

Подбор и апробация молекулярных маркеров для селекции садовых роз на устойчивость к черной пятнистости

*Зыкова В.К. *, к.б.н., с.н.с.; Цюпка В.А., к.б.н., с.н.с.; Хайленко Е.В., м.н.с.*

ФГБУН Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия

**email: zykova.vk@mail.ru*

*Черное пятнистость – одно из наиболее вредоносных заболеваний *Rosa L.*, вызываемое грибом *Diplocarpon rosae*. 12 генотипов садовых роз с известной устойчивостью к черной пятнистости были использованы для апробации 9 маркеров к кодирующей и не кодирующей последовательности генов *Rdr 1* и *Rdr 3*, отвечающих за устойчивость к этому заболеванию. Выявлены 2 маркера, которые в условиях Южного берега Крыма позволяют определить устойчивые генотипы. Эти маркеры рекомендуются для дальнейшего использования в MAS-селекции садовых роз на устойчивость к черной пятнистости.*

*Ключевые слова: *Rosa L.*, *Diplocarpon rosae*, MAS-селекция, Южный берег Крыма.*

Selection and testing of molecular markers for breeding garden roses for resistance to black spot

*Zykova V.K. *, Tsiupka V.A., Khailenko E.V.*

The Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center RAS, Yalta, Russia

**email: zykova.vk@mail.ru*

*Black spot is one of the most harmful diseases of garden roses, caused by the fungus *Diplocarpon rosae*. 12 genotypes of garden roses with known resistance to black spot were used to test 9 markers for the coding and non-coding sequence of the *Rdr 1* and *Rdr 3* genes, which are responsible for resistance to this disease. Two markers that make it possible to identify resistant genotypes in the conditions of the Southern coast of Crimea have been identified. These markers are recommended for further use in MAS selection of garden roses for resistance to black spot.*

*Key words: *Rosa L.*, *Diplocarpon rosae*, MAS selection, Southern coast of Crimea.*

В последние десятилетия в селекционной работе по повышению устойчивости к болезням у сельскохозяйственных культур высокая эффективность продемонстрирована при использовании подхода MAS-селекции [1, 2]. Одним из объяснений этого является моногенный характер наследования устойчивости ко многим бактериальным и грибным заболеваниям [3].

Одним из наиболее вредоносных заболеваний *Rosa* L. является черная пятнистость, вызываемая грибом *Diplocarpon rosae* F.A. Wolf. Возбудитель обнаруживается почти везде, где розы выращивают в открытом грунте, а большинство современных сортов садовых роз восприимчивы хотя бы к одной из 13 зарегистрированных рас [4, 5]. Устойчивость роз к *D. rosae* является монолокусным признаком. На сегодняшний день известно четыре гена устойчивости к данному заболеванию: *Rdr1*, *Rdr2*, *Rdr3* и *Rdr4*, отвечающих за устойчивость к одной или нескольким расам возбудителя [5].

Так как наиболее распространены расы 7 и 8, целью нашего исследования была апробация в условиях Южного берега Крыма маркеров, подобранных из кодирующей и не кодирующей последовательности генов *Rdr 1* и *Rdr 3*, отвечающих за устойчивость к этим расам. Для проведения скрининга были отобраны 12 генотипов садовых роз, для которых информация об устойчивости или же, напротив, поражаемости черной пятнистостью была получена путем многолетних полевых наблюдений.

ДНК выделяли из молодых неповрежденных листьев растений *ex situ* одним из классических способов с применением цетилтриметиламмоний бромида (2×ЦТАБ) [6] с добавлением 2%-го поливинилпирролидона (ПВП). Учитывая значительное накопление вторичных метаболитов (фенольных соединений и полисахаридов) в тканях листа у представителей рода *Rosa* L., при выделении ДНК в лизирующий раствор добавляли ПВП и β-меркаптоэтонол (таким образом 2×СТАВ содержал 2 % ПВП и 20 % β-меркаптоэтонол).

Качество и количество полученной ДНК оценивали на нанофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Амплификацию проводили с применением наборов BioMaster HS-Taq PCR (Биолабмикс, Российская Федерация) и 5X ScreenMix-HS (Евроген, Российская Федерация) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР проводили в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур).

Для скрининга было использовано 9 маркеров. Оптимизированные температуры отжига праймеров и их нуклеотидные последовательности приведены в таблице 1.

Условия ПЦР были следующими: начальная денатурация – 95 °С – 2 мин, с последующими 35 циклами: денатурация – 95 °С – 30 с, отжиг – T_m °С – 45 с, элонгация – 72 °С – 1 мин, с итоговой элонгацией при 72° С в течение 10 мин. Амплификацию всех локусов проводили два раза после оптимизации программы ПЦР и концентрации реагентов. Для постановки реакции брали одинаковую концентрацию образцов ДНК (25 нг/мкл). Для детекции использовали генетический анализатор – автоматическую систему для капиллярного электрофореза Tare

Station 4200 (Agilent Technologies, Germany) с картриджами ScreenTape и наборами реагентов (точность определения до 2 нуклеотидов).

Таблица 1 – Маркеры устойчивости к черной пятнистости садовых роз, отобранные для апробации

Название маркера	F	R	Ожидаемый размер продукта, bp	Tm (°C)*	Ссылка
Rd1LRR	AGGCTTCAACAATT GCC	GGAATTTCACTTCCA GGA	276	60	[7]
muRdr1A	ACAAGTGTTCAG ATCCACAAG	AGTGC GGTCGGTAA TCAAGA	200	60	[7]
RGA	TTTGC GTCTTCTTG CTAA	CTTCTTCAGGCTCAC ATTTC	348	56	[9]
29Mic	ACAAAACATGCCCT CTTGCT	GCTCTTGAGGCATG AATTGG	124	58	[9]
155SSR	GAAAAGAACGAGG GGTTTCC	ACGGTCGGTAATCA AGATGC	119	58	[9, 5]
69Mic	GGTTTGGGTTTTATT TGCTTTG	ACGCAAGAAAATGA GGGGTA	226	60	[9]
69E24	TCA GGT GGG TGA GCT TCA AT	TGA TTA GCT TGC CGG TTC TT	156	58	[5]
RMS015	TAA TGT AGG CAG ATA TAA AGG AGT	GCA GCT GCA CAA CAA GGA A	57	58	[5]
ND5ESCAR	GTT TTG AGT ATC TCC TTG ATC	AAT GAA GTA GGA GAA AGA AAG A	108	55	[5]

*-оптимизированная температура отжига праймеров

В результате проведенных исследований целевые аллельные варианты, ожидаемые при дифференциации устойчивых и восприимчивых генотипов, получены для всех маркеров за исключением ND5ESCAR, однако корреляция с наблюдаемым фенотипическим распределением отмечена только для маркеров Rd1LRR и 69E24 (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты скрининга молекулярных маркеров, апробированных для оценки устойчивости роз к черной пятнистости (*D. rosae*)

Генотипы		Маркеры								
		<i>Rdr1</i>								<i>Rdr3</i>
		Rd1L RR	muRdr1 A	RGA	29Mic	155SS R	69Mic	69E2 4	RMS01 5	ND5E SCAR
'Кружевница'	с*	-	+	-	+	+	-	-	-	-
'Frohsinn'	в	-	+	+	+	-	-	-	-	-
'Christophe Colomb'	у	+	+	+	-	+	-	+	+	-
'Anthony Meiland'	в	-	+	+	+	-	-	-	+	-
'Борисфен'	у	+	+	+	+	-	-	-	+	-
'Line Renaud'	с	-	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>R. fedtschenkoana</i>	у	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Гибридная форма №1	у	+	+	-	+	+	-	-	+	-
'Kordes Sondermeldung'	в	-	+	-	+	-	-	-	+	-
'General MacArthur'	в	-	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>R. bracteata</i>	у	-	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>R. hugonis</i>	у	+	+	-	+	+	-	-	+	-

*- у – устойчивые сорта, с – сорта со средней степенью устойчивости, в – восприимчивые сорта.

Таким образом, установлено, что маркеры Rd1LRR и 69E24 в условиях Южного берега Крыма позволяют провести оценку генотипов по степени устойчивости к черной пятнистости. Полученные с их помощью результаты совпадают с полевыми наблюдениями за проявлением симптомов заболевания. Отобранные в результате апробации маркеры Rd1LRR и 69E24 рекомендуется для использования при селекции садовых роз на устойчивость к черной пятнистости.

Список литературы

- 1 Van Damme V., Gomez-Paniagua H., de Vicente M.C. The GCP molecular marker toolkit, an instrument for use in breeding food security crops // *Molecular Breeding*. 2011. V. 28. P. 597–610.
- 2 Brumlop, S., Finckh, M.R. Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding: final report of the F+E project "Applications and Potentials of Smart Breeding" (FKZ 350 889 0020) on behalf of the Federal Agency for Nature Conservation / Bundesamt für Naturschutz. 2011.
- 3 Miah, G., Rafii M.Y., Ismail M.R., Puteh A.B., Rahim H.A., Asfaliza R., Latif M.A. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches // *Molecular Biology Reports*. 2013. Vol. 40. P. 2369–2388.
- 4 Gachomo E.W., Dehne H.W., Steiner U. Microscopic evidence for the hemibiotrophic nature of *Diplocarpon rosae*, cause of black spot disease of rose // *Physiol Mol Plant Pathol*. 2006. Vol. 69. P. 86–92.
- 5 Whitaker V.M., Bradeen J.M., Debener T., Biber A., Hokanson S.C. Rdr3, a novel locus conferring black spot disease resistance in tetraploid rose: genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development // *Theor Appl Genet*. 2010. Vol. 120. P. 573–585.
- 6 Супрун И.И., Степанов И.В., Лободина Е.В., Токмаков С.В. Методы молекулярного ДНК-маркирования в оценке генетического разнообразия косточковых культур // *Научные Труды СКФНЦБВ*. 2019. Т. 23. С. 31–39.
- 7 Terefe-Ayana, D., Debener, T. An SSR from the leucine-rich repeat region of the rose Rdr1 gene family is a useful resistance gene analogue marker for roses and other Rosaceae // *Plant Breed*. 2011. Vol. 130. P. 291–293.
- 8 Rouet, C. Mapping black spot disease resistance and cold hardiness in garden roses (*Rosa x hybrida*). Doctoral dissertation, University of Guelph, 2021.
- 9 Biber A., Kaufmann H., Linde M., Spiller M., Terefe D., Debener T. Molecular markers from a BAC contig spanning the Rdr1 locus: a tool for marker-assisted selection in roses // *Theor. Appl. Genet*. 2010. P. 765–773.