

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-2-75-81>
УДК 635.63:632.938.1:631.523.13

Д.Д. Теплякова

ООО "Гибрид"

Россия, Краснодарский край, Крымский район,
х. Новоукраинский,
тер. Новоукраинский, 1, пом. 1

*Адрес для переписки:

ira.kalinovskaya@mail.ru

Конфликт интересов. Автор заявляет
об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Теплякова Д.Д.

Эффективность использования генетического
маркера *F295* для оценки устойчивости образ-
цов огурца к вирусу зеленой крапчатой мозаи-
ки (*ВЗКМО*). *Овощи России*. 2023;(2):75-81.

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-2-75-81>

Поступила в редакцию: 01.02.2023

Принята к печати: 20.03.2023

Опубликована: 03.04.2023

Daria D. Teplyakova

LLC "Hybrid"

ter. Novoukrainsky 1, office 1 Kh. Novoukrainsky,
Krymsky District, Krasnodar kray, Russia

*Correspondence: ira.kalinovskaya@mail.ru

Conflict of interest: The author declare that they
have no conflict of interest.

For citations: Teplyakova D.D. The effectiveness
of the use of the genetic marker *F295* to assess
the resistance of cucumber samples to the green
mottled mosaic virus (*CGMMV*). *Vegetable crops
of Russia*. 2023;(2):75-81. (In Russ.)

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-2-75-81>

Received: 01.02.2023

Accepted for publication: 20.03.2023

Published: 03.04.2023

Эффективность использования генетического маркера *F295* для оценки устойчивости образцов огурца к вирусу зеленой крапчатой мозаики (*ВЗКМО*)



Резюме

Актуальность. Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (*ВЗКМО/CGMMV*) является узкоспециализированным вирусом (группа *Tobamovirus*). Он является существенной угрозой для тыквенных культур. На высоком инфекционном фоне потери урожая огурца как в открытом, так и защищенном грунте могут быть близки к 100%. Распространение вируса происходит многими способами. Самым опасным является заражённый семенной материал. Один из эффективных методов профилактики *ВЗКМО* – создание генетически устойчивых гибридов к вирусным заболеваниям. Был проведен опыт для определения эффективности применения маркера *F295* для отбора устойчивых образцов.

Результаты. При сопоставлении результатов определения устойчивости на искусственном фоне и результаты ПЦР анализа по этим же образцам рассчитали эффективность работы генетического маркера *F295*, которая составила 65%. Так, уровень эффективности средний, для более объективной оценки необходимо создание другого – основного маркера, который будет определять прямое наличие устойчивости именно к *ВЗКМО*. Применение маркера *F295* актуально в сочетании с другими методами определения устойчивости, что позволит ускорить и повысить эффективность селекционного процесса.

Ключевые слова: огурец, родительские линии гибридов, вирус зеленой крапчатой мозаики огурца *CGMMV*, генетические маркеры, ПЦР-анализ

The effectiveness of the use of the genetic marker *F295* to assess the resistance of cucumber samples to the green mottled mosaic virus (*CGMMV*)

Abstract

Relevance. Cucumber green mottled mosaic virus (*CGMMV*) is a highly specialized virus (group *Tobamovirus*). It is a significant threat to cucurbits. On a high infectious background, cucumber yield losses, both in open and protected ground, can be close to 100%. The spread of the virus occurs in many ways. The most dangerous is the infected seed material. One of the effective methods of preventing *CGMMV* is the creation of genetically resistant hybrids to viral diseases. An experiment was conducted to determine the effectiveness of the use of the marker *F295* for the selection of resistant samples.

Results. When comparing the results of determining resistance against an artificial background and the results of PCR analysis for the same samples, we calculated the efficiency of the genetic marker *F295*, which was 65%. Since the level of effectiveness is average, for a more objective assessment, it is necessary to create another – the main marker, which will determine the direct presence of resistance to *CGMMV*. The use of the *F295* marker is relevant in combination with other methods for determining resistance, which will speed up and increase the efficiency of the breeding process.

Keywords: cucumber, parental lines, cucumber green mottled mosaic virus *CGMMV*, genetic markers, PCR-analysis

Введение

Вирус крапчатой мозаики огурца (*CGMMV/ВЗКМО*) является узкоспециализированным вирусом группы *Tobamovirus* и весомой угрозой для тыквенных культур. На огурце в открытом и защищенном грунте, при сильном инфекционном фоне потери урожая могут быть близки к 100%. [1]

ВЗКМО впервые был описан в 1935 году в Великобритании, и достаточно быстро был далее идентифицирован во многих точках по всему миру [2].

ках, на поверхностях сельскохозяйственных сооружений и оборудовании, даже в экстремальных климатических условиях [3].

Если гибрид не имеет устойчивости и его семена были заражены, то первые симптомы проявятся уже через 2-3 недели после появления всходов [4].

Выбирая генетически устойчивые к вирусным заболеваниям гибриды, можно значительно снизить риск поражение вирусом. Ускорить и повысить качество селекционной работы по созданию устойчивых гибридов поз-



Рис. 1. Симптомы поражения растений огурца ВЗКМО
Fig. 1. Symptoms of detection of cucumber plants CGMMV

Первые симптомы проявляются на молодых листьях в виде выпуклых темно-зеленых пятен неровной формы. По мере разрастания листьев пятна становятся менее четкими. При высоком уровне освещения и высокой температуре *ВЗКМО* может проявиться в виде увядающих листьев, похожих по симптомам на корневые увядания, но при этом корневая система не повреждена.

Первично вирус переносится зараженным семенным материалом. Это способствует быстрому территориальному распространению, и массовому поражению. Длительное время он сохраняется в растительных остат-

воляет применение молекулярных ДНК-маркеров путем прямой идентификации наличия генов устойчивости [5].

На сегодняшний день в нашей работе нет доступного генетического маркера, позволяющего определять напрямую наличие устойчивости к *ВЗКМО*, но есть генетический маркер *F295* определяющий наличие генов устойчивости к вирусу пожелтения жилок огурца (*CVYV*). В некоторых литературных источниках встречается информация о том, что данный маркер предположительно косвенно показывает наличие устойчивости и к *ВЗКМО* [6, 7]. В предварительном опыте результат оценки работы маркера показал эффективность 94%.

Цель работы:

- проверить эффективность использования генетического маркера *F295* для определения устойчивости материала к *ВЗКМО*.

Для достижения цели были поставлены задачи:

1. Оценить визуально степень поражения *ВЗКМО* родительских линий огурца на искусственном инфекционном фоне.

2. Определить наличие генов устойчивости у линейного материала, используя маркер *F295* по итогам ПЦР-анализа.

3. Проанализировать взаимосвязь между результатами ПЦР-анализа по маркеру *F295* и объективной визуальной оценкой устойчивости к *ВЗКМО*.

Материалы и методы

В 2021-2022 годах на базе ООО «НИИСОК» в г. Крымске было заложено три опыта для определения наличия генетической устойчивости к *ВЗКМО* у изучаемых образцов огурца. В каждом опыте оценили устойчивость методом искусственного заражения *ВЗКМО* и путем проведения ПЦР-анализа, используя генетический маркер *F295*. Опыт был повторен трижды в разных условиях для того чтобы исключить влияние факторов внешней среды, и чётче выявить генетическую компоненту устойчивости.

В каждом опыте образцы высевали в двух повторностях по 4 растения в каждой. Три растения в повторности заражали, а четвертое оставляли в качестве контроля, не обработанным. Степень поражения визуально оценивали независимо друг от друга три сотрудника лаборатории селекции тыквенных культур, заранее обговорив шкалу оценки, которую определили исходя из имеющихся литературных источников.

Принятые единые международные шкалы, для учетов степени поражения и устойчивости к болезням, позволяющие не только оценивать образцы, но и максимально унифицировать результаты оценки предусматривают интервалы от 1 до 9 баллов, где 1 – самое слабое проявление признака, а 9 – максимальное [7].

По методике ВНИИССОК изложенной в методических указаниях «Оценка и отбор огурца на устойчивость к вирусу зеленой крапчатой мозаики» (1990) описывается методика при визуальной оценке, в два этапа.

На первом этапе оценивают растительный материал через 15-20 дней после инокуляции и позволяет отбраковать очень восприимчивые образцы, так как на относительно устойчивых растениях признаки поражения проявляются позднее. И оценку проводят по 4-балльной шкале:

1 – отсутствие у растений визуальных симптомов болезни. Необходима проверка на скрытое вирусоносительство;

2 – слабая мозаичная расцветка верхушечных листьев, задержка роста визуально незаметна;

3 – мозаика листьев среднего яруса, слабая гофрированность листьев, незначительная задержка роста;

4 – резко выраженная мозаика, сильная гофрированность и деформация листьев, поражена точка роста.

На втором этапе визуальную оценку проводят в

конце вегетации с учетом применения диагностических методов по 3-балльной шкале:

- устойчивые, визуальных симптомов нет;

- относительно устойчивые, визуальных симптомов мозаики нет или слабые симптомы в конце вегетации;

- восприимчивые, четкие симптомы мозаики, возможны деформация и измельчение плодов и листьев [9].

Данную методику мы использовали как основу при оценке материала. Но для ускорения селекционного процесса нам необходимо было разработать свой экспресс метод, который в сжатые сроки и на большом количестве образцов (то есть при максимальном сокращении растений в каждой делянке), позволит отбраковать сильно восприимчивый к *ВЗКМО* материал, до высадки растений в теплицы. Сроки выращивания оцениваемого материала были сокращены от всходов до появления первых симптомов вируса, также был уменьшен и объём оцениваемого материала на каждой делянке до четырех растений.

Полученные данные обрабатывали в программе Excel.

Посев первого опыта был проведен 25.06.21, второго – 30.11.21 и третьего – 15.11.22 гг. В каждом опыте было изучено 46 образцов, 2 стандарта: устойчивый гибрид к *ВЗКМО* (по данным каталога фирмы RZ) F₁ Бьерн и не устойчивая родительская линия (по многолетним данным одна из первых поражается *ВЗКМО*) Гретта и 44 изучаемых родительских линий.

Семена высевали в кассеты для рассады с торфяным грунтом. Для искусственного заражения был выбран метод механической инокуляции соком пораженных растений. Данный способ является очень простым и действенным, что не раз подтверждалось в процессе работы. Собранные листья с четко проявленными признаками *ВЗКМО* растёрли в фарфоровой ступке с добавлением 0,03М фосфатного буфера [10]. Полученную суспензию использовали сразу после приготовления. В ходе отработки методики было выявлено, что длительное (более 6 месяцев) замораживание листьев или готового инокулята приводит к снижению его эффективности. Заражение проводили путем втирания суспензии вирусных частиц в семядоли на 3-й день после всходов [11]. Всего на 1 растение использовали в среднем 0,3 мл суспензии. В оптимальных условиях появление явных признаков поражения *ВЗКМО* приходилось на фазу 3-4 листьев. Появление признаков *ВЗКМО* зависит от скорости роста и развития растений. Оптимальная температура окружающей среды для заражения – 26...28°C ночью и 30...35°C днем, в данных условиях первые симптомы проявлялись на 11 день после инокуляции [12].

Результаты

Четырехбалльную шкалу оценки устойчивости к *ВЗКМО* из [9] преобразовали следующим образом:

0 – отсутствие симптомов, обработанные растения равны контролю;

1 – балл, отсутствуют симптомы, но растения угнетены по сравнению с контролем;

2 – балла, явное поражение вирусом, то есть на самом молодом листе появляются симптомы *ВЗКМО* (рисунок 2)



Рис. 2. Явное поражение вирусом, (оценивалось 2 баллами)
Fig. 2. Explicit virus infection, (assessed as 2 points)



Рис. 3. Сильное поражение вирусом, (оценивалось 3 баллами)
Fig. 3. Severe virus infection, (estimated 3 points)

3 – балла, сильное поражение, на двух и более листьях проявились признаки ВЗКМО (рисунок 3)

В ходе дальнейшей статистической обработки данных, когда высчитывали средний балл для каждого образца, оказалось, что разница в баллах между 0 и 1 и между 2 и 3, существенно отличается друг от друга. Разница в первом случае (между 0 и 1) более значима, чем во втором (между 2 и 3). Для нас было важнее выделить не пораженные образцы, так как и средне и сильно пораженные являются восприимчивыми и в дальнейшем исключаются из работы. В связи с этим балл 3 исключили из методики проведения опыта. Это позволило получить более объективные значения средних, при вычислении по каждому генотипу.

Проведение трех опытов в разных условиях позволило получить в результате объективные данные по степени генетической устойчивости изучаемых образцов. Во всех трех опытах у восприимчивого к ВЗКМО стандарта поражались в каждой повторности все обработанные растения и были оценены 2 баллами, с явными признаками ВЗКМО. Стандарт с заявленной устойчивостью показал отличный результат и только в одном опыте одно растение из 18 оценили 1 баллом, остальные 0. Оценка остальных родительских линий в различных вариантах опыта в целом совпадала, варьировали только баллы в степени толерантности.

По результатам визуальной оценки во всех опытах рассчитали средний балл поражения для каждой роди-

Таблица 1. Сводная таблица визуальной оценки по трёхбалльной шкале поражения растений огурца ВЗКМО на искусственном фоне
Table 1. Summary table of visual assessment on a three-point scale of damage to cucumber plants CGMMV against an artificial background

| № | 1 оценивающий | | | | | 2 оценивающий | | | | | 3 оценивающий | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----------------|---|---|-----------|----|-----------------|---|---|-----------|----|-----------------|---|---|-----------|----|-----------------|---|---|-----------|---|----|---|---|---|---|
| | Номера растений | | | | № | Номера растений | | | | № | Номера растений | | | | № | Номера растений | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 (КОНТ.) | | 1 | 2 | 3 | 4 (КОНТ.) | | 1 | 2 | 3 | 4 (КОНТ.) | | 1 | 2 | 3 | 4 (КОНТ.) | | | | | | |
| 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 47 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 47 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 47 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 49 | 2 | 2 | 2 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 49 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 |
| 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 50 | 1 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 50 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 51 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 51 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 2 | 2 | 2 | 0 | 52 | 2 | 1 | 0 | 0 | 6 | 2 | 2 | 2 | 0 | 52 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 6 | 2 | 2 | 2 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 2 | 0 | 0 | 54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 9 | 0 | 2 | 2 | 0 | 55 | 1 | 2 | 0 | 0 | 9 | 0 | 2 | 2 | 0 | 55 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 2 | 2 | 0 |
| 10 | 2 | 0 | 0 | 0 | 56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 56 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 1 | 1 | 1 | 0 | 57 | 1 | 0 | 0 | 0 | 11 | 2 | 0 | 0 | 0 | 57 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 58 | 2 | 2 | 1 | 0 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 58 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 12 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 |

*- в статье представлен фрагмент таблицы

тельской линии. В 99% случаев на четвертом контрольном – не обработанном растении признаков поражения не было выявлено, т.е. инфекция привносилась не семенами, а при искусственном заражении.

По данным трех опытов рассчитали ранговые коэффициенты корреляции Спирмена для средних значений. В таблице 2 представлены данные первых двух опытов. Далее провели такие же расчеты для второго и третьего опыта. Под номерами 1 и 46 контроли, которые стабильно показали устойчивость и восприимчивость соответственно.

$$r_{1-2} = 1 - 6 \frac{\sum(d^2)}{N \times (N^2 - 1)} = (1 - (6 \times 3130) / (46 \times (1936 - 1))) = 0,81$$

где: d – разность между рангами, N – количество пар сравнения.

Коэффициент корреляции между первым и вторым и между первым и третьим опытами составил 0,81 и 0,70 соответственно, зависимость сильная, а между вторым и третьим – 0,67 зависимость умеренная.

Это показывает, что связь между генотипами и степенью их поражения была высокая, что указывает на объективность оценки и достоверность полученных данных.

Далее рассчитали средний балл для каждой родительской линии по данным трех опытов. Исходя из них все изучаемые образцы разделили на 4 группы.

К первой группе отнесли устойчивые образцы, не поразившиеся ВЗКМО во всех трех опытах (7 образцов, включая контроль). Во вторую группу определили образцы, которые способны сдерживать развитие вируса толерантные «+» – набравшие средний балл от 0,06 до 0,59, явного поражения не было выявлено, но наблюдали на одном или двух растениях в делянке

Таблица 2. Данные первого и второго опыта для расчета коэффициента ранговой корреляции
Table 2. Data from the first and second experiments for calculating the rank correlation coefficient

| № | Средние значения | | Ранги | | d=R1-R2 | d ² |
|----|------------------|--------|-------|------|---------|----------------|
| | Опыт 1 | Опыт 2 | R1 | R2 | | |
| 1 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 2 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 3 | 0,00 | 0,06 | 8 | 14 | -6 | 36 |
| 4 | 0,22 | 0,06 | 18 | 14 | 4 | 16 |
| 5 | 0,00 | 0,11 | 8 | 16,5 | -8,5 | 72,25 |
| 6 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 7 | 0,00 | 0,28 | 8 | 18,5 | -10,5 | 110,25 |
| 8 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 9 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 10 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 11 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 12 | 0,00 | 0,33 | 8 | 20,5 | -12,5 | 156,25 |
| 13 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 14 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 15 | 0,11 | 0,00 | 16 | 6,5 | 9,5 | 90,25 |
| 16 | 0,56 | 1,44 | 25,5 | 45 | -19,5 | 380,25 |
| 17 | 0,33 | 0,72 | 19 | 32 | -13 | 169 |
| 18 | 0,83 | 0,06 | 34 | 14 | 20 | 400 |
| 19 | 0,56 | 0,28 | 25,5 | 18,5 | 7 | 49 |
| 20 | 0,78 | 0,33 | 31 | 20,5 | 10,5 | 110,25 |
| 21 | 0,83 | 0,50 | 34 | 24,5 | 9,5 | 90,25 |
| 22 | 1,00 | 0,50 | 40,5 | 24,5 | 16 | 256 |
| 23 | 0,56 | 0,83 | 25,5 | 36 | -10,5 | 110,25 |
| 24 | 0,50 | 0,39 | 22,5 | 22 | 0,5 | 0,25 |
| 25 | 0,67 | 1,11 | 28,5 | 40,5 | -12 | 144 |
| 26 | 0,78 | 0,89 | 31 | 37 | -6 | 36 |
| 27 | 0,89 | 1,00 | 37 | 39 | -2 | 4 |
| 28 | 0,39 | 0,67 | 20 | 28,5 | -8,5 | 72,25 |
| 29 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 30 | 0,17 | 0,11 | 17 | 16,5 | 0,5 | 0,25 |
| 31 | 1,33 | 0,78 | 44 | 35 | 9 | 81 |
| 32 | 1,44 | 1,22 | 45 | 42,5 | 2,5 | 6,25 |
| 33 | 0,44 | 0,44 | 21 | 23 | -2 | 4 |
| 34 | 1,00 | 0,56 | 40,5 | 26,5 | 14 | 196 |
| 35 | 0,89 | 0,67 | 37 | 28,5 | 8,5 | 72,25 |
| 36 | 0,50 | 0,72 | 22,5 | 32 | -9,5 | 90,25 |
| 37 | 0,94 | 0,72 | 39 | 32 | 7 | 49 |
| 38 | 0,00 | 0,00 | 8 | 6,5 | 1,5 | 2,25 |
| 39 | 0,78 | 0,56 | 31 | 26,5 | 4,5 | 20,25 |
| 40 | 1,11 | 0,94 | 43 | 38 | 5 | 25 |
| 41 | 0,83 | 0,72 | 34 | 32 | 2 | 4 |
| 42 | 0,56 | 0,72 | 25,5 | 32 | -6,5 | 42,25 |
| 43 | 0,89 | 1,11 | 37 | 40,5 | -3,5 | 12,25 |
| 44 | 1,06 | 1,33 | 42 | 44 | -2 | 4 |
| 45 | 0,67 | 1,22 | 28,5 | 42,5 | -14 | 196 |
| 46 | 1,56 | 1,68 | 46 | 46 | 0 | 0 |

Таблица 3. Результаты визуальной оценки родительских линий огурца, искусственно зараженных ВЗКМО*
Table 3. Results of visual assessment of parental lines of cucumber artificially infected with CGMMV*

| № | Среднее значение результатов оценки заражения в каждом опыте, балл | | | Среднее значение всех результатов, балл | Результаты визуальной оценки при искусственном заражении |
|----|--|------------------------|------------------------|---|--|
| | 1 опыт, посев 25.06.21 | 2 опыт, посев 30.11.21 | 3 опыт, посев 15.11.22 | | |
| 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | устойчивые |
| 2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | устойчивые |
| 3 | 0,33 | 0,00 | 0,33 | 0,20 | толерантные+ |
| 4 | 0,67 | 0,33 | 0,67 | 0,60 | толерантные+ |
| 5 | 0,33 | 0,33 | 0,67 | 0,40 | толерантные+ |
| 6 | 1,67 | 0,67 | 1,67 | 1,30 | толерантные- |
| 7 | 1,00 | 1,33 | 1,33 | 1,20 | толерантные- |
| 8 | 1,67 | 0,67 | 1,67 | 1,30 | толерантные- |
| 10 | 1,33 | 0,33 | 1,00 | 0,90 | толерантные- |
| 15 | 2,00 | 1,80 | 1,80 | 1,90 | восприимчивые |
| 16 | 1,67 | 1,80 | 1,80 | 1,80 | восприимчивые |
| 19 | 2,00 | 1,80 | 2,00 | 1,90 | восприимчивые |

*- в статье представлен фрагмент таблицы

угнетение по сравнению с контролем (18 образцов); в третью группу определили образцы толерантные «-», у которых в одной делянке на одном растении было явное поражение вирусом ВЗКМО (16 образцов). И в четвертую группу определили восприимчивые образцы, у которых было поражено 2 и более растений (5 образцов) (табл. 3).

У всех изученных линий были отобраны пробы и проведен ПЦР-анализ с целью определить наличие гена устойчивости, связанного с маркером F295 (табл. 4). По итогам ПЦР-анализа из 46 изученных образцов получили: 17 образцов с аллелями RR и 29 – с аллелями SS.

Сопоставив результаты, рассчитали эффективность работы маркера, определив соотношение устойчивых и не устойчивых образцов, точно совпавших с геном R и S к общему количеству образцов:

$$((3+10+13+4) / (7+18+16+5)) * 100=65\%$$

Эффективность применения маркера F295 для определения устойчивости к ВЗКМО, в данной выборке генотипов, достоверная, но не высокая: всего 65%, тогда как в одном из предварительных испытаний его эффективность составляла 94%. Очевидно, что его эффективность зависит от набора испытываемых генотипов.

Мы считаем, что если целевой ген устойчивости к ВЗКМО и маркерный ген устойчивости к CVYV, выявляемый маркером F295, находятся на одной хромосоме и в достаточной степени сцеплены друг с другом, то имеет значение взаимное расположение аллелей у их донора устойчивости: «цис»- или «транс»-положение. Если присутствует наличие «цис»-положения

Таблица 4. Данные ПЦР-анализа маркера F295 и результаты визуальной оценки устойчивости образцов к ВЗКМО на искусственно созданном фоне
Table 4. Data of PCR analysis of the F295 marker and the results of a visual assessment of the resistance of samples to CGMMV against an artificially created background

| № | Название | RR | SS | Всего |
|--------------------|-----------------|------|------|-------|
| 1 | Устойчивые | 3 | 4 | 7 |
| 2 | Толерантные «+» | 10 | 8 | 18 |
| 3 | Толерантные «-» | 3 | 13 | 16 |
| 4 | Не устойчивые | 1 | 4 | 5 |
| Всего | | 17 | 29 | 46 |
| % от общего | | 36,4 | 63,6 | 100 |

(аллели R-R; S-S), то дальнейшая работа с этим материалом возможна, пока сохраняется сцепление. Иначе, дальнейшую селекционную перспективу с использованием маркера *F295* (маркер ассоциированная селекция – MAC) имеют только 13 образцов (табл. 4), а именно те, что: «Устойчивые и толерантные «+» с RR».

Поэтому для более объективной оценки необходимо создание другого – основного маркера, который будет определять прямое наличие устойчивости именно к вирусу зеленой крапчатой мозаики огурца.

Маркер *F295* актуально использовать в сочетании с отбором устойчивых образцов на искусственно созданном фоне во втором поколении гибридов (F_2) на стадии изучения селекционных образцов. Отбирать устойчивые образцы с взаимным расположением аллелей RR в «цис»-положении, и в дальнейшем в следующих поколениях отслеживать устойчивость к ВЗКМО, проводя ПЦР-анализ. Это позволит сократить время и увеличить скорость селекционного процесса.

Выводы

При визуальной оценке степени поражения растений родительских линий огурца ВЗКМО на искусственно созданном инфекционном фоне средние данные по

трем опытам показали среди 46 изученных образцов 7 устойчивых, 18 толерантных «+», 16 толерантных «-» и 5 восприимчивых.

При определении наличия генов устойчивости, используя маркер *F295* у родительских линий по итогам ПЦР-анализа, получили из 46 изученных образцов: 17 – с аллелями RR и 29 – с аллелями SS.

Рассчитали эффективность применения маркера *F295* для определения устойчивости к ВЗКМО, проанализировав взаимосвязь между результатами ПЦР-анализа и объективной оценкой. При данной выборке генотипов эффективность составила 65%.

Поэтому для более объективной оценки необходимо создание другого – основного маркера, который будет определять прямое наличие устойчивости именно к вирусу зеленой крапчатой мозаики огурца.

Маркер *F295* актуально использовать в сочетании с отбором устойчивых образцов на искусственно созданном фоне, на стадии изучения селекционных образцов во втором поколении (F_2). Отбирать устойчивые образцы с взаимным расположением аллелей в «цис»-положении. И в дальнейшем в следующих поколениях отслеживать устойчивость к ВЗКМО, проводя ПЦР-анализ, что позволит сократить время и увеличить скорость селекционного процесса.

Об авторе:

Дарья Дмитриевна Теплякова – научный сотрудник, селекционер, адрес для переписки, ira.kalinovskaya@mail.ru

About the Author:

IDaria D. Teplyakova – Researcher, Breeder, Correspondence, ira.kalinovskaya@mail.ru

• Литература

1. Блоцкая Ж.В., Вабищевич В.В., Домаш В.И., Азизбекян С.Г., Завадская М.И., Хрипач В.А. Ингибирование вируса зеленой крапчатой мозаики огурца путем обработки семян фиторосторегуляторами. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2010;54(4):97-100. EDN ZWLFFL.
2. Ахатов А.К. Мир огурца глазами фитопатолога. М.: Тов-во науч. Изданий «КМК», 2020. 132-135 с.
3. Литвинов С.С. Методика полевого опыта в овощеводстве. М.: 2008. 605-611 с.
4. Ахатов А.К., Ахатов Е.А. Наиболее вредоносные болезни овощных культур в современных тепличных комбинатах. *Гавриш*. 2014;(3):16-23.
5. Liua H.W., Luo L.X., Lia J.Q., Liua P.F., Chenb X.Y., Haoc J.J. Pollen and seed transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in cucumber. *Scientia Agricultura Sinica*. 2011;(44):1527–32. DOI: 10.1111/ppa.12065
6. Йоханнес Мария (NL) ДЕ РЕЙТЕР Ваутер, Питер Йоханнес (NL). Растения огурца, устойчивые к заболеваниям. Номер патента: RU2418405C2
7. Пивоваров В.Ф. Селекция и семеноводство овощных культур. Москва 2007. 542 с.
8. Келдыш М.А., Червякова О.Н., Помазков Ю.И. Новые вирусы овощных культур, *Защита и карантин растений*. 2016;(11):29-31.
9. Юрина О.В., Настенко Н.В., Черемушкина Н.П., Можяева К.А. Методические указания: «Оценка и отбор огурца на устойчивость к вирусу зеленой крапчатой мозаики». Москва, ВО «Агропромиздат», 1990. 17 с.
10. Григоровская П.И. Установление инфекционности заболевания. URL: https://www.pesticidy.ru/dictionary/Establishing_the_infectivity_of_the_disease. (Дата обращения 10.12.2022).
11. Рябинина В., Блашко Н., Плотников К., Пашковский С., ВЗКМО: накопление и распределение вируса в растениях огурца. *Perfect Agriculture*. 2023;(1): 20-23.
12. Гринько Н.Н., Зеленая крапчатая мозаика огурцов в защищенном грунте. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2005;(1):53-55. EDN HRYANN.

• References

1. Blotskaya Zh. V., Vabishchevich V.V., Domash V.I., Azizbekian S.G., Zavadskaya M.I., Khripach V.A. Inhibition of cucumber green mottle mosaics virus by the treatment of seeds with plant growth regulators. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2010;54(4):97-100. EDN ZWLFFL. (In Russ.)
2. Akhatov A.K. The world of cucumber through the eyes of a phytopathologist. M.: Tov-in scientific. Publications "KMK", 2020. 132-135 p. (In Russ.)
3. Litvinov S.S. Methods of field experience in vegetable growing. M.: 2008. 605-611 p. (In Russ.)
4. Akhatov A.K., Akhatov E.A. The most harmful diseases of vegetable crops in modern greenhouses. *Gavrish*. 2014;(3):16-23. (In Russ.)
5. Liua H.W., Luo L.X., Lia J.Q., Liua P.F., Chenb X.Y., Haoc J.J. Pollen and seed transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in cucumber. *Scientia Agricultura Sinica*. 2011;(44):1527–32. DOI: 10.1111/ppa.12065
6. Johannes Maria (NL) DE REUTER Wouter, Peter Johannes (NL). Disease resistant cucumber plants. Patent number: RU2418405C2
7. Pivovarov V.F. Selection and seed production of vegetable crops. Moscow 2007. 542 p. (In Russ.)
8. Keldysh M.A., Chervyakova O.N., Pomazkov Yu.I. New viruses of vegetable crops, *Protection and quarantine of plants*. 2016;(11):29-31. (In Russ.)
9. Yurina O.V., Nastenkov N.V., Chermushkina N.P., Mozhaeva K.A. Guidelines: "Evaluation and selection of cucumber for resistance to green mottled mosaic virus." Moscow, VO "Agropromizdat", 1990. 17 p. (In Russ.)
10. Grigorovskaya P.I. Establishing the infectivity of a disease. URL: https://www.pesticidy.ru/dictionary/Establishing_the_infectivity_of_the_disease. (Accessed 10.12.2022).
11. Ryabinina V., Blazhko N., Plotnikov K., Pashkovsky S. VZKMO: accumulation and distribution of the virus in cucumber plants. *Perfect agriculture*. 2023;(1):20-23. (In Russ.)
12. Grinko N.N., Green mottled mosaic of cucumbers in protected soil. *Bulletin of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2005;(1):53-55. EDN HRYANN. (In Russ.)