

Юйтин Сяо, аспирант

И. Б. Саук, старший научный сотрудник

В. С. Анохина, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики, заведующий сектором генетики растений НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии

Белорусский государственный университет, г. Минск

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОРОСТКОВ СЕМЯН И ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ОБРАЗЦОВ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ

РЕЗЮМЕ

*Представлены результаты изучения различающихся по происхождению сортов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) по устойчивости к антракнозу с использованием проростков и молекулярного тестирования по генам устойчивости (*Co-1⁴*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*). Для анализа проростков использовали рулонный метод и чашки Петри. Наиболее достоверные данные получены с использованием чашек Петри. На основе лабораторных анализов проростков по устойчивости к антракнозу и ДНК-маркерам выделены перспективные образцы фасоли (*Сакса без волокна 615* и *Лаура*).*

Ключевые слова: антракноз, генотип, ДНК-маркер, проросток, фасоль обыкновенная.

ВВЕДЕНИЕ

Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) является одной из самых важных зерновых бобовых культур в мире. По данным ФАО, в 2018 г. площади возделывания фасоли на зерно составили в Индии 13 545 518 га, Мексике – 1 596 224, США – 815 850, Китае – 749 860, в Беларуси – 116 502 га. Площади возделывания фасоли на зеленые бобы в этом же году составили в Китае 682 419 га, Индии – 252 366, Турции – 42 542, в Бангладеш – 20 594 га [1]. Расширение площади возделывания бобовых овощных культур, в частности фасоли обыкновенной, имеет важное значение для нашей страны. Фасоль используется в продовольственных (обеспечение населения высококачественными продуктами питания: свежая, свежемороженая, консервированная спаржевая фасоль, высокобелковые наполнители для пищевой промышленности, продукты для детского и диетического питания), экономических (обеспечение импортозамещения, в частности, снижение импорта консервированной и свежемороженой спаржевой фасоли, высокобелковых наполнителей, семян), агротехнических (введение в севообороты бобовых овощных культур, что повысит эффективность возделывания всех овощных культур),

агрохимических (обогащение почвы симбиотически фиксированным азотом, использование в качестве удобрения побочной продукции фасоли овощной) целях. В последние годы мировая селекция фасоли овощной направлена на создание раннеспелых сортов «сахарного» и универсального типов, не имеющих пергаменты и волокна в створках боба в технической спелости, а также пригодных для механизированной уборки растений [2].

Необходимость интенсификации селекции овощных зернобобовых культур диктуют современные реалии: строящиеся в стране производственные мощности по их переработке, стремление к здоровому образу жизни, одним из компонентов которого является растительная высокобелковая пища. К этому можно добавить заботу об экологии окружающей среды, поскольку производство зернобобовых – фиксаторов атмосферного азота за счет симбиоза с бактериями – снижает техногенную нагрузку на почву [3].

Однако широкому распространению культуры фасоли препятствуют различные болезни и абиотические стрессоры, существенно снижающие (до 40 % и более) продуктивность растений и качество их продукции. Фасоль поражается грибными, бактериальными и вирусными болезнями. Из грибных болезней наиболее вредоносны антракноз, фузариоз, белая и серая гнили, мучнистая роса.

Антракноз фасоли – вредоносное заболевание, вызываемое грибом *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav.). В настоящее время установлено наличие более 40 генов устойчивости к антракнозу у культуры фасоли [4]. Гены устойчивости к антракнозу классифицированы на мезоамериканские (*Co-2*, *Co-3* (и его аллели *Co-3²*, *Co-3⁴*, *Co-3⁵*), *Co-4* (и его аллели *Co-4²*, *Co-4³*), *Co-5* (и его аллель *Co-5²*), *Co-6*, *Co-11*, *Co-16*, *Co-17*, *Co-u*, *Co-v*) и гены устойчивости Анд (*Co-1* (и его аллели *Co-1²*, *Co-1³*, *Co-1⁴*, *Co-1⁵*), *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *C-x*, *Co-w*, *Co-y*, и *Co-z*) [5]. Ниже дана характеристика некоторых из них. **Ген *Co-1***, известный как ген *A*, впервые был описан у сорта Well' s Red Kidney [6]. Это первый ген устойчивости, описанный с учетом расоспецифичности патогена у сорта генофонда Анд. Установлено наличие серии аллелей этого гена: аллель *Co-1* представлен в сорте Michigan Dark Kidney. Два разных аллеля *Co-1²* и *Co-1³* определены у сортов Кабоон и Perry Marrow соответственно и приведены в [7]. Аллель *Co-1⁴* описан у сорта AND277 [8]. Установлено сцепление аллеля *Co-1⁴* с геном устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1* [9]. **Ген *Co-2***, известный как ген *Are*, впервые был описан у генотипа Cornell 79-242 из Венесуэлы [10]. Ген обеспечивал устойчивость к четырем расам патогена (*alpha-17*, *beta-130*, *gamma-102* и *delta-23*). Ген *Co-2* обеспечивает горизонтальную устойчивость и был использован в селекционных программах на всех континентах [11]. Аллелей у данного гена не описано [12]. RAPD- и SCAR-маркеры впервые были разработаны для этого гена [13]. **Ген *Co-4***, известный как *Mexique 2*, впервые описан у генотипа ТО, полученного от скрещивания сорта Tenderette с устойчивой линией «Acapulca» из Мексики [14]. У гена известны два аллеля [15]. Ген *Co-4* использован во многих программах скрещивания как источник устойчивости ко многим расам

патогена в Мексике [16]. Селекционерами доказано, что аллель *Co-4²* – лучший источник устойчивости *Co-4* при скрещиваниях сортов [17]. Ген *Co-6* впервые описан у сорта *Catrachita*, полученного от скрещивания ВАТ1225 × АВ136 [18]. Использованная для скрещивания форма АВ 136 обладала доминантным геном устойчивости к 4 расам *C. lindemuthianum*. Аллелей не установлено. Ген *Co-6* обладает широкой устойчивостью ко многим расам патогена из всего региона Анд. Ген широко представлен в сортах Бразилии [19], где зарекомендовал себя как обеспечивающий устойчивость ко всем известным изолятам *C. lindemuthianum* [20].

В Китае проведено тестирование надежности семи маркеров SCAR для характеристики геномов фасоли по антракнозоустойчивости [21]. С использованием метода сегрегационного группового анализа (BSA) и анализа микросателлитного полиморфизма (SSR) обнаружен уникальный ген *Co-F2533*. Установлено, что среди 143 экспериментальных генотипов из пяти изученных генов устойчивости максимально встречается ген *Co-2*. Авторы подтверждают сложность идентификации геномов по устойчивости к антракнозу, что связано как с эволюцией патогена, так и с защитными механизмами растений, что необходимо учитывать в работе. Отмечено негативное влияние антракноза фасоли, приводящее к значительным экономическим потерям в отдельных районах Китая, благоприятных для размножения патогена [22]. Поэтому, по мнению авторов, выявление генов антракнозоустойчивости и их источников является наиболее экономичным, эффективным и экологически безопасным способом борьбы с антракнозом фасоли обыкновенной для всех регионов, возделывающих эту культуру. Генетические исследования устойчивости к антракнозу у фасоли выявили, что устойчивость контролируется комплексом генов *Co-1, Co-2, Co-3, Co-4, Co-5, Co-6, Co-7, Co-8, Co-9, Co-10, Co-11, Co-12, Co-13* и *Co-F2533* и их сочетанием в геноме. Среди них гены из генного банка Анд и Центральноамериканского банка. Часть изученных генов локализована на общей карте хромосом фасоли по отдельным группам сцепления. Отмечена специфичность геномов изученных форм по количеству и составу генов устойчивости к антракнозу. Совершенствуются направления и методы селекции фасоли в Китае: расширение генофонда за счет гибридизации, мутагенеза, генной инженерии, разноплановые использования ДНК-маркирования с целью улучшения качества и количества продукции и отбора на устойчивость к болезням [23].

Селекция растений на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам является одним из приоритетных направлений сельскохозяйственной науки. Традиционные методы селекции на устойчивость к разным факторам среды сложны, длительны и не всегда эффективны. Успех селекции на устойчивость определяется наличием доноров и источников устойчивости. Для улучшения фасоли значимыми являются генетические подходы, при которых используются генетические маркеры в качестве критериев отбора ценных генотипов. Поэтому для подтверждения правомочности выделения генотипов фасоли с генами устойчивости к антракнозу необходимо молекулярно-генетическое тестирование геномов селекционных генотипов.

Цель работы – оценка различных по происхождению сортов фасоли обыкновенной из коллекции ВИР и сортов белорусской селекции по устойчивости к антракнозу с использованием проростков и молекулярно-генетического маркирования генотипов и определение наличия в их геномах генов устойчивости к антракнозу (*Co-1⁴*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В эксперименте использовали проростки семян десяти сортов из коллекции ВИР (Сакса б/в 615, Рант, Ребус, Дарина, Елизавета, Лаура, Маринка, Autan, Asgrow 230В, Fruhe Dickellischige Wachs) и трех сортов белорусской селекции (Зинуля, Зничка, Магура).

Патогенный грибок был выделен из пораженных растений, выращенных в полевых условиях Беларуси. Для определения устойчивости образцов фасоли к антракнозу и маркирования их геномов используются десятидневные сеянцы, которые подвергают воздействию суспензии спор в концентрации $2,0 \times 10^6$ спор в 1 мл путем опрыскивания в теплицах или климатикамерах [24]. Устойчивость оценивают на 7–9-й день после воздействия. Для определения устойчивости образцов фасоли к антракнозу нами использованы методы оценки по проросткам семян как рулонным методом [25], так и в чашках Петри [26]. Семена перед закладкой эксперимента дезинфицировали 70 %-м этиловым спиртом, после чего промывали автоклавированной дистиллированной водой. В опытных вариантах семена инокулировали суспензией спор гриба *Colletotrichum lindemuthianum* в течение 60 минут, спорная нагрузка которого составила $1,1 \times 10^6$ спор в 1 мл суспензии, затем промывали дистиллированной водой и закладывали в бумажно-полиэтиленовые рулоны (рулонный метод), как и контрольные варианты (без воздействия патогена). Рулоны с проростками опыта и контроля помещали отдельно в стерильные сосуды (растельни) с дистиллированной водой слоем в 2–3 см. Сосуды с рулонами помещали в термостат с температурой 23 °С на четверо суток, затем переносили на стеллажи и выдерживали еще пять суток при комнатных условиях. Данная методика разработана для культуры люпина. Нами модифицированы температурный режим и условия стерилизации семян для культуры фасоли. В другой серии эксперимента использовали чашки Петри: инокулированные семена и семена без обработки раскладывали отдельно в чашки Петри, выстланные фильтровальной бумагой, смоченной дистиллированной автоклавированной водой. Чашки Петри помещали в термостат с температурой 15 °С на девять суток. Анализ проростков проведен на девятые сутки. Определены процент прорастания семян, длина корешка, длина гипокотила и процент поражения проростков семян. Выборка для каждого варианта составила по 20 семян как в контроле, так и в опыте. Экспериментальные данные обработаны статистически с использованием пакета программ Excel. Для различных независимых пар данных рассчитывали значение t-критерия Стьюдента. Проростки семян изученных сортов на основе поражения ранжированы по шкале устойчивости (табл. 1) [27].

Таблица 1 – Шкала устойчивости

Устойчивость	Поражение проростков, %
1 – очень низкая	Очень сильное > 50
3 – низкая	Сильное 26–50
5 – средняя	Среднее 11–25
7 – высокая	Слабое 2,5–10,0
9 – очень высокая	Отсутствует или очень слабое < 2,5

Геномная ДНК из проростков фасоли была изолирована с помощью набора Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) согласно инструкции производителя. Реакционная смесь содержала: ДНК – 2,5 нг/мкл, праймеры – 0,25 мкмоль каждого, PrimeTaq ДНК полимеразы – 0,5 U, ПЦР буфер однократный, 0,8 ммоль dNTP, 2,0 ммоль MgCl₂. ПЦР проводили с помощью термоциклера Agilent Technologies Sure Cycler 8800. Электрофоретическое разделение фрагментов проводили с помощью камеры для электрофореза Helicon (Россия) и источника питания Эльф-4 (ДНК-технология) в 2 %-м агарозном геле при 80 В, 170 мА. В лунки вносили по 10 мкл полученной после рестрикции смеси фрагментов ДНК.

Гель извлекали и помещали в деионизированную воду, содержащую 1 мг/л бромистого этидия, и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего гель помещали в трансиллюминатор и фотографировали в ультрафиолетовом проходящем снизу свете. В работе использовали ДНК-маркеры молекулярного веса М 100 bp и 1Kb ОДО «Праймтех». ПЦР проводили с использованием праймеров, синтезированных ОДО «Праймтех» (г. Минск) (табл. 2).

Таблица 2 – Гены устойчивости к антракнозу и характеристика праймеров, использованных в исследовании

Ген	Праймер	Последовательность нуклеотидов 5' → 3'	Размер бэнда, п. н.	Источник
<i>Co-1^d</i>	CV54 2014	F:CACTTTCCACTGACGGATTTGAACC R:GCACAAGGACAAGTGGATTTGG	450	[9]
<i>Phg-1</i>	TGA	F:CAGAGGATGCTTCTCACGGT R:AAGCCATGGATCCCATTG	570	[9]
<i>Co-2</i>	SQ 4	F:CCTTAGGTATGGTGGGAAACGA R: TGAGGGCGAGGATTTTCAGCAAGTT	1 440	[28]
<i>Co-4²</i>	SAS13	F:CACGGACCGAATAAGCCACCAACA R:CACGGACCGAGGATACAGTCAAAG	950	[15]
<i>Co-4</i>	SY20	F:AGCCGTGGAAGGTTGTCAT R:CCGTGGAAACAACACACAAT	830	[29]
<i>Co-4²</i>	SBB14	F:GTGGGACCTGTTCAAGAATAATAC R:GTGGGACCTGGGTAGTGTAGA	1150/ 1050	[30]
<i>Co-4</i>	SC08	F:AGAATGCCTTTAGCTGTTGG R:CAGAGAGGCTAGGCTTATCG	910	[29]
<i>Co-6</i>	SZ04	F:GGCTGTGCTGATTAATTCTGG R:TGCTCATTTTATAATGGAGAAAA	567	[29]
<i>Co-6</i>	SZ20	F:ACCCCTCATGCAGGTTTAA R:CATAATCCATTTCATGCTCACC	845	[29]

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения устойчивости опытных форм к антракнозу в лабораторных условиях по проросткам рулонным методом представлены в таблице 3, по проросткам в чашках Петри – в таблице 4. В результате исследования, проведенного рулонным методом, у 8 из 13 изученных сортов по проценту прорастания семян получены ложноположительные результаты (процент прорастания семян в опыте превосходит таковой в контроле, но в контроле этот показатель не является 100 %-м), что не дает право оценивать ростовые показатели в опытных вариантах.

Таким образом, устойчивость к антракнозу по длине проростков (корешка, гипокотилия) и проценту поражения проростков можно определять только у сортов Рант, Ребус, Лаура, Fruhe Dickellschige Wachs и Магура. Среди этих сортов отмечены сорта с сильным поражением и низкой устойчивостью (балл устойчивости 3) – Рант и Лаура, у которых в опытном варианте отмечено достоверное превышение длины корешка и гипокотилия над контролем и сорт Fruhe Dickellschige Wachs, имеющий такой же балл устойчивости, но не имеющий различий по ростовым параметрам. Сорта Ребус и Магура отнесены к сортам с очень низкой устойчивостью (балл устойчивости 1).

Следует отметить, что у сорта Asgrow 230В не было корешков и гипокотилей в контроле, но в опыте проросло 20 % семян и они имели 100 %-ю поражаемость.

Эксперимент по воздействию суспензии спор *C.lindemuthianum* на семена образцов фасоли, поставленный в чашках Петри показал, что в контрольном варианте у всех изученных образцов процент прорастания семян был 100 %-м, а у сорта Asgrow 230 В этот показатель составил 90 %. Таким образом, в контрольных вариантах в чашках Петри ложноположительных результатов не выявлено. Процент прорастания семян после воздействия патогена у трех сортов следующий: Ребус 50 %, Autan и Asgrow 230В 30 %. Данные сорта отнесены к неустойчивым. У этих же сортов при анализе ростовых параметров установлено угнетение ростовых процессов и наибольший процент поражаемости проростков (табл. 4).

Тенденции превышения длины корешка и гипокотилия в опытных вариантах над контрольными не установлено, что может быть объяснено ограничением пространства в чашках Петри. По проценту поражения проростков сорта Сакса б/в 615 и Лаура относятся к среднеустойчивым сортам (балл 5), а Елизавета и Дарина – к сортам с низкой устойчивостью (балл 3). Все остальные изученные образцы – к сортам с очень низкой устойчивостью (балл 1).

В соответствии с целью работы изученные образцы фасоли промаркированы на наличие генов устойчивости к антракнозу: *Co-1⁴* (и сцепленного с ним гена устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1*), *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*. Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 1, 2 и в таблице 5.

Co-1⁴ и *Phg-1*. В геномах изученных образцов сцепления между генами *Co-1⁴* и *Phg-1* не установлено. Фрагменты амплификации ДНК-образцов

Таблица 3 – Характеристика экспериментальных образцов фасоли по устойчивости к антракнозу (рулонный метод)

Образец	Контроль			Опыт			Поражение проростков, %	Балл устойчивости
	Процент прорастания семян	длина, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ см		Процент прорастания семян	длина, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ см			
		корешка	гипокотили		корешка	гипокотили		
Сакса б/в 615	80,00	5,10 ± 0,71	1,38 ± 0,15	95,00	10,16 ± 0,64***	3,23 ± 0,26***	47,37	3
Рант	100,00	7,62 ± 0,84	3,64 ± 0,38	100,00	11,32 ± 1,04**	5,62 ± 0,41**	45,00	3
Аутан	50,00	4,03 ± 0,92	1,83 ± 0,35	80,00	3,70 ± 0,55	3,78 ± 0,54**	75,00	1
Ребус	95,00	9,23 ± 0,90	3,96 ± 0,39	95,00	9,44 ± 1,13	5,48 ± 0,52*	57,89	1
Asgrow 230 В	–	–	–	20,00	4,90 ± 2,70	5,40 ± 1,47	100,00	1
Дарина	85,00	9,80 ± 0,84	5,14 ± 0,77	100,00	10,86 ± 0,68	3,63 ± 0,42*	27,97	3
Елизавета	65,00	9,68 ± 0,52	6,37 ± 0,74	80,00	7,94 ± 0,94	7,45 ± 0,81*	87,50	1
Лаура	100,00	7,22 ± 0,87	3,93 ± 0,36	100,00	10,55 ± 0,36***	5,60 ± 0,36***	45,00	3
Frühe Dickellischige Wachs	95,00	11,75 ± 0,84	5,77 ± 0,48	95,00	11,28 ± 0,67	6,40 ± 0,35	31,58	3
Маринка	68,00	5,89 ± 1,04	3,86 ± 0,55	90,00	10,54 ± 1,23**	6,23 ± 0,67**	55,56	1
Зинуля	89,00	6,79 ± 0,62	3,94 ± 0,21	100,00	8,37 ± 1,06	4,89 ± 0,49	41,47	3
Зничка	90,00	6,92 ± 0,69	4,87 ± 0,61	100,00	10,38 ± 0,61***	6,72 ± 0,38**	19,44	5
Магура	100,00	9,36 ± 1,00	6,43 ± 0,63	100,00	13,62 ± 1,31*	10,12 ± 1,18*	80,00	1

Примечание. Контроль – без воздействия патогена; опыт – после воздействия патогена.

* Разница с контролем достоверна при $P < 0,05$;

** Разница с контролем достоверна при $P < 0,01$;

*** Разница с контролем достоверна при $P < 0,001$.

Таблица 4 – Характеристика экспериментальных образцов фасоли обыкновенной по устойчивости к антракнозу (чашки Петри)

Образец	Контроль				Опыт				Поражение проростков, %	Балл устойчивости
	Процент прорастания семян	длина, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ см		Процент прорастания семян	длина, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ см					
		корешка	гипокотила		корешка	гипокотила				
Сакса б/в 615	100	2,02 ± 0,23	1,58 ± 0,08	100	3,57 ± 0,25***	1,32 ± 0,08*	15,00	5		
Рант	100	3,78 ± 0,31	1,56 ± 0,09	100	4,73 ± 0,33*	1,28 ± 0,06**	73,68	1		
Autan	100	3,35 ± 0,44	1,80 ± 0,14	30	1,67 ± 0,31**	1,38 ± 0,18	85,00	1		
Ребус	100	4,86 ± 0,57	1,75 ± 0,20	50	1,51 ± 0,55***	1,27 ± 0,13	89,47	1		
Asgrow 230 В	90	4,10 ± 0,62	1,80 ± 0,14	30	2,03 ± 0,51*	1,43 ± 0,03*	95,00	1		
Дарина	100	4,08 ± 0,45	1,74 ± 0,11	100	5,24 ± 0,25*	1,60 ± 0,10	50,00	3		
Елизавета	100	7,51 ± 0,34	2,14 ± 0,11	100	7,65 ± 0,68	1,64 ± 0,13**	30,00	3		
Лаура	100	3,71 ± 0,32	1,86 ± 0,08	100	3,83 ± 0,29	1,29 ± 0,08***	20,00	5		
Fruhe Dickellischige Wachs	100	3,95 ± 0,43	1,68 ± 0,07	100	3,83 ± 0,45	1,50 ± 0,08	65,00	1		
Маринка	100	5,38 ± 0,43	1,72 ± 0,09	100	5,02 ± 0,53	2,05 ± 0,09**	80,00	1		
Зинуля	100	4,05 ± 0,42	1,35 ± 0,06	100	6,45 ± 0,44***	1,56 ± 0,08*	80,00	1		
Зничка	100	5,60 ± 0,58	1,63 ± 0,08	100	7,82 ± 0,72*	2,28 ± 0,15***	65,00	1		
Магура	100	4,55 ± 0,36	2,16 ± 0,29	100	4,92 ± 0,45	1,52 ± 0,13*	75,00	1		

Примечание. Контроль – без воздействия патогена; опыт – после воздействия патогена.

* Разница с контролем достоверна при $P < 0,05$;** Разница с контролем достоверна при $P < 0,01$;*** Разница с контролем достоверна при $P < 0,001$.

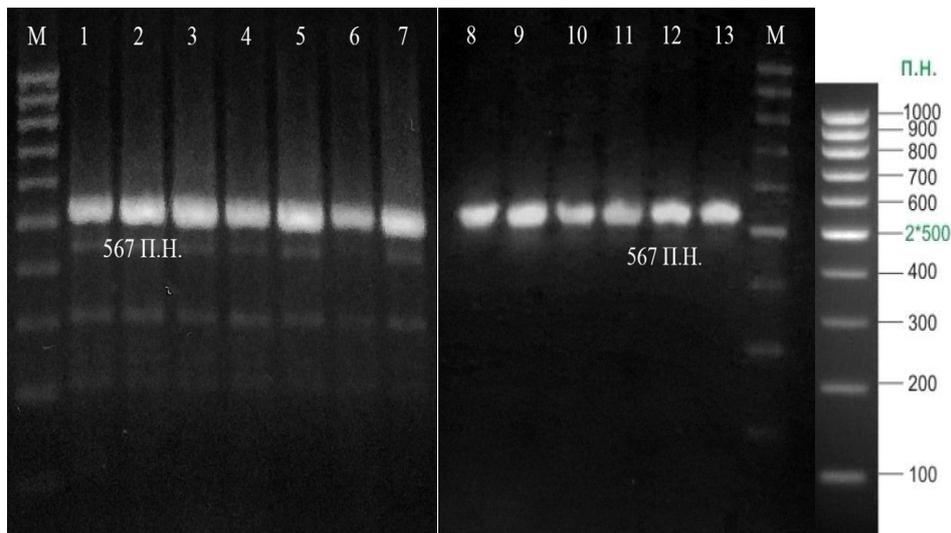


Рисунок 1 – Результаты типирования отдельных образцов фасоли с праймером SZ04 (Co-6): М – ДНК-маркер молекулярного веса 100bp «Праймтех», 1 – Сакса б/в 615, 2 – Рант, 3 – Autan, 4 – Ребус, 5 – Asgrow 230 В, 6 – Дарина, 7 – Елизавета, 8 – Лаура, 9 – Fruhe Dickellischige Wachs, 10 – Маринка, 11 – Зинуля, 12 – Зничка, 13 – Магура

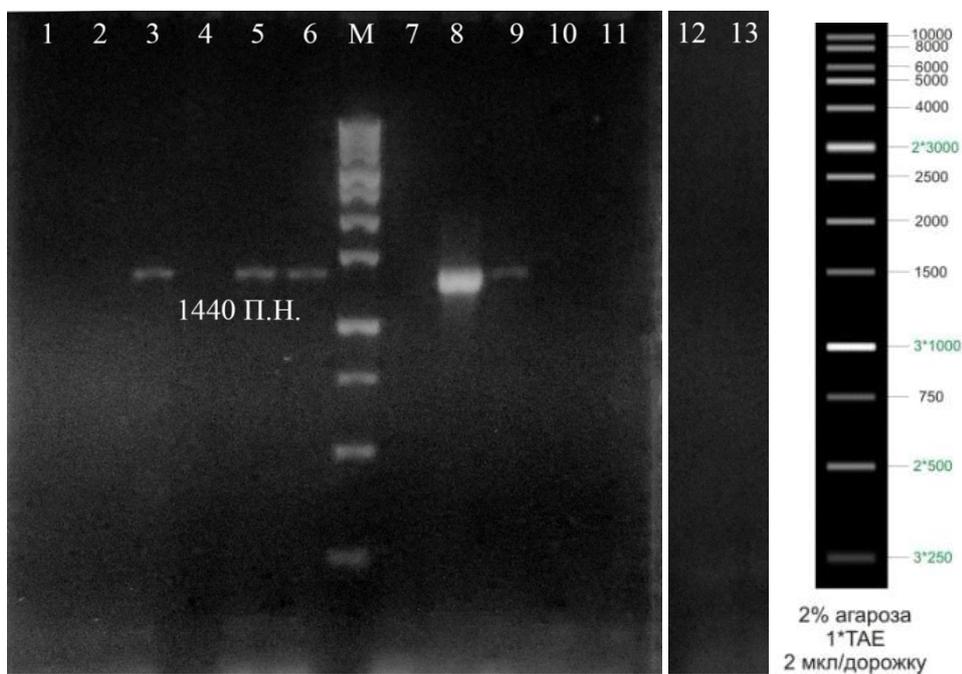


Рисунок 2 – Результаты типирования отдельных образцов фасоли с праймером SQ4 (Co-2): М – ДНК-маркер молекулярного веса 1Кб «Праймтех», 1 – Сакса б/в 615, 2 – Рант, 3 – Autan, 4 – Ребус, 5 – Asgrow 230 В, 6 – Дарина, 7 – Елизавета, 8 – Лаура, 9 – Fruhe Dickellischige Wachs, 10 – Маринка, 11 – Зинуля, 12 – Зничка, 13 – Магура

Таблица 5 – Результаты маркирования образцов фасоли обыкновенной на наличие генов устойчивости к антракнозу

Сорт	Ген (праймер)							
	<i>Co-1</i> ⁴ (CV54 2014)	<i>Phg-1</i> (TGA)	<i>Co-2</i> (SQ4)	<i>Co-4</i> ² (SAS13)	<i>Co-4</i> (SC08)	<i>Co-4</i> ² (SBB14)	<i>Co-6</i> (SZ04)	<i>Co-6</i> (SZ20)
Сакса б/в 615	–	+	–	+	–	+	+	+
Рант	–	+	–	+	–	+	+	+
Autan	–	+	+	+	–	+	+	+
Ребус	–	+	–	+	–	+	+	–
Asgrow 230 В	–	+	+	+	–	+	+	+
Дарина	–	+	+	+	–	+	+	+
Елизавета	–	+	–	+	–	+	+	+
Лаура	–	+	+	+	–	+	+	–
Fruhe Dickellischige Wachs	–	+	+	+	–	+	+	+
Маринка	–	+	–	+	–	+	+	+
Зинуля	–	+	–	+	–	+	+	+
Зничка	–	+	–	+	–	+	+	+
Магура	–	+	–	+	–	+	+	+

Примечание. «+» – наличие искомого бэнда, «–» – отсутствие искомого бэнда.

с праймером TGA отмечены у всех изученных сортов. При анализе продуктов амплификации с праймером CV542014 искомого бэнда (450 п. н.) не обнаружено.

Co-2. При анализе результатов электрофореза продукты амплификации ДНК-образцов фасоли с праймером SQ4 (ген *Co-2*) отмечены у всех изученных образцов зарубежной селекции (Autan, Asgrow 230В, Fruhe Dickellischige Wachs). У белорусских сортов (Зничка, Зинуля, Магура) бэнда размером 1 440 п. н. не обнаружено. Из изученных российских сортов фасоли только Дарина и Лаура несут ген *Co-2* в своем геноме.

Для определения наличия гена *Co-4* использовали праймеры SC08, SY20, для аллеля *Co-4*² – праймеры SAS13, SBB14. Наличие гена *Co-4* по праймеру SC08 у всех изученных образцов не отмечено, а по праймеру SY20 результаты имели много неспецифичных фрагментов, что не позволяет говорить о достоверности как наличия, так и отсутствия данного гена. Подтверждено наличие аллеля *Co-4*² у всех изученных образцов.

Co-6. При сравнительном изучении праймеров SZ04 и SZ20 к гену *Co-6* установлено наличие разных результатов амплификации. С праймером SZ04 все изученные образцы давали искомый бэнд (567 п. о.), тогда как с праймером SZ20 продуктов амплификации не отмечено у трех сортов – Ребус, Елизавета, Лаура.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально показано преимущество использования чашек Петри вместо рулонного метода для получения более достоверных данных по результатам воздействия патогена.

Установлен полиморфизм генотипов изученных образцов по генам антракнозостойчивости. В нашем опыте не выявлено наличия сцепления гена *Co-1⁴* с геном *Phg-1* у всех изученных сортов. Сорта зарубежной селекции Autan, Asgrow 230 B, Fruke Dickellische Wachs, имея в своем генотипе гены *Co-2*, *Co-4²* и *Co-6*, в лабораторных опытах с использованием суспензии спор патогенного гриба не показали признака устойчивости. Сорта белорусской селекции Зничка, Зинуля и Магура были определены как очень неустойчивые по проросткам и у них отмечено отсутствие гена *Co-2*. Среди изученных сортов российской селекции сорта Лаура и Сакса б/в 615 определены как среднеустойчивые по проросткам. У сорта Лаура отмечено наличие генов *Co-2*, *Co-4²* и *Co-6*. У сорта Сакса б/в 615 отмечено наличие *Co-4²* и *Co-6*, а средняя устойчивость может быть объяснена наличием других, не изучаемых нами генов устойчивости, поскольку из известных более чем 40 генов устойчивости к антракнозу мы изучали только четыре.

Отмеченные отдельные различия по результатам оценки образцов на устойчивость к антракнозу при анализе проростков и ДНК-маркирования могут быть обусловлены разнообразием изученных образцов, сочетанием разных генов и их аллелей, контролирующих устойчивость к антракнозу.

Список использованных источников

1. FAO [Electronic resource]. – Mode of access: <http://faostat.fao.org>. – Date of access: 06.08.2020.
2. Фасоль спаржевая в Беларуси / А. И. Чайковский [и др.]. – Минск : Типография ВЮА, 2009. – 168 с.
3. Исходный материал для селекции овощных зернобобовых культур в коллекции ВИР / М. А. Вишнякова [и др.] // Овощи России. – 2013. – № 1. – С. 16–25.
4. Genetic Mapping and QTL Analysis in Common Bean / A. M. Gonzalez [et al.] // The Common Bean Genome / M. Perez de la Vega, M. Santalla, F. Marsolais (eds.). – Springer, Cham. – 2017. – P. 69–107.
5. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma / S. A. de Lima Castro [et al.] // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18. – P. 306–317.
6. Barrus, M. F. An anthracnose-resistant red kidney bean / M. F. Barrus // Phytopathology. – 1915. – Vol. 5. – P. 303–311.
7. Melotto, M. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin / M. Melotto, J. D. Kelly // Euphytica. – 2000. – Vol. 116. – P. 143–149.
8. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277 / Alzate-Marin [et al.] // Annu. Rpt. Bean. Improv. Coop. – 2003. – Vol. 46. – P. 173–174.
9. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1⁴* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND277 / M. C. Goncalves-Vidigal [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2011. – Vol. 122. – P. 893–903.

10. Mastenbrock, C. A breeding program for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene / C. Mastenbrock // *Euphytica*. – 1960. – Vol. 9. – P. 177–184.
11. Tu, J. C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean. Population dynamics of the pathogen and breeding for resistance / J. C. Tu // *Colletotrichum: Biology, pathology and control* / J. A. Bailey, M. J. Jeger (eds.). – CAB Intl., Wallingford, U. K. – 1992. – P. 203–224.
12. Kelly, J. D. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean / J. D. Kelly, V. A. Vallejo // *HortScience*. – 2004. – Vol. 39, № 6. – P. 1191–1207.
13. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose / A. F. Adam-Blondon [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – Vol. 88. – P. 865–870.
14. Fouilloux, G. Bean anthracnose: New genes of resistance / G. Fouilloux // *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.* – 1976. – Vol. 19. – P. 36–37.
15. Marker – assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar “G2333” / R. A. Yong [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – Vol. 96. – P. 87–94.
16. Balardin, R. S. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America / R. S. Balardin, A. Jarosz, J. D. Kelly // *Phytopathology*. – 1997. – Vol. 87. – P. 1184–1191.
17. Balardin, R. S. Interaction among races of *Colletotrichum lindemuthianum* and diversity in *Phaseolus vulgaris* / R. S. Balardin, J. D. Kelly // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 1998. – Vol. 123. – P. 1038–1047.
18. Young, R. A. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars / R. A. Young, J. D. Kelly // *Plant Dis.* – 1996. – Vol. 80. – P. 650–654.
19. Inheritance of anthracnose resistance in common bean genotypes PI 207262 and AB 136 / M. C. Goncalves-Vidigal [et al.] // *Brazilian J. Genetics*. – 1997. – Vol. 20. – P. 59–62.
20. Menezes, J. R. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris* / J. R. Menezes, J. C. Dianese // *Phytopathology*. – 1988. – Vol. 78. – P. 650–655.
21. Application of Common Bean Anthracnose Resistance Gene SCAR Markers in Snap Bean Disease Resistance Identification / GU Yu [et al.] // *Acta Horticulturae Sinica*. – 2011. – Vol. 38, № 5. – P. 911–920.
22. Mapping of Gene Conferring Resistance to Anthracnose in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Molecular Markers / Ming-Li CHEN [et al.] // *Acta Agronomica Sinica*. – 2011. – Vol. 37, № 12. – P. 2130–2135.
23. NIE, Chu-chu. Research Progress of Kidney Bean Breeding in China / Chu-chu NIE, Yu-zhen HAN // *Journal of Changjiang Vegetables*. – 2011. – Vol. 2. – P. 1–5.
24. Mapping and genetic structure analysis of anthracnose resistance locus *Co-1^{HY}* in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) / M. Chen [et al.] // *PLoS One* 12(1):e016954 doi:10.1371/Journal.pone.0169954.

25. Якушева, А. С. Оценка люпина на устойчивость к антракнозу : метод. рекомендации / А. С. Якушева, Н. Н. Соловьянова. – Брянск, 2001. – 18 с.
26. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести : ГОСТ 12038-84. – Взамен ГОСТ 12038-66М ; утв. и введ. в действие постановлением Гос. ком. СССР по стандартам от 19.12.84 г. № 4710. – М. : Стандартиформ, 2011. – 64 с.
27. Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ культурных видов рода *Phaseolus* L. / Науч.-техн. совет стран – членов СЭВ по кол. диких и культур. видов растений и др. – Л. : ВИР, 1984. – 37 с.
28. SQ4 SCAR marker linked to the *Co-2* gene on B11 appears to be linked to the Ur 11f gene / H. S. Awale [et al.] // Annu. Rept. Bean Improv. Coop. – 2008. – Vol. 51. – P. 174–175.
29. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6* / V. T. Queiroz [et al.] // Annu. Rep. Bean Improv. Coop. – 2004. – Vol. 47. – P. 249–250.
30. Awale, H. E. Development of SCAR markers linked to *Co-4*² gene in common bean / H. E. Awale, J. D. Kelly // Annu. Report. Bean Improv. Coop. – 2001. – Vol. 44. – P. 119–120.

Поступила в редакцию 27 ноября 2020 г.

Yuting Xiao, I. B. Sauk, V. S. Anohina

USE OF SEEDLINGS AND DNA MARKERS FOR EVALUATION OF GARDEN BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) SAMPLES FROM THE VIR-COLLECTION FOR ANTHRACNOSE RESISTANCE

SUMMARY

*The research results of garden bean samples (*Phaseolus vulgaris* L.) to anthracnose resistance using seedlings and molecular testing for the *Co-1*⁴, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6* genes were presented. Roll method and Petri dishes were used for the seedlings analysis. The most reliable data were obtained using Petri dishes. Promising bean samples (*Saksa bez volokna 615* and *Laura*) were identified based on seedlings analyzes for anthracnose resistance and DNA-markers.*

Key words: anthracnose, genotype, DNA-marker, seedling, garden bean.