УДК 634.75:577.2:632.4
EDN KIDKRQ

Лыжин А. С., Лукъянчук И. В.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СКРИНИНГ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОТБОРНЫХ ФОРМ ЗЕМЛЯНИКИ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ (ГЕН *RCA2*)

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

Реферат. *Антракнозная черная гниль (антракноз), возбудителем которой являются фитопатогены видового комплекса Colletotrichum acutatum – опасное грибное заболевание сортов земляники садовой. Выявление форм с генетической устойчивостью к антракнозу является важной стратегией борьбы с распространением C. acutatum в насаждениях земляники. Цель работы – молекулярно-генетический анализ отборных и элитных форм земляники по гену Rca2 для идентификации генотипов, устойчивых к C. acutatum второй группы патогенности. Исследования проведены в 2021–2022 гг. В качестве биологических объектов использованы перспективные отборные и элитные сеянцы земляники садовой (Fragaria × ananassa Duch.), созданные в «Федеральном научном центре имени И.В. Мичурина» с использованием методов интрогрессивной и межсортовой гибридизации. Идентификацию гена Rca2 проводили методом ДНК-анализа с использованием диагностического маркера STS-Rca2_240. В качестве контроля протекания полимеразной цепной реакции использовали SSR маркер EMFv020. В результате проведённых исследований уточнена генотипическая структура исходных форм земляники по гену Rca2 устойчивости к антракнозной чёрной гнили: сорта Рубиновый кулон и Roxana характеризуются гетерозиготным генотипом по гену Rca2. Идентифицированы отборные гибридные сеянцы земляники – носители аллеля резистентности Rca2 (предполагаемый генотип Rca2rca2): 9/1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32 и 9/1-37 (Vicoda × Roxana). Указанные формы являются перспективным исходным материалом для вовлечения в селекцию на устойчивость к антракнозной черной гнили, вызываемомой фитопатогенным грибом C. acutatum.В гибридных комбинациях Vima Zanta × Polka, Привлекательная × Polka, Фейерверк × Фестивальная Ромашка, Vima Zanta × Привлекательная, 298-19-9-43 × Привлекательная, Polka × Vima Zanta, Урожайная ЦГЛ × Рубиновый кулон, 922-67 × Maryshka, Kimberly × 9/2-2, Asia × Maya, Gigantella Maxim × Привлекательная, Kimberly × Honeoye отборных форм земляники с геном Rca2 выделено не было.*

Ключевые слова: *земляника садовая (Fragaria × ananassa Duch.), генотип, антракноз, устойчивость, молекулярные маркеры.*

Для цитирования: *Лыжин А. С., Лукъянчук И. В. Молекулярный скрининг перспективных отборных форм земляники по устойчивости к антракнозу (ген Rca2) // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 2(30). С. 66–73. EDN: KIDKRQ.*

For citation: *Lyzhin A. S., Luk'yanchuk I. V. Molecular screening of promising strawberry selected forms by anthracnose resistance (Rca2 gene) // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2022. No. 2(30). P. 66–73. EDN: KIDKRQ.*

Введение

Антракнозная чёрная гниль (антракноз) – одно из наиболее опасных заболеваний земляники. Возбудителями антракноза являются фитопатогенные грибы рода *Colletotrichum*: *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. &Sacc., *C. fragariae* A.N. Brooks. (*C. theobromicola*). В умеренном климатическом поясе наибольший вред наносит видовой комплекс *C. acutatum* в настоящее время насчитывающий, по разным данным, от 31 до 36 морфологически

сходных видов [1, 2]. Во многих странах мира, в том числе и в России, видовой комплекс *C. acutatum* относится к карантинным патогенам [3, 4].

Фитопатогенные грибы видового комплекса *C. acutatum* – полифаги. Они поражают широкий спектр растений, в том числе плодовые, ягодные, бобовые, овощные и другие культуры. Однако наибольший экономический ущерб патоген наносит насаждениям земляники садовой [5], в которых при эпифитотийном развитии антракноза может погибнуть до 80 % маточных растений, а потери товарного урожая превысить 50 % [6, 7].

Успешность борьбы с распространением *C. acutatum* в насаждениях земляники в настоящее время в первую очередь зависит от частоты и эффективности применения химических средств защиты. Наиболее активно используются фунгициды стробилуринового ряда – азоксистробин, пираклостробин и др. Однако широкое применение стробилуринов привело к повышению устойчивости многих фитопатогенных грибов, в частности высокорезистентные штаммы выявлены у ряда видов рода *Colletotrichum*: *C. cereale, C. gloeosporioides, C. graminicola* [8, 9]. Поэтому важной стратегией борьбы с антракнозом является генетическая устойчивость культивируемых растений [10, 11].

Устойчивость земляники к антракнозу является сложным признаком благодаря высокому уровню плоидности (8x) культивируемых сортов и может формироваться под влиянием полигенных эффектов (крупные QTL), а также моногенно [12–14]. В частности, одним из факторов моногенной устойчивости земляники к антракнозу является ген *Rca2*, детерминирующий устойчивость к изолятам *C. acutatum,* и относящийся, согласно классификации французских учёных [15] ко второй группе патогенности. Последующая разработка сцепленных с указанным геном информативных ДНК-маркеров позволяет проводить оценку устойчивости сортов и форм земляники не по фенотипическому проявлению признака, а непосредственно по наличию генетических детерминант, что позволяет ускорить идентификацию ценных генотипов и избежать сложностей работы с карантинными патогенами [16].

Цель исследований – молекулярно-генетический анализ отборных и элитных форм земляники по гену *Rca2* для идентификации генотипов, устойчивых к *C. acutatum* второй группы патогенности.

Материалы и методы исследований

Исследования проведены в 2021–2022 гг. В качестве биологических объектов использованы перспективные отборные и элитные сеянцы земляники садовой *(Fragaria* × *ananassa* Duch.), созданные в «Федеральном научном центре имени И.В. Мичурина» с использованием методов интрогрессивной и межсортовой гибридизации.

Экстракцию тотальной ДНК земляники осуществляли согласно модифицированному протоколу Diversity Arrays Technology P/L [17].

Идентификацию гена *Rca2* проводили методом ДНК-анализа с использованием диагностического маркера STS-Rca2_240. Для контроля протекания ПЦР и исключения ложноотрицательных результатов маркер STS-Rca2_240 мультиплексировался с маркером EMFv020 (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика использованных в работе праймеров

Маркер	Нуклеотидная последовательность праймеров 5’-3’	Размер ампликонов, п.н.	Источник
STS-Rca2_240	ForGCCACGTCACTAGTCAAATTCAA	240	Lerceteau-Kohler etal, 2005 [16]
	RevTCATGGACAGTGGTCTCAGC		
EMFv020	ForCAGGCGCCAACGGCGTGCTCTTGT	≈180	
	RevCAGCGCCGCCAGCTCATCCCTAGG		

В качестве контрольного сорта-носителя аллеля устойчивости *Rca2* был использован сорт Элианни (Elianny), полученный в Нидерландах и характеризующийся, согласно проведённым ранее исследованиям [18, 19], гетерозиготным состоянием гена *Rca2*.

Смесь для ПЦР, общим объёмом 15 мкл, содержала 1,5 мМTaq-буфера, 2,0 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2,5 мМ хлоридамагния, 0,8 UTaq-полимеразы, 0,2 мкМ каждого праймера и 20 нг геномной ДНК. Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере T100 (BIO-RAD) по программе: начальная денатурация 3 мин при 95 °С; далее 35 циклов: 50 с при 95 °С, 50 с – при 64 °С, 60 с – при 72 °С; далее финальная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в агарозном геле (концентрация агарозы – 2 %, буферная система – 1х TBE). Определение размера ампликонов проводили с использованием DNA Ladder GeneRuler 100 bp (ThermoFisherScientific).

Результаты и их обсуждение

В анализируемой коллекции отборных и элитных форм земляники маркер STS-Rca2_240 выявлен у гибридов 9/1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32, 9/1-37, выделенных в комбинации скрещивания Vicoda × Roxana (рисунок 1, таблица 2).

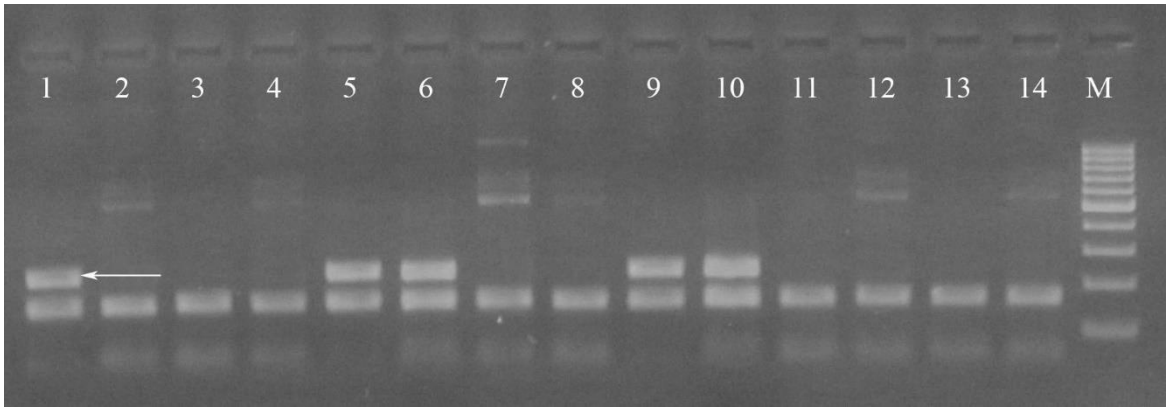

Рисунок 1 – Электрофоретический профиль маркерных фрагментов гена *Rca2*у отборных и элитных форм земляники

Примечание. *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, М – маркер молекулярного веса ДНК.*

Таблица 2 – Аллельный полиморфизм гена *Rca2* у отборных и элитных форм земляники

Генотип	Происхождение	Маркер STS-Rca2_240, 240 п.н.	Маркер EMFv020, 180 п.н.
1	2	3	4
1/6-41	Vima Zanta ×Polka	0	1
2/2-8	Привлекательная × Polka	0	1
911-16	Фейерверк × Фестивальная Ромашка	0	1
3/2-3	Vima Zanta × Привлекательная	0	1
3/2-62		0	1
928-12	298-19-9-43 × Привлекательная	0	1
5/1-105	Polka × Vima Zanta	0	1
6/1-47		0	1

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
21-14	Урожайная ЦГЛ × Рубиновый кулон	0	1
35-1	922-67 × Maryshka	0	1
35-5		0	1
35-16		0	1
6/3-5		0	1
6/3-6	Kimberly × 9/2-2	0	1
6/3-10		0	1
6/3-16		0	1
6/3-21		0	1
6/3-22		0	1
7/1-3		0	1
7/1-4		0	1
7/1-8		0	1
7/2-16	Asia × Maya	0	1
7/2-17		0	1
7/2-48		0	1
7/2-78		0	1
7/2-79		0	1
7/2-93		0	1
56-17	Gigantella Maxim × Привлекательная	0	1
56-19		0	1
8/2-41	Vicoda × Roxana	0	1
8/2-48		0	1
8/2-49		0	1
8/2-55		0	1
8/2-69		0	1
8/2-102		0	1
8/2-109		0	1
8/2-112		0	1
9/1-11		1	1
9/1-12		1	1
9/1-13		1	1
9/1-32		1	1
9/1-37		1	1
9/2-2	Kimberly ×Honeoye	0	1
9/2-7		0	1
9/2-10		0	1
9/2-41		0	1

В данной комбинации скрещивания источником аллеля резистентности *Rca2* для гибридных сеянцев является сорт Roxana, который, согласно проведённым нами ранее исследованиям [18], характеризуется доминантным гомозиготным (*Rca2Rca2*) или гетерозиготным (*Rca2rca2*) генотипом. Наличие маркера STS-Rca2_240 у сорта Roxana подтверждается также работами других авторов [20].

Необходимо отметить, что вместе с сеянцами с идентифицированным маркером STS-Rca2_240 (отборные формы 9/1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32, 9/1-37), в гибридной комбинации Vicoda × Roxana также идентифицированы сеянцы (8/2-41, 8/2-48, 8/2-49, 8/2-55, 8/2-69, 8/2-102, 8/2-109, 8/2-112), не имеющие в генотипе маркер STS-Rca2_240 (предполагаемый генотип по гену *Rca2– rca2rca2*). Полученные результаты свидетельствуют о гетерозиготном состоянии гена *Rca2* у исходного родительского сорта Roxana, так как в случае гомозиготного состояния гена (*Rca2Rca2*) все гибридные сеянцы должны были характеризоваться наличием аллеля резистентности *Rca2*.

В комбинациях скрещивания Vima Zanta × Polka, Привлекательная × Polka, Фейерверк × Фестивальная Ромашка, Vima Zanta × Привлекательная, 298-19-9-43 × Привлекательная, Polka × Vima Zanta, Урожайная ЦГЛ × Рубиновый кулон, 922-67 × Maryshka, Kimberly × 9/2-2, Asia × Maya, Gigantella Maxim × Привлекательная, Kimberly × Honeoye отборных форм земляники с геном *Rca2* выделено не было. Полученные результаты также подтверждают результаты молекулярно-генетического анализа [18, 21, 22], не выявившего у сортов Привлекательная, Урожайная ЦГЛ, Фейерверк, Фестивальная Ромашка, Gigantella Maxim, Honeoye, Kimberly, Maryshka, Polka, Vima Zanta и гибридной формы 298-19-9-43 маркер STS-Rca2_240. Для исходных форм Рубиновый кулон, Asia, Maya, 922-67, 9/2-2 данные об аллельном состоянии гена *Rca2* отсутствуют, что требует проведения дополнительных исследований. При этом необходимо отметить, что в проведённых нами ранее исследованиях [22], маркер STS-Rca2_240 был выявлен у отборного сеянца 933-4, полученного в результате скрещивания дикорастущего вида *F. Virginiana* subsp. *platypetala* (Rydb.) Staudt (ген *Rca2* отсутствует) с сортом земляники садовой Рубиновый кулон. Поэтому указанный сорт предположительно может иметь гетерозиготный генотип (*Rca2rca2*) и представлять интерес для селекции на устойчивость к антракнозной чёрной гнили.

Выводы

Установлено, что исходные формы земляники – сорта Рубиновый кулон и Roxana характеризуются гетерозиготным генотипом по гену *Rca2* устойчивости к антракнозной чёрной гнили. Идентифицированы отборные сеянцы земляники – носители аллеля резистентности *Rca2* (предполагаемый генотип *Rca2rca2*): 9/1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32 и 9/1-37 (Vicoda × Roxana), перспективные для вовлечения в селекцию на устойчивость к антракнозу, вызываемому фитопатогенным грибом *C. acutatum*.

Литература

1. Miller-Butler M. A., Smith B. J., Babiker E. M., Kreiser B. R., Blythe E. K. Comparison of whole plant and detached leaf screening techniques for identifying anthracnose resistance in strawberry plants // Plant Disease. 2018. No. 102(11). P. 2112–2119. DOI: 10.1094/PDIS-08-17-1138-RE.

2. Zhang L., Song L., Xu X., Zou X., Duan K., Gao Q. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Eastern China // Plant Disease. 2020. No. 104(7). P. 1960–1968. DOI: 10.1094/PDIS-10-19-2241-RE.

3. Calleja E. J., Ilbery B., Spence N. J., Mills P. R. The effectiveness of phytosanitary controls in preventing the entry of *Colletotrichum acutatum* in the UK strawberry sector // Plant Pathology. 2013. No. 62(2). P. 266–278 DOI: 10.1111/j.1365-3059.2012.02647.x.

4. Кузнецова А. А., Дудченко И. П., Копина М. Б. Антракноз земляники, классические и современные методы диагностики // Материалы «Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и методы в защите растений». Екатеринбург: Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 2018. С. 78–81.

5. Цветкова Ю. В., Кузнецова А. А. Классические и современные методы диагностики грибов рода *Colletotrichum* на землянике садовой // Фитосанитария. Карантин растений. 2021. №1(1). С. 34–42.

6. Холод Н. А., Кащиц Ю. П., Добренков Е. А., Семёнова Л. Г. Оценка устойчивости сортов земляники садовой к антракнозной черной гнили в южном регионе // Плодоводство и виноградарство юга России. 2018. № 51(3). С. 140–148. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-140-148.

7. Marian M., Ohno T., Suzuki H., Kitamura H., Kuroda K., Shimizu M. A novel strain of endophytic *Streptomyces* for the biocontrol of strawberry anthracnose caused by *Glomerellacingulate* // Microbiological Research. 2020. Vol. 234. P. 126428. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126428.

8. Forcelini B. B., Peres N. A. Widespread resistance to QoI fungicides of *Colletotrichum acutatum* from strawberry nurseries and production fields // Plant Health Progress. 2018. No. 19(4). P. 338–341.DOI: 10.1094/PHP-08-18-0050-RS.

9. Wu J. Y., Hu X. R., Zhang C. Q. Molecular detection of QoI resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose based on loop-mediated isothermal amplification assay // Plant Disease. 2019. No. 103(6). P. 1319–1325. DOI: 10.1094/PDIS-09-18-1593-RE.

10. Miller-Butler M. A., Smith B. J., Curry K. J., Blythe E. K. Evaluation of detached strawberry leaves for anthracnose disease severity using image analysis and visual ratings // HortScience. 2019. No. 54(12). P. 2111–2117.DOI:10.21273/HORTSCI14321-19.

11. Jacobs R. L., Adhikari T. B., Pattison J., Yencho G. C., Fernandez G. E., Louws F. J. Assessing rate-reducing foliar resistance to anthracnose crown rot and fruit rot in strawberry // Plant Disease. 2020. No. 104(2). P. 398–407. DOI: 10.1094/PDIS-04-19-0687-RE.

12. 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*) // Horticulturae 2002. No. 567(2). P. 615–618. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.132.

13. 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 // HortScience. 2019. No. 54(5). P. 793–798. DOI: 10.21273/HORTSCI13805-18.

14. Salinas N., Fan Z., Peres N., Lee S., Whitaker V. M. *FaRCa1* confers moderate resistance to the root necrosis form of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* // HortScience. 2020. Vol. 55(5). P. 693–698. DOI: 10.21273/HORTSCI14807-20.

15. Denoyes B., Baudry A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics // Phytopathology. 1995. No. 85(1). P. 53–57. DOI: 10.1094/Phyto-85-53.

16. 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. Vol. 111. P. 862–870. DOI: 10.1007/s00122-005-0008-1.

17. 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. P. 795–799. DOI: 10.18699/VJ18.423.

18. 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. Т. 180. № 1. С. 73–77. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77.

19. Lyzhin A., Luk'yanchuk I. Marker-assisted screening of promising forms in the strawberry breeding // International Scientific and Practical Conference "Fundamental and Applied Research in Biology and Agriculture: Current Issues, Achievements and Innovations" (FARBA 2021), 2021. Vol. 254. P. 03002. DOI: 10.1051/e3sconf/202125403002.

20. 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). С. 15–24. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-o3.

21. Njuguna W. Development and use of molecular tools in *Fragaria.* Oregon State University, 2010.

22. Лыжин А. С., Лукьянчук И.В. Молекулярно-генетический анализ отборных и элитных форм земляники по генам резистентности *Rpf1* и *Rca2* // Аграрная Россия. 2020. №12. С. 30–34. DOI: 10.30906/1999-5636-2020-12-30-34.

References

1. Miller-Butler M. A., Smith B. J., Babiker E. M., Kreiser B. R., Blythe E. K. Comparison of whole plant and detached leaf screening techniques for identifying anthracnose resistance in strawberry plants // Plant Disease. 2018. No. 102(11). P. 2112–2119. DOI: 10.1094/PDIS-08-17-1138-RE.

2. Zhang L., Song L., Xu X., Zou X., Duan K., Gao Q. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Eastern China // Plant Disease. 2020. No. 104(7). P. 1960–1968. DOI: 10.1094/PDIS-10-19-2241-RE.

3. Calleja E. J., Ilbery B., Spence N. J., Mills P. R. The effectiveness of phytosanitary controls in preventing the entry of *Colletotrichum acutatum* in the UK strawberry sector // Plant Pathology. 2013. No. 62(2). P. 266–278 DOI: 10.1111/j.1365-3059.2012.02647.x.

4. Kuznetsova A. A., Dudchenko I. P., Kopina M. B. Strawberry anthracnose, classical and modern diagnostic methods // All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation "Modern approaches and methods in plant protection". Ekaterinburg: Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, 2018. P. 78–81.

5. Tsvetkova Y. V., Kuznetsova A.A. Conventional and modern methods for the diagnosis of *Colletotrichum* fungi on garden strawberry *Fragaria ananassa* // Plant Health and Quarantine. 2021. No 1(1). P. 34–42.

6. Holod N. A., Kashchits Yu. P., Dobrenkov E. A., Semenova L. G. Evaluation of stability of strawberry varieties to anthracnose black rot in the southern region // Fruit growing and viticulture of South Russia. 2018. No. 51(3). P. 137–145. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-137-145.

7. Marian M., Ohno T., Suzuki H., Kitamura H., Kuroda K., Shimizu M. A novel strain of endophytic *Streptomyces* for the biocontrol of strawberry anthracnose caused by *Glomerellacingulate* // Microbiological Research. 2020. Vol. 234. P. 126428. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126428.

8. Forcelini B. B., Peres N. A. Widespread resistance to QoI fungicides of *Colletotrichum acutatum* from strawberry nurseries and production fields // Plant Health Progress. 2018. No. 19(4). P. 338–341. DOI: 10.1094/PHP-08-18-0050-RS.

9. Wu J. Y., Hu X. R., Zhang C. Q. Molecular detection of QoI resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose based on loop-mediated isothermal amplification assay // Plant Disease. 2019. No. 103(6). P. 1319–1325. DOI: 10.1094/PDIS-09-18-1593-RE.

10. Miller-Butler M. A., Smith B. J., Curry K. J., Blythe E. K. Evaluation of detached strawberry leaves for anthracnose disease severity using image analysis and visual ratings // HortScience. 2019. No. 54(12). P. 2111–2117. DOI: 10.21273/HORTSCI14321-19.

11. Jacobs R. L., Adhikari T. B., Pattison J., Yencho G. C., Fernandez G. E., Louws F. J. Assessing rate-reducing foliar resistance to anthracnose crown rot and fruit rot in strawberry // Plant Disease. 2020. No. 104(2). P. 398–407. DOI: 10.1094/PDIS-04-19-0687-RE.

12. 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. No. 567(2). P. 615–618. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.132.

13. 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 // HortScience. 2019. No. 54(5). P. 793–798. DOI: 10.21273/HORTSCI13805-18.

14. Salinas N., Fan Z., Peres N., Lee S., WhitakerV. M. *FaRCa1* confers moderate resistance to the root necrosis form of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* // HortScience. 2020. Vol. 55(5). P. 693–698.DOI: 10.21273/HORTSCI14807-20.

15. Denoyes B., Baudry A.Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics // Phytopathology. 1995. No. 85(1). P. 53–57. DOI: 10.1094/Phyto-85-53.

16. 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. Vol. 111. P. 862–870.DOI:10.1007/s00122-005-0008-1.

17. 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. P. 795–799. DOI: 10.18699/VJ18.423.

18. 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. Vol. 180. No. 1. P. 73–77. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77.

19. Lyzhin A., Luk'yanchuk I. Marker-assisted screening of promising forms in the strawberry breeding // E3S Web of Conferences: International Scientific and Practical Conference "Fundamental and Applied Research in Biology and Agriculture: Current Issues, Achievements and Innovations" (FARBA 2021). 2021. Vol. 254. P. 03002. DOI: 10.1051/e3sconf/202125403002.

20. 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. Vol. 4(4). P. 15–24. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-o3.

21. Njuguna W. Development and use of molecular tools in *Fragaria*. Oregon State University, 2010.

22. Lyzhin A. S., Luk'yanchuk I. V. Molecular genetic analysis of *Fragaria* × *ananassa* Duch. selected and elite forms for the *Rpf1* and *Rca2* resistance genes // Agrarnaya Rossiya (Agrarian Russia). 2020. Vol. 12. P. 30–34. DOI: 10.30906/1999-5636-2020-12-30-34.

UDC 634.75:577.2:632.4

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

MOLECULAR SCREENING OF PROMISING STRAWBERRY SELECTED FORMS BY ANTHRACNOSE RESISTANCE (*RCA2* GENE)

Summary. *Anthracnose (Colletotrichum acutatum) is a dangerous fungal disease of strawberry varieties. Identification of strawberry forms with genetic resistance to*

anthracnose is an important strategy to control the spread of C. acutatum in strawberry plantations. The purpose of the study is molecular genetic analysis of selected and elite forms of strawberry by the Rca2 genes to identify genotypes resistant to C. acutatum, pathogenicity group 2. The studies were carried out in 2021–2022. The biological objects of the study were promising selected and elite forms of strawberry (Fragaria × ananassa Duch.) created at the FSSI "I.V. Michurin Federal Scientific Center" using the methods of introgressive and intervarietal hybridization. The Rca2 gene was identified by DNA analysis using the diagnostic marker STS-Rca2_240. The SSR marker EMFv020 was used as the positive control for the polymerase chain reaction. As a result of the research, the genotypic structure of the initial forms of strawberry for the Rca2 anthracnose resistance gene was clarified. Strawberry varieties 'Rubinovy kulon' and 'Roxana' are characterized by the heterozygous genotype for the Rca2 gene. Selected strawberry hybrid seedlings 9/1-11, 9/1-12, 9/1-13, 9/1-32 and 9/1-37 ('Vicoda' × 'Roxana') were identified as carriers of the Rca2 resistance allele (putative Rca2rca2 genotype). These forms are promising initial material for strawberry breeding for resistance to anthracnose caused by the phytopathogenic fungus C. acutatum. In the hybrid combinations 'Vima Zanta' × 'Polka', 'Privlekatelnaya' × 'Polka', 'Feyyerverk' × 'Festivalnaya', 'Vima Zanta' × 'Privlekatelnaya', 298-19-9-43 × 'Privlekatelnaya', 'Polka' × 'Vima Zanta', 'Urozhaynaya CGL' × 'Rubinovy kulon', 922-67 × 'Maryshka', 'Kimberly' × 9/2-2, 'Asia' × 'Maya', 'Gigantella Maxim' × 'Privlekatelnaya' and 'Kimberly' × 'Honeoye', selected strawberry forms with the Rca2 gene were not identified.

Keywords: *strawberry (Fragaria × ananassa Duch.), genotype, anthracnose, resistance, molecular markers.*

Лыжин Александр Сергеевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии устойчивости и геномных технологий, ФГБНУ «ФНЦ имени И. В. Мичурина»; 393760, г. Мичуринск, Тамбовская обл., ул. Мичурина, 30; e-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru.

Лукъянчук Ирина Васильевна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории частной генетики и селекции, ФГБНУ «ФНЦ имени И. В. Мичурина»; 393760, г. Мичуринск, Тамбовская обл., ул. Мичурина, 30; e-mail: irina.lk2011@yandex.ru.

Lyzhin Aleksandr Sergeevich, Cand. Sc. (Agr.), leading researcher of Laboratory of physiology of resistance and genomic technologies, FSSI "I.V. Michurin Federal Scientific Center"; 30, Michurina str., Michurinsk, Tambov region, 393774, Russia; e-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru.

Luk'yanchuk Irina Vasilievna, Cand. Sc. (Agr.), senior researcher of Laboratory of private genetics and breeding, FSSI "I.V. Michurin Federal Scientific Center"; 30, Michurina str., Michurinsk, Tambov region, 393774, Russia; e-mail: irina.lk2011@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию – 28.03.2022.
Дата принятия к печати – 20.04.2022.