку аллельного состояния гена *Rpfl* устойчивости земляники к фитофторозному увяданию проводили с использованием маркеров SCAR-R1A [16] и OPO-16C [17]. RAPD маркер OPO-16C локализован на расстоянии 3,0 см от гена *Rpfl* и сцеплен с рецессивным аллелем *rpfl*. На электрофореграмме аллелю *rpfl* соответствует целевой продукт маркера OPO-16C размером 438 п.н. [17].

SCAR маркер R1A разработан на основании анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей ампликонов RAPD маркера OPO-16C у устойчивых (форма Md683) и восприимчивых (сорт Senga Sengana) к фитофторозному увяданию генотипов земляники [18]. Маркер SCAR-R1A картирован на расстоянии 3,0 см от гена *Rpfl* и сцеплен с доминантным аллелем гена. На электрофореграмме маркер SCAR-R1A представлен фрагментом размером 285 п.н. У генотипов с рецессивным гомозиготным состоянием гена *Rpfl* (*rpflrpfl*) данный продукт не амплифицируется [16].

Праймеры для молекулярно-генетического анализа были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва) и имели следующую нуклеотидную последовательность:

1) маркер SCAR-R1A – F 5'-TGCATCATTAATGTAGAAGTCTTT-3', R 5'-TGATGCGACATA CA AAAATATTAG-3';

2) маркер OPO-16C – 5'-TCGGCGGTTC-3'

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала:

1) для маркера SCAR-R1A: 20 нг геномной ДНК, 2,0 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого праймера, 0,2 U Taq-полимеразы и 1,5 мМ 10x Taq-буфера (+ (NH₄)₂SO₄, -MgCl₂);

2) для маркера OPO-16C: 100 нг геномной ДНК, 0,8 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ праймера, 0,3 U Taq-полимеразы и 1,0 мМ 10x Taq-буфера (+ (NH₄)₂SO₄, -MgCl₂). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Амплификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы BIO-RAD по следующим программам:

1) маркер SCAR-R1A – денатурация: 94 °C – 3 мин; 25 циклов: 94 °C – 30 с, 60 °C – 45 с, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация: 72 °C – 7 мин;

2) маркер OPO-16C – денатурация: 94 °C – 5 мин; 36 циклов: 94 °C – 30 с, 34 °C – 45 с, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация: 72 °C – 5 мин.

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в агарозном геле (концентрация агарозы – 2 %, буферная система – 1x TBE (трис-боратный буфер), напряженность электрического поля при электрофорезе – 3,9–4,5 В/см). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Т а б л и ц а 1. Анализируемые дикорастущие виды и сорта земляники

T a b l e 1. Analyzed wild species and varieties of strawberry

№	Генотип, сорт	Происхождение / Оригинатор
1	<i>F. orientalis</i> Los.	Приморский край, Россия
2	<i>F. moschata</i> Duch.	Европейская часть России
3	<i>F. ovalis</i> Rydb.	Британская Колумбия, Канада
4	<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i>	Британская Колумбия, Канада
5	Алёна	Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия
6	Витязь	
7	Русич	
8	Соловушка	
9	Зенит	
10	Сударушка	
11	Купчиха	Кокинский опорный пункт Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, Россия
12	Привлекательная	Федеральный научный центр им. И. В. Мичурина, Россия
13	Дивная	Институт агроинженерных и экологических проблем сельскохозяйственного производства, Россия
14	Царскосельская	
15	Фестивальная	Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, Россия
16	Избранница	Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия
17	Былинная	Крымская опытно-селекционная станция Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, Россия
18	Юниол	Ордена трудового красного знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Крым, Россия
19	Карнавал	Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева, Россия
20	Олимпийская надежда	
21	Богема	
22	Незнакомка	Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия
23	Гирлянда	Агрофирма «Поиск», Россия
24	Фестивальная ромашка	Институт садоводства Национальной академии аграрных наук Украины, Украина
25	Troubadour	Великобритания
26	Red Gauntlet	Шотландия
27	Polka	Plant Research International - WUR, Нидерланды
28	Gigantella Maxim	Нидерланды
29	Sonata	
30	Vima Tarda	Vissers International BV, Нидерланды
31	Barlidaun	США
32	Samson	
33	Karmen	Чехия
34	Maryshka	
35	Symphony	Mylnefield Research Services Ltd, Великобритания
36	Elianny	Gebr. Vissers, Нидерланды
37	Tokado	Япония

Результаты и их обсуждение. В изучаемой коллекции земляники маркер ОРО-16С выявлен у дикорастущего вида *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* и 18 из 33 сортов земляники ананасной, что составляет 48,6 % от общего числа проанализированных генотипов. Пример идентификации маркера ОРО-16С в геноплазме земляники представлен на рис. 1.

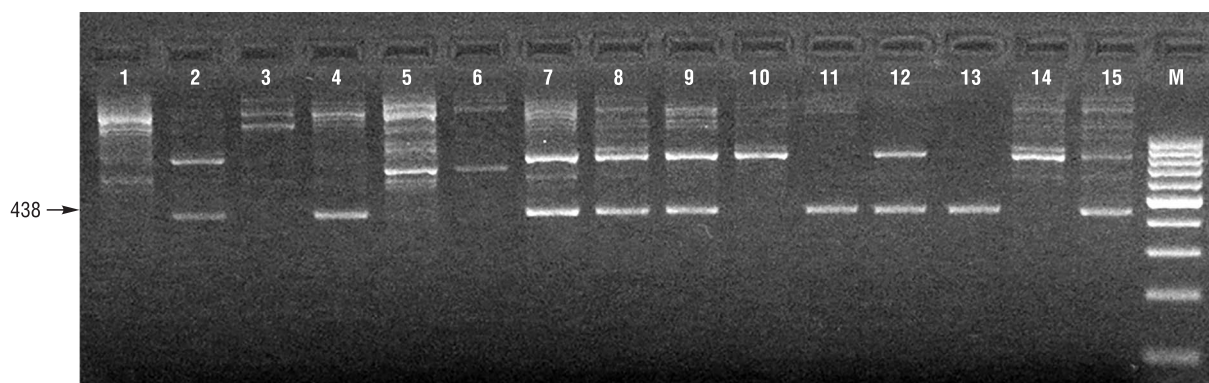


Рис. 1. Электрофоретический профиль маркера OPO-16C генотипов земляники: 1 – Сударушка; 2 – Tokado; 3 – *F. ovalis* Rydb.; 4 – *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*; 5 – *F. moschata* Duch.; 6 – *F. orientalis* Los.; 7 – Царскосельская; 8 – Купчиха; 9 – Привлекательная; 10 – Олимпийская надежда; 11 – Red Gauntlet; 12 – Karmen; 13 – Дивная; 14 – Maryshka; 15 – Samson; M – маркер молекулярного веса

Fig. 1. Electrophoresis profile of marker OPO-16C in strawberry genotypes: 1 – Sudarushka; 2 – Tokado; 3 – *F. ovalis* Rydb.; 4 – *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*; 5 – *F. moschata* Duch.; 6 – *F. orientalis* Los.; 7 – Tsarskoselskaya; 8 – Kupchikha; 9 – Privlekatelnaya; 10 – Olimpiyskaya nadezhda; 11 – Red Gauntlet; 12 – Karmen; 13 – Divnaya; 14 – Maryshka; 15 – Samson; M – Molecular weight marker

При этом из 19 сортов отечественной селекции маркер OPO-16C присутствовал в геноме 8 форм (42,1 %), а из 14 сортов зарубежной селекции – у 10 форм (71,4 %). У дикорастущих видов *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb. и 15 культивируемых сортов целевой продукт маркера OPO-16C размером 438 п.н. отсутствует (табл. 2).

В проведенном ранее скрининге 133 генотипов земляники зарубежной селекции по гену *Rpfl* маркер OPO-16C выявлен у 92 образцов, что составляет 69,2 % от общего количества проанализированных форм [16]. Более широкое распространение маркера OPO-16C в геноплазме зарубежных сортов земляники предположительно объясняется генетической близостью многих сортов вследствие широкого использования в селекции одних и тех же родительских форм (большинство созданных после 1960 г. сортов иностранной селекции получены от скрещивания 7 исходных форм) [19].

Помимо фрагмента размером 438 п.н., маркер OPO-16C был также представлен другими продуктами, из которых наиболее часто встречались фрагменты размером около 850 п.н. (у 77,8 % проанализированных форм) и более 1500 п.н. (у 58,3 % форм). Возможность амплификации у отдельных генотипов земляники дополнительных продуктов маркера OPO-16C подтверждается другими исследователями: Sturzeanu et al. [20] дополнительные фрагменты размером около 600 и более 1500 п.н. выявили у сортов Benton и Mira, в исследовании Gelvonauskienė et al. [21] мономорфный фрагмент размером около 600 п.н. наблюдался у всех изучаемых генотипов.

Маркер SCAR-R1A в анализируемой коллекции земляники выявлен у дикорастущего вида *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* и сорта Былинная. У остальных генотипов земляники (94,4 % проанализированных форм) маркер SCAR-R1A отсутствует (рис. 2, табл. 2).

В исследованиях других авторов также идентифицированы генотипы земляники с маркером SCAR-R1A: по данным W. Njuguna [22] – у 22 из 158, по данным K. M. Naumes et al. [16] – у 24 из 133 сортов и форм р. *Fragaria* L. Полученные нами, а также другими исследователями результаты свидетельствуют о низкой встречаемости гена *Rpfl* в геноплазме культивируемых сортов земляники, в связи с чем для создания форм с генетически детерминированной устойчивостью к фитофторозу необходимо целенаправленное вовлечение в гибридизацию исходных форм – носителей аллеля резистентности *Rpfl*.

Необходимо также отметить, что проведенный нами ранее [23] молекулярно-генетический анализ некоторых сортов и дикорастущих видов р. *Fragaria* L. по гену *Rpfl* показал отсутствие маркера SCAR-R1A у *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*, полученной из Калифорнии (США), что свидетельствует о наличии полиморфизма по локусу резистентности *Rpfl* между эколого-географическими популяциями *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*. Межпопуляционный полиморфизм

Т а б л и ц а 2. Результаты ПЦР-анализа генотипов земляники по маркерам SCAR-R1A и OPO-16C

Table 2. Results of PCR analysis of strawberry genotypes according to SCAR-R1A and OPO-16C markers

№	Генотип, сорт	Маркер SCAR-R1A, 285 п.н.	Маркер OPO-16C, 438 п.н.	Предполагаемый генотип по гену устойчивости <i>Rpfl</i>
1	<i>F. orientalis</i> Los.	–	–	<i>rpflrpfl</i>
2	<i>F. moschata</i> Duch.	–	–	<i>rpflrpfl</i>
3	<i>F. ovalis</i> Rydb.	–	–	<i>rpflrpfl</i>
4	<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i>	+	+	<i>RpflRpfl</i>
5	Алёна	–	+	<i>rpflrpfl</i>
6	Богема	–	–	<i>rpflrpfl</i>
7	Былинная	+	–	<i>RpflRpfl</i>
8	Витязь	–	–	<i>rpflrpfl</i>
9	Гирлянда	–	–	<i>rpflrpfl</i>
10	Дивная	–	+	<i>rpflrpfl</i>
11	Зенит	–	+	<i>rpflrpfl</i>
12	Избранница	–	–	<i>rpflrpfl</i>
13	Карнавал	–	–	<i>rpflrpfl</i>
14	Купчиха	–	+	<i>rpflrpfl</i>
15	Незнакомка	–	+	<i>rpflrpfl</i>
16	Олимпийская надежда	–	–	<i>rpflrpfl</i>
17	Привлекательная	–	+	<i>rpflrpfl</i>
18	Русич	–	–	<i>rpflrpfl</i>
19	Соловушка	–	–	<i>rpflrpfl</i>
20	Сударушка	–	–	<i>rpflrpfl</i>
21	Фестивальная	–	+	<i>rpflrpfl</i>
22	Царскосельская	–	+	<i>rpflrpfl</i>
23	Юниол	–	–	<i>rpflrpfl</i>
24	Фестивальная ромашка	–	–	<i>rpflrpfl</i>
25	Barlidaun	–	–	<i>rpflrpfl</i>
26	Elianny	–	+	<i>rpflrpfl</i>
27	Gigantella Maxim	–	+	<i>rpflrpfl</i>
28	Karmen	–	+	<i>rpflrpfl</i>
29	Maryshka	–	–	<i>rpflrpfl</i>
30	Polka	–	+	<i>rpflrpfl</i>
31	Samson	–	+	<i>rpflrpfl</i>
32	Sonata	–	+	<i>rpflrpfl</i>
33	Symphony	–	–	<i>rpflrpfl</i>
34	Tokado	–	+	<i>rpflrpfl</i>
35	Troubadour	–	+	<i>rpflrpfl</i>
36	Red Gauntlet	–	+	<i>rpflrpfl</i>
37	Vima Tarda	–	+	<i>rpflrpfl</i>

П р и м е ч а н и е. Знак «+» обозначает присутствие маркера, знак «–» – отсутствие.

дикорастущих видов р. *Fragaria* L. по генам устойчивости к патогенам подтверждается также другими исследователями [22].

Наличие у генотипа маркера SCAR-R1A при отсутствии маркера OPO-16C свидетельствует о доминантном гомозиготном состоянии гена *Rpfl* (*RpflRpfl*), присутствие обоих маркеров соответствует гетерозиготному генотипу – *Rpflrpfl*, наличие маркера OPO-16C при отсутствии маркера SCAR-R1A, а также отсутствие обоих маркеров свидетельствует о рецессивном гомозиготном генотипе по гену *Rpfl* – *rpflrpfl* [24].

В анализируемой коллекции земляники форм с доминантным гомозиготным состоянием гена *Rpfl* – *RpflRpfl* не выявлено. Гетерозиготный генотип (*Rpflrpfl*) идентифицирован у дикорастущего вида *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* и сорта земляники ананасной Былинная (в генотипе присутствуют оба маркера).

Соответствие уровня ploидности подвидов *F. virginiana* Duch. и культивируемых сортов (8x) позволяет путем прямых скрещиваний проводить интрогрессию целевых аллелей генов дикорастущих форм в геноплазму культивируемых форм земляники для создания на этой основе новых генотипов. Необходимо также отметить, что согласно данным проведенного молекулярно-генетического анализа маркер SCAR-R1A отсутствует у отборных форм 933-4 (*F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* × Рубиновый кулон) и 932-29 (*F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala* × Фейерверк) (табл. 3), что подтверждает гетерозиготное состояние гена *Rpfl* у *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*.

Сорт Былинная выделен в комбинации скрещивания Персиковая × Сеянец ВИР-228613, и для родительских форм сведения о наличии или отсутствии гена *Rpfl* отсутствуют. Однако проведенный по маркеру SCAR-R1A анализ некоторых перспективных отборных форм земляники, полученных с участием сорта Былинная, выявил генотипы, как унаследовавшие аллель резистентности *Rpfl*, так и характеризующиеся рецессивным гомозиготным состоянием гена *Rpfl* – *rpflrpfl* (табл. 3). Полученные результаты подтверждают данные молекулярно-генетического анализа о гетерозиготном состоянии гена *Rpfl* (*Rpflrpfl*) у исходной родительской формы – сорта Былинная.

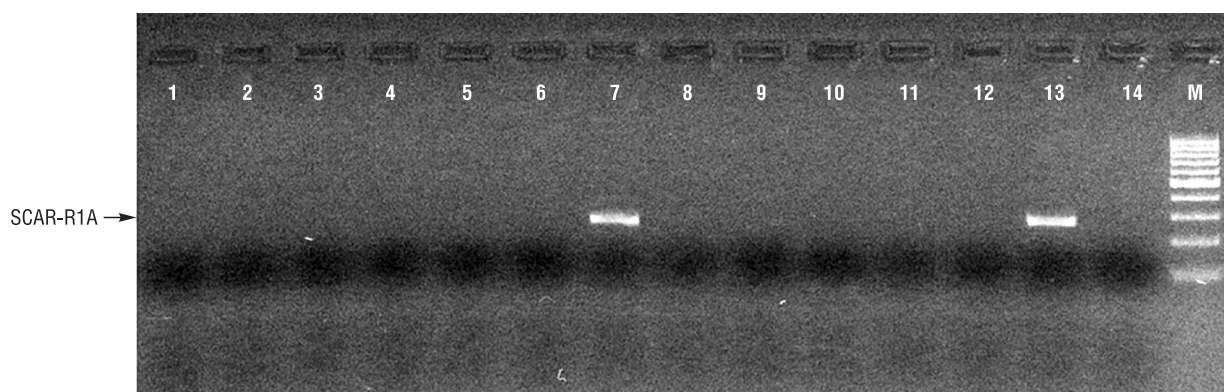


Рис. 2. Электрофоретический профиль маркера SCAR-R1A генотипов земляники: 1 – Maryshka; 2 – Symphony; 3 – Незнакомка; 4 – Zenit; 5 – Sonata; 6 – Karmen; 7 – Былинная; 8 – Samson; 9 – Troubadour; 10 – Сударушка; 11 – Tokado; 12 – *F. ovalis* Rydb.; 13 – *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*; 14 – *F. moschata* Duch.; М – маркер молекулярного веса

Fig. 2. Electrophoresis profile of marker SCAR-R1A in strawberry genotypes: 1 – Maryshka; 2 – Symphony; 3 – Neznakomka; 4 – Zenit; 5 – Sonata; 6 – Karmen; 7 – Bylinnaya; 8 – Samson; 9 – Troubadour; 10 – Sudarushka; 11 – Tokado; 12 – *F. ovalis* Rydb.; 13 – *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*; 14 – *F. moschata* Duch.; M – Molecular weight marker

Т а б л и ц а 3. Результаты ПЦР-анализа отборных форм земляники по маркерам SCAR-R1A и OPO-16C
T a b l e 3. Results of PCR analysis of strawberry selected forms according to SCAR-R1A and OPO-16C markers

№	Генотип	Происхождение	Маркер SCAR-R1A, 285 п.н.	Маркер OPO-16C, 438 п.н.	Предполагаемый генотип по гену устойчивости <i>Rpfl</i>
1	933-4	<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i> (<i>RpflRpfl</i>) × Рубиновый кулон (<i>rpflrpfl</i>)	–	+	<i>rpflrpfl</i>
2	932-29	<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i> (<i>RpflRpfl</i>) × Фейерверк (<i>rpflrpfl</i>)	–	+	<i>rpflrpfl</i>
3	62-7	Былинная (<i>RpflRpfl</i>) × Фейерверк (<i>rpflrpfl</i>)	–	+	<i>rpflrpfl</i>
4	62-23	Олимпийская надежда (<i>rpflrpfl</i>) × Былинная (<i>RpflRpfl</i>)	–	–	<i>rpflrpfl</i>
5	62-41		+	+	<i>RpflRpfl</i>
6	65-2		–	–	<i>rpflrpfl</i>
7	65-15	Олимпийская надежда (<i>rpflrpfl</i>) × Былинная (<i>RpflRpfl</i>)	–	–	<i>rpflrpfl</i>
8	65-17		+	+	<i>RpflRpfl</i>
9	65-24		+	+	<i>RpflRpfl</i>

П р и м е ч а н и е. Знак «+» обозначает присутствие маркера, знак «–» – отсутствие.

Отборные гибриды 62-41 (Былинная × Фейерверк), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная) являются перспективными исходными формами для вовлечения в гибридизацию в рамках совершенствования сортимента земляники, так как наряду с генетически детерминированной устойчивостью к фитофторозной корневой гнили (генотип *RpflRpfl*) характеризуются высоким уровнем адаптации к абиотическим (неблагоприятные факторы осенне-зимнего периода, высокие температуры и недостаток влаги в период вегетации) и биотическим стрессорам (мучнистая роса, белая и бурая пятнистости листьев), высокой продуктивностью, ценными товарно-потребительскими качествами и улучшенным биохимическим составом плодов.

Сорта Алёна, Фестивальная, Дивная, Купчиха, Незнакомка, Zenit, Царскосельская, Привлекательная, Gigantella Maxim, Polka, Elianny, Sonata, Karmen, Samson, Troubadour, Tokado характеризуются рецессивным гомозиготным генотипом – *rpflrpfl* (маркер OPO-16C присутствует, маркер SCAR-R1A отсутствует). У дикорастущих видов *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb. и сортов Карнавал, Богема, Гирлянда, Олимпийская надежда, Избранница, Юниол, Сударушка, Фестивальная ромашка, Русич, Витязь, Соловушка, Barlidaun, Maryshka, Symphony изучаемые маркеры в генотипе отсутствуют (предполагаемый генотип по гену резистентности – *rpflrpfl*).

Выводы

1. Маркер ОРО-16С (соответствует рецессивному аллелю *rpfl*) в изучаемой коллекции земляники выявлен у 48,6 % форм. При этом среди сортов отечественной селекции маркер ОРО-16С присутствовал у 47,4 % форм, а среди сортов зарубежной селекции – у 71,4 % форм.

2. Маркер SCAR-R1A (соответствует доминантному аллелю *Rpfl*) идентифицирован у 5,6 % проанализированных форм. У остальных генотипов земляники маркер SCAR-R1A отсутствует.

3. Устойчивостью к фитофторозной корневой гнили по результатам молекулярно-генетического анализа аллельного состояния гена *Rpfl* характеризуются дикорастущий вид *F. virginiana* Duch. ssp. *platyptetala* (регион произрастания – Британская Колумбия, Канада), сорт земляники ананасной Былинная, перспективные отборные формы 62-41 (Былинная × Фейерверк), 65-17, 65-24 (Олимпийская надежда × Былинная) (предполагаемый генотип *Rpflrpfl*), что позволяет рекомендовать их для маркер-опосредованной селекции в качестве перспективных источников резистентности к *P. fragariae* var. *fragariae*.

Результаты исследований представляют интерес в области молекулярно-генетического анализа генома, изучения биоразнообразия растений р. *Fragaria*, а также селекции земляники на устойчивость к патогенам.

Список использованных источников

1. A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real-time quantitative fluorescence, for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants / P.J. M. Bonants [et al.] // *Europ. J. of Plant Pathology*. – 2004. – Vol. 110, № 7. – P. 689–702. <https://doi.org/10.1023/b:ejpp.0000041551.26970.0e>
2. Screening of strawberries with the red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance gene *Rpfl* using sequence specific DNA markers / A. Sasnauskas [et al.] // *Acta Horticulturae*. – 2007. – № 760. – P. 165–169. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.760.21>
3. Фитофтороз земляники / И. Н. Александров [и др.] // *Защита и карантин растений*. – 2007. – № 5. – С. 32–34.
4. Genome sequence of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, a quarantine plant-pathogenic fungus / R. Gao [et al.] // *Genome Announcements*. – 2015. – Vol. 3, № 2. – P. e00034–15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00034-15>
5. *De los Santos, B.* Strawberry fungal diseases / B. De los Santos, C. Barrau, F. Romero // *Crop management and postharvest handling of horticultural products* / ed.: R. Dris, R. Niskanen, S. M. Jain. – Enfield, 2004. – Vol. 4 : Diseases and disorders of fruits and vegetables. – P. 233–268.
6. *Szkuta, G.* Czerwona zgnilizana korzeni truskawki / G. Szkuta // *Ochrona Roślin*. – 2006. – Vol. 51, № 1. – P. 17–21.
7. Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil / A. C. Newton [et al.] // *Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 59, № 3. – P. 472–479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02273.x>
8. *Anandhakumar, J.* Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria / J. Anandhakumar, W. Zeller // *J. of Plant Diseases a. Protection*. – 2008. – Vol. 115, № 2. – P. 49–56. <https://doi.org/10.1007/BF03356238>
9. *Palmer, C.* «Greening» agriculture in the developing world / C. Palmer // *Rural 21*. – 2008. – Vol. 42, № 3. – P. 30–32.
10. *Жученко, А. А.* Биологизация и экологизация интенсификационных процессов в сельском хозяйстве / А. А. Жученко // *Вестн. ОрелГАУ*. – 2009. – № 3. – С. 8–12.
11. *Gorgitano, M. T.* Life cycle economic and environmental assessment for a greening agriculture / M. T. Gorgitano, M. Pirilli // *Quality – Access to Success*. – 2016. – Vol. 17, suppl. 1. – P. 181–185.
12. *Van de Weg, W. E.* A gene-for-gene model to explain interactions between cultivars of strawberry and races of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* / W. E. Van de Weg // *Theoretical a. Appl. Genetics*. – 1997. – Vol. 94, № 3–4. – P. 445–451. <https://doi.org/10.1007/s001220050435>
13. *Whitaker, V. M.* Applications of molecular markers in strawberry / V. M. Whitaker // *J. of Berry Research*. – 2011. – Vol. 1, № 3. – P. 115–127. <https://doi.org/10.3233/BR-2011-013>
14. Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops / E. Dirlewanger [et al.] // *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of the USA*. – 2004. – Vol. 101, № 26. – P. 9891–9896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307937101>
15. *Puchooa, D.* Simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) / D. Puchooa // *Afr. J. of Biotechnology*. – 2004. – Vol. 3, № 4. – P. 253–255. <https://doi.org/10.5897/ajb2004.000-2046>
16. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes / K. M. Haymes [et al.] // *J. of the Amer. Soc. for Horticultural Science*. – 2000. – Vol. 125, № 3. – P. 330–339. <https://doi.org/10.21273/jashs.125.3.330>
17. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpfl*) in the cultivated strawberry / K. M. Haymes [et al.] // *Theoretical a. Appl. Genetics*. – 1997. – Vol. 94, № 8. – P. 1097–1101. <https://doi.org/10.1007/s001220050521>

18. Haymes, K. M. Development of a SCAR marker for the *Phytophthora fragariae* resistance gene *Rpfl* in the commercial strawberry (*Fragaria × ananassa*) / K. M. Haymes, P. Arens, B. Vosman // Molecular genetic studies in *Fragaria* species: agrobacterium-mediated transformation and fine mapping of the *Phytophthora fragariae* resistance gene *Rpfl* : Ph.D. Thesis / K. M. Haymes. – Wageningen, 1997. – P. 47–58.
19. Studies on the interspecific hybridization in the genus *Fragaria* / J. Lei [et al.] // Acta Horticulturae Sinica. – 2002. – Vol. 29, №6. – P. 519–523. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0513-353X.2002.06.004>
20. Molecular characterization of allelic status of the *Rpfl* and *Rca2* genes in six cultivars of strawberries / M. Sturzeanu [et al.] // Acta Horticulturae. – 2016. – №1139. – P. 107–112. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2016.1139.19>
21. Screening of apple and strawberry plants carrying fungal disease resistance oligogenes using molecular markers / D. Gelvonauskienė [et al.] // Zemdirbyste. – 2007. – Vol. 94, №4. – P. 139-145.
22. Njuguna, W. Development and use of molecular tools in *Fragaria* : Ph.D. Thesis / W. Njuguna. – Oregon State University, 2010. – 370 p.f
23. Лукьянчук, И. В. Анализ генетической коллекции земляники (*Fragaria* L.) по генам *Rca2* и *Rpfl* с использованием молекулярных маркеров / И. В. Лукьянчук, А. С. Лыжин, И. И. Козлова // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2018. – Т. 22, №7. – С. 795–799. <https://doi.org/10.18699/VJ18.423>
24. Conservation of linkage of RAPD and SCAR markers to the *Rpfl* resistance gene for *Phytophthora fragariae* in strawberry / K. M. Haymes [et al.] // Molecular genetic studies in *Fragaria* species: agrobacterium-mediated transformation and fine mapping of the *Phytophthora fragariae* resistance gene *Rpfl* : Ph.D. Thesis / K. M. Haymes. – Wageningen, 1997. – P. 65–82.

References

1. Bonants P. J. M., Van Gent-Pelzer M. P. E., Hooftman R., Cooke D. E. L., Guy D. C., Duncan J. M. A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real-time quantitative fluorescence, for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, vol. 110, no. 7, p. 689-702. <https://doi.org/10.1023/b:ejpp.0000041551.26970.0e>
2. Sasnauskas A., Rugienius R., Gelvonauskienė D., Zalunskaitė I., Staniene G., Siksnianas T., Stanys V., Bobinas C. Screening of strawberries with the red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance gene *Rpfl* using sequence specific DNA markers. *Acta Horticulturae*, 2007, no. 760, pp. 165-169. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.760.21>
3. Aleksandrov I. N., Skripka O. V., Dudchenko I. P., Surina T. A., Nikiforov S. V. Red stele root rot of strawberry. *Zashchita i karantin rastenii* [Plant Protection and Quarantine], 2007, no. 5, pp. 32-34 (in Russian).
4. 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, no. 2, p. e00034-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00034-15>
5. De los Santos B., Barrau C., Romero F. Strawberry fungal diseases. *Crop management and postharvest handling of horticultural products. Vol. 4. Diseases and disorders of fruits and vegetables*. Enfield, 2004, pp. 233-268.
6. Szkuta G. *Czerwona zgnilizana korzeni truskawki* [Red core of strawberry]. *Ochrona Roślin* [Plant Protection], 2006, vol. 51, no. 1, pp. 17-21 (in Polish).
7. Newton A. C., Duncan J. M., Augustin N. H., Guy D. C., Cooke D. E. L. Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil. *Plant Pathology*, 2010, vol. 59, no. 3, pp. 472-479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02273.x>
8. Anandhakumar J., Zeller W. Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2008, vol. 115, no. 2, pp. 49-56. <https://doi.org/10.1007/BF03356238>
9. Palmer C. «Greening» agriculture in the developing world. *Rural 21*, 2008, vol. 42, no. 3, pp. 30-32.
10. Zhuchenko A. A. Biologization and greening of intensification processes in agriculture. *Vestnik OrelGAU*, 2009, no. 3, pp. 8-12 (in Russian).
11. Gorgitano M. T., Pirilli M. Life cycle economic and environmental assessment for a greening agriculture. *Quality – Access to Success*, 2016, vol. 17, suppl. 1, pp. 181-185.
12. 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, no. 3-4, pp. 445-451. <https://doi.org/10.1007/s001220050435>
13. Whitaker V. M. Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research*, 2011, vol. 1, no. 3, pp. 115-127. <https://doi.org/10.3233/br-2011-013>
14. Dirlwanger E., Graziano E., Joobeur T., Garriga-Caldere F., Cosson P., Howad W., Arus P. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, vol. 101, no. 26, pp. 9891-9896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307937101>
15. Puchooa D. Simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, no. 4, pp. 253-255. <https://doi.org/10.5897/ajb2004.000-2046>
16. 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, vol. 125, no. 3, pp. 330-339. <https://doi.org/10.21273/jashs.125.3.330>

17. Haymes K. M., Henken B., Davis T. M., Van de Weg W. E. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpfl) in the cultivated strawberry. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, vol. 94, no. 8, pp. 1097-1101. <https://doi.org/10.1007/s001220050521>

18. Haymes K. M., Arens P., Vosman B. Development of a SCAR marker for the *Phytophthora fragariae* resistance gene Rpfl in the commercial strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Molecular genetic studies in Fragaria species: agrobacterium-mediated transformation and fine mapping of the Phytophthora fragariae resistance gene Rpfl*. Ph.D. Thesis. Wageningen, 1997, pp. 47-58.

19. Lei J., Dai H., Deng M., Wu L., Hu W. 草莓种间杂交的研究 [Studies on the interspecific hybridization in the genus *Fragaria*]. *园艺学报* = *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, vol. 29, no. 6, pp. 519-523 (in Chinese). <https://doi.org/10.3321/j.issn:0513-353X.2002.06.004>

20. Sturzeanu M., Coman M., Ciuca M., Ancu I., Cristina D., Turcu A. G. Molecular characterization of allelic status of the Rpfl and Rca2 genes in six cultivars of strawberries. *Acta Horticulturae*, 2016, no. 1139, pp. 107-112. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2016.1139.19>

21. Gelvonauskienė D., Rugienius R., Šikšnianas T., Staniėnė G., Sasnauskas A., Stanys V. Screening of apple and strawberry plants carrying fungal disease resistance oligogenes using molecular markers. *Zemdirbyste = Agriculture*. – 2007. – Vol. 94, №4. – P. 139-145.

22. Njuguna W. *Development and use of molecular tools in Fragaria*. Ph.D. Thesis. Oregon State University, 2010. 370 p.

23. Luk'yanchuk I. V., Lyzhin A. S., Kozlova I. I. Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria* L.) for Rca2 and Rpfl genes with molecular markers. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2018, vol. 22, no. 7, pp. 795-799. <https://doi.org/10.18699/VJ18.423>

24. Conservation of linkage of RAPD and SCAR markers to the Rpfl resistance gene for *Phytophthora fragariae* in strawberry. *Molecular genetic studies in Fragaria species: agrobacterium-mediated transformation and fine mapping of the Phytophthora fragariae resistance gene Rpfl*. Ph.D. Thesis. Wageningen, 1997, pp. 65-82.

Информация об авторах

Лыжин Александр Сергеевич – кандидат с.-х. наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» (ул. Мичурина, 30, 393774 Мичуринск, Тамбовская область, Россия). E-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru. orcid: 0000-0001-9770-8731

Лукьянчук Ирина Васильевна – кандидат с.-х. наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» (ул. Мичурина, 30, 393774 Мичуринск, Тамбовская область, Россия). E-mail: irina.lk2011@yandex.ru. orcid: 0000-0003-1626-840X

Information about the author

Alexander S. Lyzhin – Ph.D. (Agriculture). I.V. Michurin Federal Science Center (30 Michurina Str., 393774 Michurinsk, Tambov region, Russia). E-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru. orcid: 0000-0001-9770-8731

Irina V. Luk'yanchuk – Ph.D. (Agriculture). I.V. Michurin Federal Science Center (30 Michurina Str., 393774 Michurinsk, Tambov region, Russia). E-mail: irina.lk2011@yandex.ru. orcid: 0000-0003-1626-840X