

УДК 581.19:575:224.2:635:631.52

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНЫХ ФОРМ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОРОСТКОВ СЕМЯН И ДНК-МАРКЕРОВ

Ю. СЯО¹⁾, В. С. АНОХИНА¹⁾, В. А. КАРПИЕВИЧ¹⁾, И. Б. САУК¹⁾, И. Ю. РОМАНЧУК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Приведены результаты изучения устойчивости к антракнозу разных форм фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) с использованием проростков и молекулярного тестирования по генам *Co-1⁴* и *Phg-1*. Выявлена разная реакция образцов на воздействие патогена. Выделены мутантные линии, содержащие в геноме гены *Co-1⁴* и *Phg-1*.

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

Благодарность. Исследования проведены при поддержке проекта по государственной программе научных исследований «Качество и эффективность агропромышленного производства» (подпрограмма 9.6 «Земледелие и селекция»).

THE STUDY DIFFERENT FORMS OF COMMON BEAN TO ANTHRACNOSE RESISTANCE USING SEEDLINGS AND DNA MARKERS

Yu. XIAO^a, V. S. ANOKHINA^a, V. A. KARPIEVICH^a, I. B. SAUK^a, I. Yu. ROMANCHUK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: V. S. Anokhina (anokhina@tut.by)

The results of study of various forms of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to anthracnose resistance using seedlings and molecular testing for the *Co-1⁴* and *Phg-1* genes were presented. The different responses of the samples

Образец цитирования:

Сяо Ю, Анохина ВС, Карпиевич ВА, Саук ИБ, Романчук ИЮ. Изучение разных форм фасоли обыкновенной по устойчивости к антракнозу с использованием проростков семян и ДНК-маркеров. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;2:60–69. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-60-69>

For citation:

Xiao Yu, Anokhina VS, Karpievich VA, Sauk IB, Romanchuk IYu. The study different forms of common bean to anthracnose resistance using seedlings and DNA markers. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;2:60–69. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-60-69>

Авторы:

Юйтин Сяо – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – В. С. Анохина.

Вера Степановна Анохина – кандидат биологических наук, доцент; заведующий сектором генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вадим Александрович Карпиевич – стажер младшего научного сотрудника сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Борисовна Саук – старший научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Юрьевна Романчук – старший научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Yutin Xiao, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

Vera S. Anokhina, PhD (biology), docent; head of the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology. anokhina@tut.by

Vadim A. Karpievich, probationer of junior researcher at the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

Irina B. Sauk, senior researcher at the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

Irina Yu. Romanchuk, senior researcher at the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

to the influence of the pathogen were revealed. The lines from mutant forms that had the *Co-1⁴* and *Phg-1* genes in their genomes were selected.

Keywords: anthracnose; genotype; seedling; DNA marker; common bean.

Acknowledgements. The studies were carried out with the support of the project under the Industrial scientific and technical programs «Quality and efficiency of agroindustrial production», 9.6 «Agriculture and selection».

Введение

Фасоль обыкновенная широко распространена в мировом земледелии, ее возделывают более чем в 70 странах в различных почвенно-климатических зонах. В мире общая площадь посевов культуры составляет около 27 млн га, из них 4,8 тыс. га находится в России. В [1] приведены данные о площадях возделывания фасоли на семена и на бобы технической спелости на территории Европейского союза в 2005–2007 гг. Максимальные площади под этой культурой заняты (соответственно направлению использования) в Румынии (более 60 тыс. га) и Италии (25 тыс. га). Снижение посевных площадей в ряде стран связано с отсутствием в генофонде зернобобовых культур генотипов, устойчивых к болезням и вредителям, а также форм с высоким адаптивным потенциалом. В связи с этим актуальность расширения генофонда фасоли и поиска доноров и источников устойчивости к стрессорам вполне закономерна, ибо прекращение возделывания бобовых культур может привести к серьезному дефициту растительного белка во многих странах мира [2].

Широкому распространению фасоли овощной препятствуют различные болезни и абиотические стрессоры, существенно снижающие (до 40 % и более) продуктивность растений и качество зерна. Наличием доноров и источников устойчивости определяется успех селекции. В повышении эффективности последней существенными являются подходы, при которых используются генетические маркеры в качестве критериев для отбора ценных генотипов. Поэтому для теоретического обоснования выделения генотипов с генами устойчивости к болезням и разработки новой стратегии селекции необходимо молекулярно-генетическое тестирование геномов.

Для фасоли характерны многие заболевания, в том числе связанные с действием разных патогенных грибов. Антракноз фасоли – широко распространенное вредоносное заболевание, вызываемое грибом *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav. Он повреждает все надземные части гороха, фасоли, чечевицы. При инфекции на листьях появляются пятна неправильной формы, желто-бурые, с темно-коричневой каймой. На бобах пятна темно-бурые, на стеблях – удлиненные, опоясывающие. В центре пятен образуется конидиальное спороношение гриба в виде оранжево-розовых или красноватых подушечек с многочисленными щетинками. Конидии – бесцветные, одноклеточные, прямые или слегка изогнутые (рис. 1).



Конидии – бесцветные, одноклеточные, прямые или слегка изогнутые (рис. 1).

Распространение патогена осуществляется конидиями в дождливую ветреную погоду. Оптимальная температура для развития заболевания 14–16 °С. Повышенная влажность воздуха и частые обильные осадки обуславливают сильное поражение растений антракнозом. Его развитию способствуют кислые почвы и загущенные посевы. При антракнозе у растений снижается урожайность и всхожесть семян, ухудшаются качественные характеристики зеленой массы и зерна [3].

У возбудителя антракноза фасоли известно 8 рас. Образцов, которые обладают устойчивостью ко всем расам, не обнаружено, но среди коммерческих сортов зарубежной селекции есть сорта, иммунные к 2–5 расам одновременно [4]. Установлено наличие около 40 генов устойчивости к антракнозу у культуры фасоли [5]. Первоначально было идентифицировано 19 доминантных генов устойчивости к антракнозу среди генофонда мезоамериканской фасоли и фасоли Анд. К мезоамериканским генам устойчивости отнесены *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*, к генам устойчивости Анд – *Co-1* (и его аллели *Co-1²*, *Co-1³*, *Co-1⁴*, *Co-1⁵*), *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *Co-x*, *Co-w*, *Co-y*, и *Co-z*. Гены устойчивости к антракнозу картированы в 7 из 11 хромосом фасоли. Некоторые из этих генов сцеплены в группы Pv01, Pv04, Pv11, которые содержат гены устойчивости не только

Рис. 1. Растение фасоли овощной, пораженное антракнозом (оригинальное фото)

Fig. 1. The plant of common beans affected by anthracnose (original photo)

к антракнозу, но и к другим болезням. Так, группа сцепления Pv01 содержит кластер генов устойчивости к антракнозу (*Co-1*, *Co-14*, *Co-x* и *Co-w*), ржавчине (*Ur-9*) и угловатой пятнистости (*Phg-1*) [6].

Киргизские сортоотыпы фасоли изучены на наличие генов устойчивости к антракнозу (*Co-2*) и к вирусу обыкновенной мозаики (BCMV). Их восприимчивость была проверена при инфицировании спорами рас 23 и 102 *C. lindemuthianum* и подтверждена отсутствием локуса *Co-2* при использовании молекулярных маркеров. Поскольку ген *Co-2* является основным ресурсом устойчивости к антракнозу как в Северной Америке, так и в Европе, авторами предпринята попытка переноса этого гена в киргизские сортоотыпы фасоли путем скрещивания с устойчивыми сортами Вайллант и Флаграно [7].

Молекулярно-генетическое тестирование коллекционных и селекционных образцов, культивируемых в Республике Беларусь, по указанным генам отсутствует. Ограничена информация по оценке генотипов фасоли на устойчивость к антракнозу в лабораторных условиях, прежде всего вновь созданных мутантов и интродуцируемых образцов. Наибольший интерес представляет изучение образцов фасоли на наличие гена устойчивости к антракнозу *Co-1⁴*, сцепленного с геном устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1* [8], а также генов устойчивости к антракнозу *Co-2* [9], *Co-4* [10], *Co-6* [11].

Эффективность выделения устойчивых к болезням образцов фасоли овощной зависит от разнообразия генофонда опытного материала, а также от надежных экспресс-методов диагностики перспективности генотипа у селекционных образцов. Генофонд фасоли увеличивается за счет как гибридизации, так и спонтанного и индуцированного мутагенеза. Увеличивается и полиморфизм возбудителя антракноза. Поэтому актуальны комплексные исследования коллекционных образцов на разных этапах онтогенеза растений в полевых и лабораторных условиях.

Цель работы – комплексная оценка по устойчивости к антракнозу различных по происхождению образцов фасоли обыкновенной с использованием проростков и молекулярно-генетического маркирования генотипов и выделение для селекции перспективного исходного материала.

Материалы и методы исследований

В эксперименте изучали проростки 3 сортов фасоли овощной (Паланачка ранняя, Секунда, Триумф сахарный) и 13 образцов, ранее отобранных из мутантных популяций разных поколений, полученных с использованием предпосевного γ -облучения семян ^{60}Co (мощность 0,36 Гр/с, экспозиция 9 мин, облучение в 2011 г.) указанных выше сортов (табл. 1).

Таблица 1

Образцы, использованные в исследовании

Table 1

List of samples used in the study

Название	Происхождение
Пр	Паланачка ранняя, исходный сорт сербской селекции
ПрМЗЛ2	Паланачка ранняя, мутантное поколение 3, линия 2
ПрМЗЛ3	Паланачка ранняя, мутантное поколение 3, линия 3
ПрМЗЛ4	Паланачка ранняя, мутантное поколение 3, линия 4
С	Секунда, исходный сорт российской селекции
СМ2Л1	Секунда, мутантное поколение 2, линия 1
СМ2Л2	Секунда, мутантное поколение 2, линия 2
СМ2Л3	Секунда, мутантное поколение 2, линия 3
СМ3Л1	Секунда, мутантное поколение 3, линия 1
СМ3Л2	Секунда, мутантное поколение 3, линия 2
Тс	Триумф сахарный, исходный сорт российской селекции
ТсМ1Л1	Триумф сахарный, мутантное поколение 1, линия 1
ТсМ3Л3	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 3
ТсМ3Л4	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 4
ТсМ3Л5	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 5
ТсМ3Л6	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 6

Для определения устойчивости к антракнозу использовали лабораторный метод оценки по проросткам [12]. Семена перед закладкой эксперимента дезинфицировали 70 % этиловым спиртом, промывали дистиллированной водой. В опытных вариантах семена инокулировали в течение 60 мин суспензией спор гриба *C. lindemuthianum*, споровая нагрузка которого составила $1,8 \cdot 10^5$ спор в 1 мл суспензии, затем промывали дистиллированной водой и закладывали в бумажно-полиэтиленовые рулоны, как и контрольные варианты (без воздействия патогена). Рулоны помещали в стерильные сосуды (растительные) с дистиллированной водой слоем 2–3 см, а сосуды – в термостат с температурой 23 °C на 4 сут. Затем их переносили на стеллажи и выдерживали еще 5 сут. Анализ проростков проведен на 9-е сутки. Определены длины корешка и гипокотили и процент поражения проростков. Данная методика разработана для культуры люпина. Нами модифицированы температурный режим и условия стерилизации семян для культуры фасоли. Выборка составила по 20 семян в контроле и опыте. Результаты эксперимента обработаны с использованием пакета программ *Excel*. Для различных независимых пар данных рассчитывали значение *t*-критерия Стьюдента. Проростки ранжированы по шкале устойчивости, представленной в табл. 2 [13].

Таблица 2

Шкала устойчивости

Table 2

Sustainability scale

Устойчивость	Поражение проростков, %
1 (очень низкая)	Более 50 (очень сильное)
3 (низкая)	26–50 (сильное)
5 (средняя)	11–25 (среднее)
7 (высокая)	2,5–10,0 (слабое)
9 (очень высокая)	Менее 2,5 (отсутствует или очень слабое)

Выделение ДНК проведено с помощью набора Plant DNA Preparation Kit (*Bioscience*, Германия). ПЦР выполняли с использованием праймеров CV542014 и TGA (табл. 3), синтезированных ОДО «Праймтех» (Беларусь). Продукты амплификации разделяли в 2 % агарозе при одновременном окрашивании бромистым этидием. Гели визуализировали в УФ-транслюминаторе. В работе применяли DNA-маркер молекулярного веса Ladder (*Fermentas*, Литва) и ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ОДО «Праймтех».

Таблица 3

Характеристика праймеров для исследования

Table 3

Characterization of primers for research

Ген	Праймер	Последовательность нуклеотидов 5' → 3'
<i>Co-1</i> ⁴	CV542014	F: cactttccactgacggattgaacc R: gcacaaggacaagtggattgg
<i>Phg-1</i>	TGA	F: cagaggatgcttctcacggt R: aagccatggatcccatttg

Результаты и их обсуждение

Из мутантных популяций сортов Паланачка ранняя, Секунда, Триумф сахарный были отобраны перспективные по продуктивности и морфотипу растений формы для оценки их устойчивости к антракнозу в лабораторных условиях по проросткам. Контролем служили проростки семян исходных сортов (Паланачка ранняя, Секунда и Триумф сахарный) и их отобранные мутантные линии разных поколений без обработки патогеном. Данные учетных параметров представлены на рис. 2, 3 и в табл. 4, 5. На рис. 2 изображена неустойчивая форма ПрМЗЛ4, на рис. 3 – устойчивая форма ТсМЗЛ4.



Рис. 2. Проростки семян мутантной линии ПрМ3Л4 без воздействия патогена (а) и после воздействия суспензии спор *C. lindemuthianum* (б)

Fig. 2. Seedlings of the mutant line PrM3L4 without (a) and after (b) influence of spore suspension of *C. lindemuthianum*

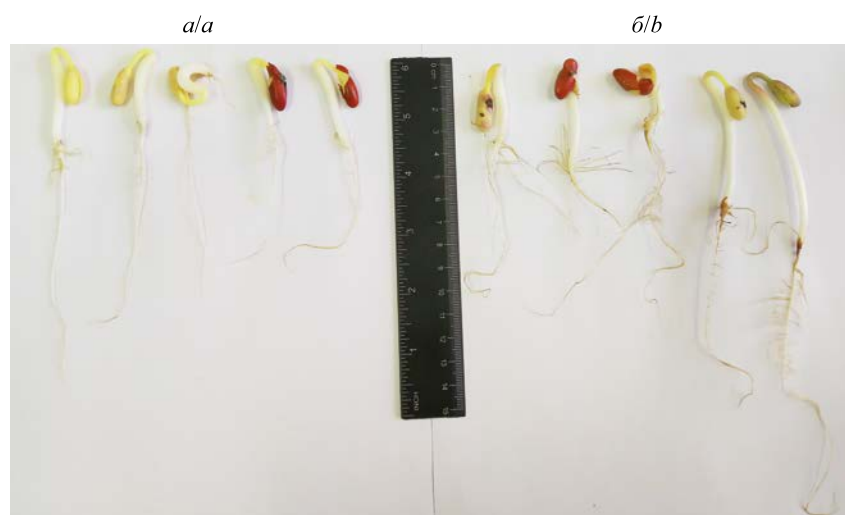


Рис. 3. Проростки семян мутантной линии ТсМ3Л4 без патогена (а) и после воздействия суспензии спор *C. lindemuthianum* (б)

Fig. 3. Seedlings of the mutant line TsM3L4 without (a) and after (b) influence of spore suspension of *C. lindemuthianum*

Таблица 4

Прорастание семян экспериментальных образцов фасоли

Table 4

Characteristics of the experimental samples of beans for germination of seeds

Наименование образца	Количество проросших семян, шт.		Прорастание, %	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
ПрМ3Л4	15	14	75	70
ПрМ3Л2	14	14	70	70
ПрМ3Л3	12	20	60	100
С	19	14	95	70
СМ2Л1	17	12	85	60
СМ2Л2	17	19	85	95

Окончание табл. 4
Ending table 4

Наименование образца	Количество проросших семян, шт.		Прорастание, %	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
СМ2Л3	19	18	95	90
СМ3Л1	18	20	90	100
СМ3Л2	20	14	100	70
Тессорт	17	19	85	95
ТсМ1Л1	15	15	75	75
ТсМ3Л3	14	20	70	100
ТсМ3Л4	18	20	90	100
ТсМ3Л5	6	10	30	50
ТсМ3Л6	3	7	15	35

Примечание. Контроль – без воздействия патогена, опыт – с воздействием патогена. Для прорастания взяты по 20 семян в контроле и опыте.

Используемые в опыте сорта и мутантные формы обладали хорошей всхожестью семян (от 30 до 100 %), за исключением линии ТсМ3Л6, у которой всхожесть была всего 15 %. В опытном варианте проявилась разная реакция семян на воздействие патогена среди изученных форм (от снижения всхожести в сравнении с контролем до 100 % прорастания). Причина такой разной реакции на обработку патогеном пока не выяснена. Дальнейший анализ полученных проростков по их поражаемости антракнозом выявил, что образцы опытных вариантов с 100 % всхожестью семян имели самый высокий балл устойчивости и, соответственно, самый низкий процент их поражаемости. Сорт Паланачка ранняя в табл. 4 не приведен, так как не дал репрезентативных результатов ни в контроле, ни в опыте.

Таблица 5

Устойчивость к антракнозу экспериментальных образцов фасоли

Table 5

Characteristics of the experimental samples of beans for resistance to anthracnose

Наименование образца	Длина ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), см				Поражаемость, %	Балл устойчивости
	Корешок		Гипокотиль			
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт		
ПрМЗЛ4	3,25 ± 0,59	2,81 ± 0,43	2,91 ± 0,24	3,35 ± 0,20	57,14	1
ПрМЗЛ2	2,51 ± 0,39	3,52 ± 0,74	3,19 ± 0,31	3,04 ± 0,37	35,71	3
ПрМЗЛ3	3,95 ± 0,75	4,97 ± 0,66	3,49 ± 0,45	4,63 ± 0,37	20,00	5
С	3,80 ± 0,72	3,99 ± 0,61	2,91 ± 0,34	3,06 ± 0,33	50,00	3
СМ2Л1	2,51 ± 0,41	2,49 ± 0,56	2,30 ± 0,10	2,85 ± 0,44	33,33	3
СМ2Л2	1,20 ± 0,24	5,26 ± 0,42*	1,78 ± 0,17	5,13 ± 0,42*	47,37	3
СМ2Л3	4,75 ± 0,62	3,94 ± 0,65	3,22 ± 0,29	2,89 ± 0,28	72,22	1
СМ3Л1	2,02 ± 0,31	4,12 ± 0,70*	2,08 ± 0,09	3,00 ± 0,28*	10,00	7
СМ3Л2	1,94 ± 0,20	3,21 ± 0,45	2,09 ± 0,10	3,55 ± 0,46	50,0	3
Тс	2,06 ± 0,35	3,44 ± 0,68	2,01 ± 0,16	2,64 ± 0,21	42,11	3
ТсМ1Л1	3,27 ± 0,71	2,78 ± 0,51	2,75 ± 0,18	2,74 ± 0,35	40,00	3
ТсМ3Л3	3,30 ± 0,55	6,75 ± 0,64*	4,03 ± 0,63	5,16 ± 0,56*	0	9
ТсМ3Л4	4,35 ± 0,74	6,52 ± 0,43*	3,89 ± 0,49	6,60 ± 0,45*	0	9
ТсМ3Л5	0,88 ± 0,24	5,12 ± 0,73*	1,43 ± 0,29	2,74 ± 0,32*	70,00	1
ТсМ3Л6	0,43 ± 0,13	1,94 ± 0,49	2,20 ± 0,29	2,64 ± 0,42	100,00	1

Примечание. Контроль – без воздействия патогена, опыт – с воздействием патогена. * – разница с контролем достоверна при $p \geq 0,01$.

Наибольшие баллы устойчивости к антракнозу среди изученных образцов фасоли овощной отмечены у ТсМЗЛЗ, ТсМЗЛ4 и СМЗЛ1, длина корешка и длина гипокотилия у которых в опыте достоверно превосходили контроль. О меньшей устойчивости проростков свидетельствует как снижение длины одного из показателей (либо длины корешка, либо длины гипокотилия) в опытных вариантах по отношению к контролю, так и равенство этих показателей в контроле и опыте. В двух вариантах: СМЗЛ2 и ТсМЗЛ5 – получены ложноположительные результаты, что, возможно, связано с внутренней инфекцией семян и подтверждается как процентом прорастания семян в контроле (табл. 4), так и замедлением ростовых процессов корешков мутантных образцов по отношению к исходному сорту (табл. 5).

Опытные образцы изучали на наличие гена устойчивости к антракнозу *Co-1^r* и сцепленного с ним гена устойчивости к угловой пятнистости *Phg-1*. Результаты исследований представлены на рис. 4, 5 и в табл. 6.

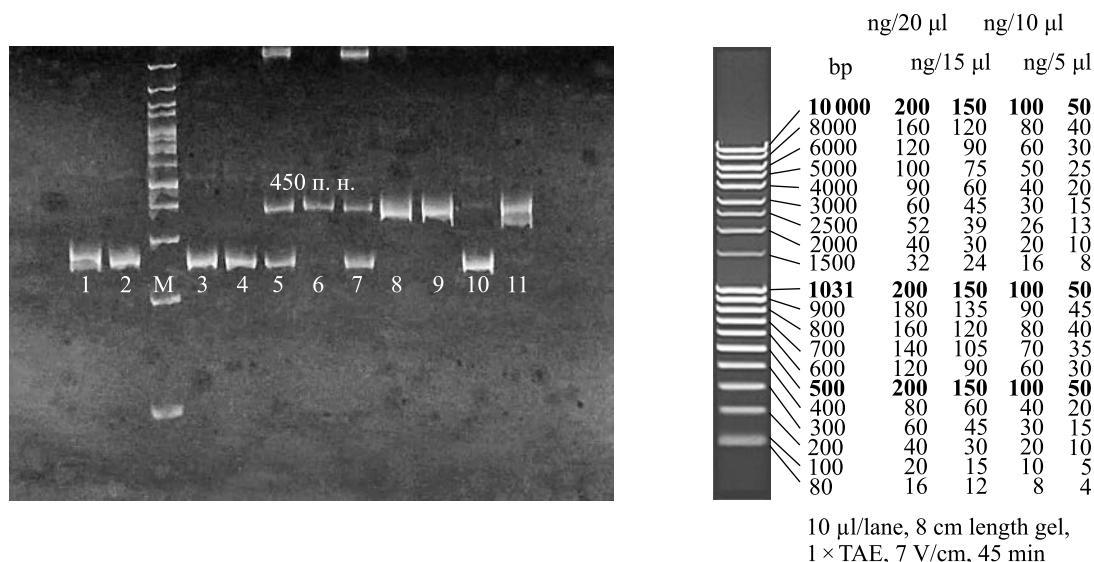


Рис. 4. Результаты типирования отдельных образцов фасоли обыкновенной с праймером CV542014: М – ДНК-маркер молекулярного веса Ladder *Fermentas*; 1 – ТсМЗЛ6; 2 – Тс; 3 – С; 4 – СМЗЛ2; 5 – Пр; 6 – ПрМЗЛ4; 7 – ПрМЗЛ2; 8 – ТсМЗЛ3; 9 – ТсМЗЛ4; 10 – ТсМЗЛ5; 11 – ПрМЗЛ3

Fig. 4. Results of typing individual samples of common bean with primer CV542014:
М – DNA molecular weight marker Ladder *Fermentas*; 1 – ТсМЗЛ6; 2 – Тс; 3 – С; 4 – СМЗЛ2; 5 – Пр; 6 – ПрМЗЛ4; 7 – ПрМЗЛ2; 8 – ТсМЗЛ3; 9 – ТсМЗЛ4; 10 – ТсМЗЛ5; 11 – ПрМЗЛ3

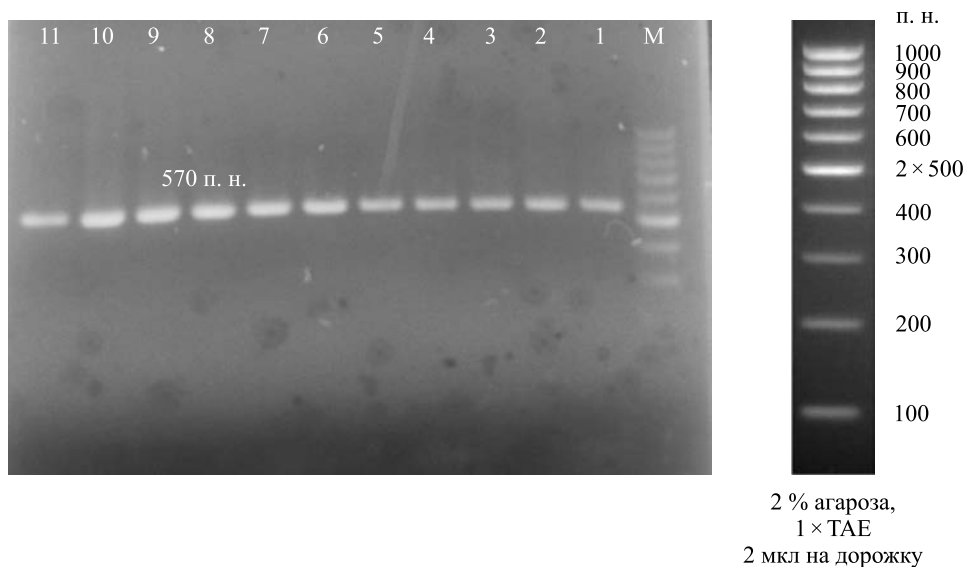


Рис. 5. Результаты типирования отдельных образцов фасоли обыкновенной с праймером TGA: М – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp; 1 – Пр; 2 – ПрМЗЛ4; 3 – ПрМЗЛ3; 4 – ПрМЗЛ2; 5 – С; 6 – СМЗЛ2; 7 – Тс; 8 – ТсМЗЛ3; 9 – ТсМЗЛ4; 10 – ТсМЗЛ5; 11 – ТсМЗЛ6

Fig. 5. Results of typing individual samples of common bean with primer TGA:
М – DNA molecular weight marker 100 bp; 1 – Пр; 2 – ПрМЗЛ4; 3 – ПрМЗЛ3; 4 – ПрМЗЛ2; 5 – С; 6 – СМЗЛ2; 7 – Тс; 8 – ТсМЗЛ3; 9 – ТсМЗЛ4; 10 – ТсМЗЛ5; 11 – ТсМЗЛ6

Таблица 6

Результаты изучения образцов фасоли обыкновенной по устойчивости к антракнозу с использованием проростков и ДНК-маркеров

Table 6

Results of study of common bean samples for resistance to anthracnose using seedlings and DNA markers

Наименование образца	Балл устойчивости к антракнозу	Результаты маркирования	
		Ген <i>Co-1⁴</i>	Ген <i>Phg-1</i>
Пр	—	+	+
ПрМЗЛ4	1	+	+
ПрМЗЛ2	3	+	+
ПрМЗЛ3	5	+	+
С	3	—	+
СМ2Л1	3	—	+
СМ2Л2	3	—	+
СМ2Л3	1	—	+
СМ3Л1	7	—	+
СМ3Л2	3	—	+
Тс	3	—	+
ТсМ1Л1	3	—	+
ТсМЗЛ3	9	+	+
ТсМЗЛ4	9	+	+
ТсМЗЛ5	1	—	+
ТсМЗЛ6	1	—	+

По данным молекулярного тестирования с праймером CV542014 к гену устойчивости к антракнозу *Co-1⁴*, аллель устойчивого генотипа (450 п. н.) выявлен у мутантных линий, полученных на основе сорта Паланачка ранняя. У сорта Секунда, как и у его мутантов, такого бэнда устойчивости к антракнозу не выявлено. У сорта Триумф сахарный и у трех мутантных линий (ТсМ1Л1, ТсМЗЛ5 и ТсМЗЛ6) данного бэнда устойчивости к антракнозу не выявлено, тогда как у двух линий (ТсМЗЛ3 и ТсМЗЛ6) отмечено его наличие. Это может быть связано как с гибридной родословной сорта Триумф сахарный, так и с возможным переопылением растений; не исключено и проявление обратных мутаций.

По данным молекулярного тестирования с праймером TGA к гену устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1*, аллель устойчивого генотипа (570 п. н.) выявлен у всех мутантных линий и исходных сортов фасоли (рис. 5).

Среди изученных мутантных линий, полученных от сорта Секунда, по результатам молекулярного маркирования установлено наличие гена *Phg-1* и не установлено наличие *Co-1⁴*. По величине оценки проростков отмечена форма СМЗЛ1, у которой устойчивость составила 7 баллов. Это свидетельствует о возможности присутствия в геноме данной формы других генов устойчивости к антракнозу и требует маркирования еще и по генам *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*.

Для сорта Триумф сахарный отмечены очень неустойчивые мутантные линии (1 балл): ТсМЗЛ5 и ТсМЗЛ6. У первой формы искомые гены (*Co-1⁴* и *Phg-1*) не выявлены, у второй есть эти гены, но их недостаточно для полной устойчивости. Очень высокая устойчивость (9 баллов) отмечена у двух линий: ТсМЗЛ3 и ТсМЗЛ4, у которых зафиксированы вышеупомянутые гены. Столь высокая устойчивость, определенная по проросткам, свидетельствует, по-видимому, о наличии и других генов устойчивости к антракнозу.

Среди изученных образцов присутствие обоих генов (*Co-1⁴* и *Phg-1*) установлено у всех мутантных популяций, полученных от сорта Паланачка ранняя, и у двух мутантных линий (ТсМЗЛ3 и ТсМЗЛ4) от сорта Триумф сахарный.

Совпадение показателей оценки по проросткам и молекулярного тестирования геномов форм ТсМЗЛ3 и ТсМЗЛ4 позволяет выделить их как перспективный исходный материал для селекции фасоли на антракнозостойчивость в качестве источников этой устойчивости. Формы, определенные как

неустойчивые по проросткам, но имеющие ген *Co-1⁴*, могут служить источником для гибридизации в целях получения полигенных генотипов по комплексу генов устойчивости.

Заключение

Комплексная оценка (оценка устойчивости по проросткам и молекулярное тестирование генотипов) образцов фасоли и их мутантных линий разных поколений позволила выделить перспективные для селекции генотипы ТсМЗЛЗ и ТсМЗЛ4 по устойчивости к антракнозу.

В случае несовпадения результатов оценки устойчивости к антракнозу (по проросткам) с данными типирования генотипов фасоли на наличие гена *Co-1⁴* возникает необходимость оценки этих образцов на присутствие других генов, детерминирующих устойчивость к антракнозу, и учета устойчивости растений этих образцов в полевых условиях.

Библиографические ссылки

1. Prusinski J. Rosliny strączkowe w Unii Europejskiej. *Zeszyty problemowe postępow nauk rolniczych*. 2010;550:11–19.
2. Чайковский АН, Аутко АА, Янковская ГП, Досина ЕС, Пироговская ГВ, Прищепа ИА и др. *Фасоль спаржевая в Беларуси*. Минск: Институт овощеводства; 2009. 168 с.
3. Болезни зернобобовых культур [Интернет]. 2010 [процитировано 29 марта 2012 г.]. Доступно по: <http://www.syngenta.com/country/kz/ru/products/legumes/diseases/Pages/home2.aspx>.
4. Чекалин НМ. *Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам*. Полтава: Интерграфика; 2003. 186 с.
5. Gonzalez AM, Yuste-Lisbona FJ, Fernandez-Lozano A, Lozano R, Santalla M. Genetic mapping and QTL analysis in common bean. In: Perez de la Vega M, Santalla M, Marsolais F, editors. *The Common Bean Genome*. Cham: Springer; 2017. p. 69–107. DOI: 10.1007/978-3-319-63526-2_4.
6. de Lima Castro SA, Gonçalves-Vidigal MC, Gilio TAS, Lacanallo GF, Valentini G, da Silva Ramos Martins V, et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. *BMC Genomics*. 2017;18:306–317. DOI: 10.1186/s12864-017-3685-7.
7. Асаналиев АЖ, Хегай СВ. Идентификация и введение генов устойчивости в культивируемые сорта фасоли в Кыргызстане. *Вестник Кыргызского национального аграрного университета*. 2014;2(31):131–141.
8. Goncalves-Vidigal MC, Cruz AS, Garcia A, Kami J, Vidigal Filho PS, Sousa LL, et al. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1⁴* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND₂₇₇. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;122(5):893–903. DOI: 10.1007/s00122-010-1496-1.
9. Geffroy V, Creusot F, Falquet J, Sévignac M, Adam-Blondon A-F, Bannerot H, et al. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998;96(3–4):494–502. DOI: 10.1007/s001220050766.
10. Burt AJ, William HM, Perry G, Khanal R, Pauls KP, Kelly JD, et al. Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139450. DOI: 10.1371/journal.pone.0139450.
11. Alzate-Marin AL, Menarim H, Chagas JM, Gonçalves de Barros E, Moreira MA. Identification of RAPD markers linked to *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean cultivar AB 136. *Genetics and Molecular Biology*. 2000;23(3):633–637. DOI: 10.1590/s1415-47572000000300023.
12. Якушева АС, Соловьянова НН. *Оценка люпина на устойчивость к антракнозу. Методические рекомендации*. Брянск: ВНИИ люпина; 2001. 18 с.
13. *Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ культурных видов рода Phaseolus L.* Ленинград: ВИР; 1984. 37 с.

References

1. Prusinski J. Rosliny strączkowe w Unii Europejskiej. *Zeszyty problemowe postępow nauk rolniczych*. 2010;550:11–19.
2. Chaikovskii AN, Autko AA, Yankovskaya GP, Dosina ES, Pirogovskaya GV, Prishchepa IA, et al. *Fasol'sparzhevaya v Belarusi* [Asparagus beans in Belarus]. Minsk: Institut ovoshchevodstva; 2009. 168 p. Russian.
3. Diseases of leguminous crops [Internet]. 2010 [cited 2012 March 29]. Available from: <http://www.syngenta.com/country/kz/ru/products/legumes/diseases/Pages/home2.aspx>. Russian.
4. Chekalin NM. *Geneticheskie osnovy selektsii zernobobovykh kul'tur na ustoichivost' k patogenam* [Genetic basis of breeding leguminous crops for resistance to pathogens]. Poltava: Intergrafika; 2003. 186 p. Russian.
5. Gonzalez AM, Yuste-Lisbona FJ, Fernandez-Lozano A, Lozano R, Santalla M. Genetic mapping and QTL analysis in common bean. In: Perez de la Vega M, Santalla M, Marsolais F, editors. *The Common Bean Genome*. Cham: Springer; 2017. p. 69–107. DOI: 10.1007/978-3-319-63526-2_4.
6. de Lima Castro SA, Gonçalves-Vidigal MC, Santana Gilio TA, Lacanallo GF, Valentini G, da Silva Ramos Martins V, et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. *BMC Genomics*. 2017;18:306–317. DOI: 10.1186/s12864-017-3685-7.
7. Asanaliyev AZh, Khagai SV. [Identification and introduction of resistance genes to cultivated varieties of beans in Kyrgyzstan]. *Vestnik Kyrgyzskogo natsional'nogo agrarnogo universiteta*. 2014;2(31):131–141. Russian.

8. Goncalves-Vidigal MC, Cruz AS, Garcia A, Kami J, Vidigal Filho PS, Sousa LL, et al. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1⁴* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND₂₇₇. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;122(5):893–903. DOI: 10.1007/s00122-010-1496-1.
9. Geffroy V, Creusot F, Falquet J, Sévignac M, Adam-Blondon A-F, Bannerot H, et al. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998;96(3–4):494–502. DOI: 10.1007/s001220050766.
10. Burt AJ, William HM, Perry G, Khanal R, Pauls KP, Kelly JD, et al. Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139450. DOI: 10.1371/journal.pone.0139450.
11. Alzate-Marin AL, Menarim H, Chagas JM, Gonçalves de Barros E, Moreira MA. Identification of RAPD markers linked to *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean cultivar AB 136. *Genetics and Molecular Biology*. 2000;23(3):633–637. DOI: 10.1590/s1415-47572000000300023.
12. Yakusheva AS, Solov'yanova NN. *Otsenka lyupina na ustoichivost' k antraknozu. Metodicheskie rekomendatsii* [Evaluation of Lupine for resistance to anthracnose. Methodical recommendations]. Bryansk: Vserossiiskii nauchno-issledovatel'skii institut lyupina; 2001. 18 p. Russian.
13. *Shirokii unifikirovannyi klassifikator SEV i mezhdunarodnyi klassifikator SEV kul'turnykh vidov roda Phaseolus L.* [The wide unified descriptor of the CMEA and the international descriptor of the CMEA of cultural species of the genus *Phaseolus* L.]. Leningrad: VIR; 1984. 37 p. Russian.

Статья поступила в редакцию 14.05.2019.
Received by editorial board 14.05.2019.