

ПОЛИМОРФИЗМ СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ (*Fragaria × ananassa*) ПО ГЕНУ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ *Rca2*

DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77

УДК 634.75:577.2:632.4

Поступление/Received: 26.11.2018

Принято/Accepted: 06.03.2019

А. С. ЛЫЖИН, И. В. ЛУКЪЯНЧУК, Е. В. ЖБАНОВА

POLYMORPHISM OF THE *Rca2* ANTHRACNOSE RESISTANCE GENE IN STRAWBERRY CULTIVARS (*Fragaria × ananassa*)

A. S. LYZHIN, I. V. LUKYANCHUK, E. V. ZHBANOVA

Федеральный научный центр имени И. В. Мичурина,
393760 Россия, Тамбовская обл.,
г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30;
✉ Ranenburzhetc@yandex.ru

I. V. Michurin Federal Science Center,
30 Michurina St., Michurinsk,
Tambov Prov. 393760, Russia;
✉ Ranenburzhetc@yandex.ru

Актуальность. Антракноз, вызываемый фитопатогенными грибами рода *Colletotrichum*, – широко распространенное заболевание земляники садовой. Большинство существующих сортов земляники восприимчивы к антракнозу. В этой связи идентификация исходных форм, несущих гены устойчивости, является необходимым этапом успешной селекционной работы по созданию устойчивых к антракнозу сортов. Применение молекулярных маркеров повысит надежность идентификации и эффективность селекционного процесса по созданию устойчивых генотипов земляники. **Материалы и методы.** Биологическими объектами исследования являлись сорта земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.) различного эколого-географического происхождения. Экстракция геномной ДНК сортов земляники проводилась из молодых листьев согласно методу Puchooa. Для оценки аллельного состояния гена устойчивости земляники к антракнозу *Rca2* использовался SCAR-маркер STS-*Rca2*_240. **Результаты и выводы.** SCAR-маркер STS-*Rca2*_240, картированный на расстоянии 2,8 сМ от гена *Rca2*, выявлен у сортов 'Elianny', 'Troubadour' и 'Сударушка'. Сорта 'Elianny' и 'Troubadour' предположительно характеризуются доминантным гомозиготным (*Rca2Rca2*) или гетерозиготным (*Rca2rca2*) генотипом. Сорт земляники 'Сударушка' имеет гетерозиготное состояние по гену *Rca2* (*Rca2rca2*). У остальных изученных сортов маркер STS-*Rca2*_240 не выявлен (предполагаемый генотип *rca2rca2*).

Ключевые слова: земляника, молекулярные маркеры, устойчивость, антракноз, ген *Rca2*

Background. Anthracnose, caused by phytopathogenic fungi of the genus *Colletotrichum*, is one of the most important strawberry diseases. Strawberry yield losses from anthracnose lesions can reach 80%. Most strawberry cultivars are susceptible to anthracnose. Therefore, identification of the initial forms carrying resistance genes is a necessary step toward successful breeding of anthracnose-resistant cultivars. Use of molecular markers will increase reliability of identification and enhance effectiveness of strawberry breeding. **Materials and methods.** Biological material was represented by strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) of various ecological and geographical origin. Total genomic DNA was extracted from the fresh leaves using the CTAB methods according to Puchooa (2004). To assess the allelic state of the *Rca2* anthracnose resistance gene, the SCAR marker STS-*Rca2*_240 was used. The SCAR marker STS-*Rca2*_240 was multiplexed with the microsatellite marker EMFv020 used as the positive PCR control. **Results and conclusion.** The SCAR marker STS-*Rca2*_240, mapping at about 2.8 cM from the *Rca2* gene, was identified in the strawberry cultivars 'Elianny', 'Troubadour' and 'Sudarushka'. Cvs. 'Elianny' and 'Troubadour' are presumably characterized by a dominant homozygous (*Rca2Rca2*) or heterozygous (*Rca2rca2*) genotype. Cv. 'Sudarushka' has the heterozygous state for the *Rca2* anthracnose resistance gene (*Rca2rca2*). In the remaining cultivars studied, the marker STS-*Rca2*_240 was not detected (the prospective genotype is *rca2rca2*).

Key words: strawberry, molecular markers, resistance, anthracnose, the *Rca2* gene

Введение

Антракнозная черная гниль – широко распространенное во многих странах Европы и Америки заболевание земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.) (Freeman et al., 2002; Baroncelli et al., 2015; Forcelini et al., 2016). Возбудителями антракноза являются три вида фитопатогенных грибов рода *Colletotrichum*: *C. acutatum* J.H. Simmonds, *C. fragariae* A.N. Brooks, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Smith, 2008). В умеренном климатическом поясе наибольшей вредоносностью характеризуется вид *C. acutatum* (Golovin, 2014; Wagner, Hetman, 2016). Большинство сортов земляники, предназначенных для промышленного возделывания, в разной степени восприимчивы к антракнозной черной гнили (Sturzeanu et al., 2016; Wagner, Hetman, 2016; Holod et al., 2018).

C. acutatum поражает всю надземную часть растений земляники: побеги, листья, черешки, цветоносы, ягоды.

При этом возбудитель способен долгое время находиться на растении в латентном состоянии, что осложняет его идентификацию, проведение защитных мероприятий и способствует быстрому распространению с бессимптомным посадочным материалом. Потери урожая земляники от поражения ягод антракнозом составляют от 30 до 80%, а выпадения растений в маточных насаждениях – до 30% (Leandro et al., 2001; Golovin, 2014; Dudchenko et al., 2015).

Французские исследователи, изучив 14 изолятов *C. acutatum*, разделили их на две группы. Изоляты, относящиеся к 1-й группе патогенности, способны в сильной степени поражать неустойчивые ('Elsanta', 'Valeta'), умеренно устойчивый ('Addie') и устойчивый ('Sequoia', 'Dover') сорта земляники. Изоляты *C. acutatum* 2-й группы патогенности вирулентны к неустойчивым и среднеустойчивому сортам, но авирулентны к устойчивым генотипам земляники (Denoyes, Baudry, 1995).

У сортов земляники садовой выявлено два типа наследования устойчивости к антракнозной черной гнили: полигенное и моногенное. Полигенно детерминирована устойчивость к изолятам *C. acutatum* 1-й группы патогенности (Denoyes-Rothan et al., 2004). Моногенная устойчивость, контролируемая доминантным геном *Rca2*, выявлена к изолятам *C. acutatum*, относящимся ко 2-й группе патогенно-

сти (Lerceteanu-Kohler et al., 2002).

В Россию антракнозная черная гниль земляники была занесена сравнительно недавно, в 2003 году, вместе с инфицированным посадочным материалом из Италии (Holod et al., 2018), в связи с чем на территории нашей страны *C. acutatum*, видимо, представлен европейскими изолятами.

Таблица 1. Анализируемые сорта земляники садовой

Table 1. Analyzed strawberry cultivars

№	Сорт	Оригинатор
1	Алёна	Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия
2	Витязь	
3	Русич	
4	Соловушка	
5	Зенит	
6	Сударушка	
7	Купчиха	Кокинский опорный пункт Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, Россия
8	Студенческая	Кокинский опорный пункт Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, Россия
9	Крымчанка 87	Ордена трудового красного знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Крым, Россия
10	Юниол	
11	Избранница	Федеральный научный центр имени И. В. Мичурина, Россия
12	Ласточка	
13	Привлекательная	
14	Флора	
15	Дивная	Институт агроинженерных и экологических проблем сельскохозяйственного производства, Россия
16	Царскосельская	
17	Фестивальная	Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, Россия
18	Торпеда	Свердловская селекционная станция садоводства Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, Россия
19	Былинная	Крымская опытно-селекционная станция – филиал Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, Россия
20	Карнавал	Говорова Г. Ф., Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева, Россия
21	Олимпийская надежда	
22	Богема	
23	Незнакомка	Попова И. В., Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия
24	Гирлянда	Агрофирма «Поиск», Россия
25	Troubadour	Северо-Кавказский научно-исследовательский институт горного и предгорного садоводства, Россия, получен в Великобритании
26	Red Gauntlet	Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия, Котласское, Россия, получен в Шотландии
27	Фестивальная ромашка	Институт садоводства Украинской аграрной академии наук, Украина
28	Polka	Plant Research International – WUR, Нидерланды
29	Gigantella Maxim	Получен в Нидерландах
30	Sonata	
31	Vima Tarda	Vissers International BV, Нидерланды
32	Vima Zanta	
33	Barlidaun	Получен в США
34	Marshall	
35	Samson	
36	Karmen	Получен в Чехии
37	Symphony	Mylnfield Research Services Ltd, Великобритания
38	Elianny	Gebr. Vissers, Netherlands, Нидерланды
39	Tokado	Получен в Японии

В условиях Российской Федерации необходимо изучение устойчивости интродуцированных и отечественных сортов земляники к антракнозу, в том числе и проведение молекулярного скрининга.

Для детекции доминантного аллеля *Rca2* Lerceteau-Kohler et al. разработаны SCAR-маркеры STS-Rca2_240 и STS-Rca2_417, расположенные на расстоянии 2,8 см и 0,6 см от гена соответственно. Так как аллели маркеров STS-Rca2_240, STS-Rca2_417 и гена *Rca2* наследуются сцепленно, то на основании присутствия или отсутствия целевых продуктов маркеров можно предсказать аллельное состояние гена *Rca2* (Lerceteau-Kohler et al., 2005). Использование диагностических ДНК-маркеров для выявления устойчивых к антракнозу генотипов земляники повысит надежность идентификации перспективных форм и эффективность селекционного процесса по созданию новых генотипов с заданными параметрами признаков.

В настоящем исследовании представлены результаты молекулярно-генетического анализа сортов земляники садовой по гену устойчивости к *C. acutatum Rca2*.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись сорта земляники садовой (*F. × ananassa*) различного эколого-географического происхождения (табл. 1).

Экстракция геномной ДНК сортов земляники проводилась из молодых листьев согласно протоколу Puchooa (Puchooa, 2004) с модификациями.

Оценка аллельного состояния гена *Rca2* проводилась с использованием SCAR-маркера STS-Rca2_240. Целевым продуктом маркера STS-Rca2_240 является ампликон размером 240 пн. Контроль протекания ПЦР осуществляли с использованием разработанного для *F. vesca* SSR-маркера EMFv020 (Lerceteau-Kohler et al., 2005). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва) и имели следующую нуклеотидную последовательность:

- маркер STS-Rca2_240: CAC_240_2F
5'-GCCACGTCAGTCAAATTCAA-3', CAC_240_2RB
5'-TCATGGACAGTGGTCTCAGC-3';
- маркер EMFv020: EMFv020_F
5'-CAGGCGCCAACGGCGTGTCTTGT-3', EMFv020_R
5'-CAGCGCCGACAGTCCCTAGG-3'.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала 20 нг ДНК, 2,0 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого праймера, 0,8 U Taq-полимеразы и 1,5 мМ 10x Taq-буфера

(+(NH₄)₂SO₄, -MgCl₂). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Мультиплексную ПЦР (STS-Rca2_240+EMFv020) проводили в термоциклере T100 (BIO-RAD, США) по следующей программе: начальная денатурация при 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 50 с, 65°C – 50 с, 72°C – 1 мин; финальная элонгация при 72°C – 5 мин.

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2-процентном агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Результаты и обсуждение

Проведенный молекулярно-генетический анализ показал присутствие маркера STS-Rca2_240 у сортов земляники 'Elianny', 'Troubadour' и 'Сударушка'. Остальные изученные генотипы земляники садовой характеризуются рецессивным гомозиготным состоянием маркера STS-Rca2_240 (предполагаемый генотип *rca2rca2*). Пример полученных электрофоретических спектров маркера STS-Rca2_240 представлен на рисунке, результаты идентификации – в таблице 2.

Маркер STS-Rca2_240 является доминантным, то есть целевой продукт амплифицируется только при наличии у генотипа доминантного аллеля *Rca2*. В связи с этим ген *Rca2* в генотипе сортов 'Elianny', 'Troubadour' и 'Сударушка' предположительно может находиться в двух состояниях – доминантном гомозиготном (*Rca2Rca2*) или гетерозиготном (*Rca2rca2*). Анализ происхождения сортов 'Elianny' и 'Troubadour' не позволил уточнить аллельный статус гена *Rca2*, так как для родительских форм отсутствуют сведения о наличии или отсутствии гена *Rca2*. Сорт земляники 'Сударушка' выделен в комбинации скрещивания Фестивальная × Roxana, в которой источником гена *Rca2* предположительно является сорт 'Roxana' (генотип *Rca2Rca2* или *Rca2rca2*), так как, согласно нашим данным, сорт 'Фестивальная' характеризуется рецессивным гомозиготным статусом маркера STS-Rca2_240 (см. табл. 2), что предположительно свидетельствует о рецессивном гомозиготном генотипе по гену *Rca2*. В связи с вышеизложенным, комбинация скрещивания Фестивальная × Roxana имеет вид *rca2rca2* × *Rca2Rca2*(*rca2*), и сорт земляники 'Сударушка' предположительно имеет гетерозиготный генотип по гену *Rca2* (*Rca2rca2*).

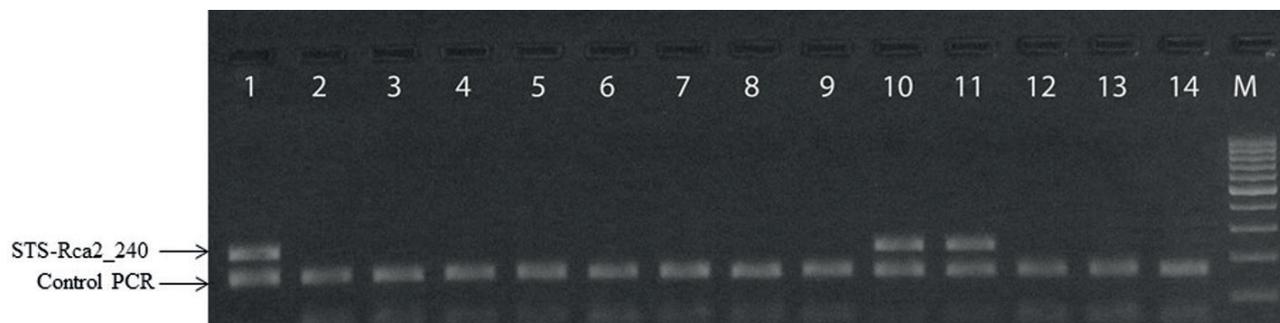


Рисунок. Электрофоретический профиль маркера STS-Rca2_240 сортов земляники

Примечание: 1 – Elianny, 2 – Marshall, 3 – Symphony, 4 – Незнакомка, 5 – Zenit, 6 – Sonata, 7 – Karmen, 8 – Былинная, 9 – Samson, 10 – Troubadour, 11 – Сударушка, 12 – Tokado, 13 – Ласточка, 14 – Флора, М – маркер молекулярного веса

Figure. Electrophoresis profile of the marker STS-Rca2_240 in strawberry cultivars

Note: 1 – Elianny, 2 – Marshall, 3 – Symphony, 4 – Neznakomka, 5 – Zenit, 6 – Sonata, 7 – Karmen, 8 – Bylinnaya, 9 – Samson, 10 – Troubadour, 11 – Sudarushka, 12 – Tokado, 13 – Lastochka, 14 – Flora, M – molecular weight marker

Таблица 2. Результаты ПЦР-анализа сортов земляники по маркеру STS-Rca2_240
Table 2. Results of the PCR analysis of strawberry cultivars for the marker STS-Rca2_240

№	Сорт	Маркер STS-Rca2_240	Предполагаемый генотип по гену Rca2
1	Алёна	-	rca2rca2
2	Витязь	-	rca2rca2
3	Русич	-	rca2rca2
4	Соловушка	-	rca2rca2
5	Зенит	-	rca2rca2
6	Сударушка	+	Rca2rca2
7	Купчиха	-	rca2rca2
8	Студенческая	-	rca2rca2
9	Крымчанка 87	-	rca2rca2
10	Юниол	-	rca2rca2
11	Избранница	-	rca2rca2
12	Ласточка	-	rca2rca2
13	Привлекательная	-	rca2rca2
14	Флора	-	rca2rca2
15	Дивная	-	rca2rca2
16	Царскосельская	-	rca2rca2
17	Фестивальная	-	rca2rca2
18	Торпеда	-	rca2rca2
19	Былинная	-	rca2rca2
20	Гирлянда	-	rca2rca2
21	Карнавал	-	rca2rca2
22	Олимпийская надежда	-	rca2rca2
23	Богема	-	rca2rca2
24	Troubadour	+	Rca2Rca2 или Rca2rca2
25	Red Gauntlet	-	rca2rca2
26	Фестивальная ромашка	-	rca2rca2
27	Barlidaun	-	rca2rca2
28	Gigantella Maxim	-	rca2rca2
29	Polka	-	rca2rca2
30	Elianny	+	Rca2Rca2 или Rca2rca2
31	Marshall	-	rca2rca2
32	Symphony	-	rca2rca2
33	Незнакомка	-	rca2rca2
34	Sonata	-	rca2rca2
35	Karmen	-	rca2rca2
36	Samson	-	rca2rca2
37	Tokado	-	rca2rca2
38	Vima Tarda	-	rca2rca2
39	Vima Zanta	-	rca2rca2

Примечание: символы показывают присутствие (+) или отсутствие (-) маркера STS-Rca2_240

Заключение

Таким образом, в результате проведенного молекулярно-генетического анализа маркер STS-Rca2_240, сцепленный с доминантным аллелем *Rca2*, идентифицирован у сортов земляники 'Elianny', 'Troubadour' и 'Сударушка'. У сорта 'Сударушка' ген *Rca2* предположительно находится в гетерозиготном состоянии (*Rca2rca2*), у сортов 'Elianny', 'Troubadour' – в доминантном гомозиготном (*Rca2Rca2*) или гетерозиготном (*Rca2rca2*) состоянии. У остальных проанализированных генотипов земляники маркер STS-Rca2_240 не выявлен (предполагаемый генотип *rca2rca2*).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Тамбовской области в рамках научного проекта № 18-416-680002.

References/Литература

Baroncelli R., Zapparata A. et al. (2015) Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. *PLoS One*, vol. 10(6), pp. e0129140. DOI: 10.1371/journal.pone.0129140

- Denoyes B., Baudry A. (1995) Species Identification and Pathogenicity Study of French *Colletotrichum* Strains Isolated from Strawberry Using Morphological and Cultural Characteristics. *Phytopathology*, vol. 85(1), pp. 53–57. DOI: 10.1094/Phyto-85-53
- Denoyes-Rothan B., Lerceteau-Kohler E. et al. (2004) QTL analysis for resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Acta Hort.*, vol. 663, pp. 147–151. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.663.19
- Dudchenko I. P., Skripka O. V. et al. (2015) Outbreak of strawberry anthracnose in Voronezh Province (Vspyshka antraknoza zemlyaniki v Voronezhskoy oblasti). In: Modern Mycology in Russia: Proceedings of the III International Mycological Forum (Sovremennaya mikologiya v Rossii: Materialy III Mezhdunarodnogo mikologicheskogo foruma), Moscow, vol. 5(4), pp. 28–29 [in Russian] (Дудченко И. П., Скрипка О. В. и др. Вспышка антракноза земляники в Воронежской области // Современная микология в России: Материалы III Международного микологического форума. Москва. 2015. № 5 (4). С. 28–29).
- Forcelini B. B., Seijo T. E. et al. (2016) Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Disease*, vol. 100(10), pp. 2050–2056. DOI: 10.1094/PDIS-01-16-0118-RE
- Freeman S., Shalev Z. et al., (2002) Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporoides* pathogenic to strawberry. *Plant Dis.*, vol. 86(9), pp. 965–970. DOI: 10.1094/PDIS.2002.86.9.965
- Golovin S. E. (2014) New diseases of strawberries in the central Russia (Novye bolezni zemlyaniki v sredney polose Rossii). *Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia (Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii)*, vol. 1, pp. 88–95 [in Russian] (Головин С. Е. Новые болезни земляники в средней полосе России // Плодоводство и ягодоводство России. 2014. № 1. С. 88–95).
- Holod N. A., Kashchits Y. P. et al. (2018) Evaluation of stability of strawberry varieties to anthracnose black rot in the southern region (Otsenka ustoychivosti sortov zemlyaniki sadovoy k antraknoznoy chernoy gnili v yuzhnom regione). *Fruit Growing and Viticulture of South Russia (Plodovodstvo i vinogradarstvo yuga Rossii)*, vol. 51(3), pp. 140–148 [in Russian] (Холод Н. А., Кашчиц Ю. П. и др. Оценка устойчивости сортов земляники садовой к антракнозной черной гнили в южном регионе // Плодоводство и виноградарство юга России. 2018. № 51(3). С. 140–148. <http://journalkubansad.ru/pdf/18/03/14.pdf>). DOI: 10.30679 / 2219-5335-2018-3-51-137-145
- Leandro L. F. S., Gleason M. L. et al. (2001) Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*, vol. 91(7), pp. 659–664. DOI: 10.1094/PHYTO.2001.91.7.659
- Lerceteau-Kohler E., Roudeillac P. et al. (2002) The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Acta Hort.*, vol. 567(2), pp. 615–618. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.132
- Lerceteau-Kohler E., Guerin G. et al. (2005) Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 111, pp. 862–870. DOI: 10.1007/s00122-005-0008-1
- Puchooa D. A. (2004) Simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 253–255.
- Smith B. J. (2008) Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North American perspective. *Hort. Science*, vol. 43(1), pp. 69–73.
- Sturzeanu M., Coman M. et al. (2016) Molecular characterization of allelic status of the *Rpf1* and *Rca2* genes in six cultivars of strawberries. *Acta Hort.*, vol. 1139, pp. 107–112. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1139.19
- Wagner A., Hetman B. (2016) Susceptibility of strawberry cultivars to *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, vol. 15(6), pp. 209–219.

Прозрачность финансовой деятельности/The transparency of the financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования/How to cite this article

Лыжин А. С., Лукьянчук И. В., Жбанова Е. В. Полиморфизм сортов земляники (*Fragaria × ananassa*) по гену устойчивости к антракнозу *Rca2*. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2019; 180(1): 73-77. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77

Lyzhin A. S., Lukyanchuk I. V., Zhanova E. V. Polymorphism of the *Rca2* anthracnose resistance gene in strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa*). Proceedings on applied botany, genetics and breeding. 2019; 180(1): 73-77. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы/The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны/Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-73-77>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы/The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует/No conflict of interest