

УДК 582.734.4:575.1+634.711:631.523.11

DOI: 10.14258/pbssm.2022055

Наличие маркёров, ассоциированных с устойчивостью к вирусу кустистой карликовости малины, у сортов малины сибирской и уральской селекции**Presence of RBDV-resistant associated markers within raspberry cultivars from Siberian and Uralian breeding programs**Камнев А. М.¹, Яговтцева Н. Д.², Невоструева Е. Ю.³, Кузьмина А. А.⁴, Дунаева С. Е.¹, Антонова О. Ю.¹Kamnev A. M.¹, Yagovtseva N. D.², Nevostrueva E. Yu.³, Kuzmina A. A.⁴, Dunaeva S. E.¹, Antonova O. Yu.¹¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: antonkamen@mail.ru; dunaevase@mail.ru; olgaant326@mail.ru¹ FSC "N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources", Saint-Petersburg, Russia² Отдел Федерального Алтайского научного центра агротехнологий «НИИСС им. М. А. Лисавенко», г. Барнаул, Россия. E-mail: yagovtsevan@mail.ru² M. A. Lisavenko Research Institute of Horticulture for Siberia – Department of the Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Barnaul, Russia³ Свердловская селекционная станция садоводства – структурное подразделение ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия. E-mail: sadovodstvo@list.ru³ Sverdlovsk breeding station of horticulture – structural subdivision of FSBSI UrFASRC UrB RAS, Ekaterinburg, Russia⁴ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия. E-mail: kuzmina@bionet.nsc.ru⁴ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russia

Реферат. Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ, Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)) наносит значительный ущерб урожаю малины. Существенную помощь в выведении сортов, устойчивых к данному заболеванию, может оказать маркёр-ассоциированная селекция. Известно, что устойчивость к ВККМ контролируется геном *Ви*, к этому гену разработан ряд маркёров. В данной работе был проведён скрининг сортов малины уральской и сибирской селекции двумя маркёрами гена *Ви* - *rasp_N_gene_1202* и *BC615_553_Alu I*. Всего из 28 сортов выявлено 8, обладающих ДНК-фрагментами, ассоциированными с устойчивостью к ВККМ – ‘За здравие’, ‘Огонёк’, ‘Рубиновая’, ‘Соколёнок’, ‘Фантазия’, ‘Высокая’, ‘Муза’ и ‘Арочная’. Сорта имели различное происхождение, среди их предков присутствовали как сорта малины зарубежной селекции, так её культурные виды и дикие родичи малины. Данная работа является только молекулярно-генетической оценкой возможных источников устойчивости к ВККМ среди сортов малины уральской и сибирской селекции, её результаты требуют дальнейшей фенотипизации. Однако полученные данные могут помочь как в дальнейших исследованиях устойчивости различных сортов малины к ВККМ, так и в селекционной работе по получению новых резистентных сортов.

Ключевые слова. ВККМ, маркёр-вспомогательный отбор, молекулярный скрининг, устойчивость, ягодные культуры, MAS, *Rubus idaeus*.

Summary. Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) is one of the most harmful viruses infecting raspberry and cause significant reduction of harvest. Marker-assisted selection (MAS) may help in breeding RBDV-resistant cultivars. At present some molecular markers distinguishing resistant and susceptible cultivars with high accuracy have been developed. In our research screening of raspberry cultivars from siberian and uralian breeding programs was carried out by two markers - *rasp_N_gene_1202* and *BC615_553_Alu I*. It is found out that 7 of 28 cultivars have bands associated with resistance to RBDV. These are ‘Aврora’, ‘Za zdavie’, ‘Ogonek’, ‘Rubinovaya’, ‘Fantaziya’, ‘Vysokaya’, ‘Muza’ and ‘Arochnaya’. They have different origin and wild and cultivated relatives of red raspberry was within their ancestors. This research is just only molecular-genetic assessment of potential sources for resistance to RBDV within raspberry cultivars from siberian and uralian breeding programs and its results need in additional checking. However, the obtained data may help in further researches of RBDV-resistance and also in breeding of new cultivars.

Key words. Berry crops, marker-assisted selection, MAS, molecular screening, resistance, *Rubus idaeus*, RBDV.

Введение. Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ, в зарубежной литературе – Raspberry Bushy dwarf virus, RBDV) является одним из наиболее вредоносных вирусов для культуры малины. Потери от этого заболевания могут достигать более 2 тысяч долларов на гектар за год (Ward et al., 2012). При поражении ВККМ у растений появляются хлорозы, некрозы, уменьшается их рост, происходит деформирование ягод, в том числе снижается число костянок до 10–12 (у здоровых растений оно может достигать до 60), сами плоды становятся рассыпчатыми, ухудшаются их товарные качества (Немцова и др., 2008; Валасевич и др., 2011). ВККМ был обнаружен у различных дикорастущих и культурных растений рода *Rubus* L.: *R. idaeus* L. (малина обыкновенная), *R. occidentalis* L. (малина западная), *R. subgenus* (ежевика), малино-ежевичные гибриды, *R. strigosus* Michx, *R. parviflorus* Weston, *R. leucodermis* Dooglas ex Hook., *R. multibracteatus* H. Lev. et Vaniot, *R. glaucus* Benth., *R. arcticus* L. Известны случаи поражения и других культур, в частности, винограда (Mavrič Pleško et al., 2020).

Поскольку вирус ВККМ наносит большой ущерб урожайности малины, одним из важных направлений в селекции является создание устойчивых сортов. Генетический контроль устойчивости к ВККМ изучен слабо. Известен, по крайней мере, один доминантный ген *Ви*, контролирующий данный признак (Ward et al., 2012), к которому разработаны маркеры для маркер-вспомогательного отбора. В работе Ward et al. (2012) при проведении RAPD-анализа выборки из 8 устойчивых и 8 поражаемых сортов малины были выявлены фрагменты, характерные для всех устойчивых образцов. Эти фрагменты были конвертированы в CAPS-маркер BC615_553_Alu I, который при тестировании на расщепляющейся популяции, полученной от скрещивания устойчивого к ВККМ сорта ‘Nootka’ с восприимчивым клоном WSU1499, показал высокую точность определения устойчивых генотипов – 96,7 %. Однако данный маркер оказался недостаточно эффективным при скрининге выборки 16 сортов малины; в частности, он отсутствовал у иммунного сорта ‘Haida’. Другой вариант маркера был разработан путем выравнивания на геном земляники лесной последовательности RAPD-ампликона, послужившего основой для маркера BC615_553_AluI (полногеномное секвенирование генома малины на тот момент ещё не было проведено). Было выявлено несколько генов-кандидатов, один из которых оказался предположительным гомологом хорошо известного гена устойчивости к вирусам, известного как N-ген табака. Для экзонов данного гомолога было разработано несколько пар праймеров, которые были протестированы на вышеописанных выборках. В результате был создан SCAR- маркер rasp_N_gene_1202, который показал высокую точность определения устойчивых генотипов в популяции ‘Nootka’ × WSU1499, и, кроме того, генерировал диагностические фрагменты у всех участвующих в исследовании резистентных сортов (Ward et al., 2012).

Скрининг сортов малины отечественной селекции вышеописанными маркерами не проводился, хотя в целом исследования по распространённости ВККМ в России ведутся (Немцова и др., 2008; Упадышев и др., 2016).

В настоящее время в ВИРе реализуется программа оформления номенклатурных стандартов отечественных сортов малины согласно Международному кодексу номенклатуры культурных растений (Камнев и др., 2021). Стратегия регистрации в генбанке ВИР сортов вегетативно размножаемых культур в качестве номенклатурных стандартов предполагает также создание для них молекулярно-генетических паспортов (Гавриленко, Чухина, 2020). Молекулярный паспорт содержит информацию об аллельном составе ядерных микросателлитных локусов, а также (при наличии данных) о диагностических фрагментах молекулярных маркеров генов хозяйственно-ценных признаков, прежде всего генов устойчивости к патогенам и вредителям. В связи с этим представляется необходимым провести скрининг сортов малины российской селекции на наличие молекулярных маркеров, ассоциированных с устойчивостью к ВККМ.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 29 сортов малины уральской и сибирской селекции, а также контрольный сорт ‘Malling Jewel’, описанный в литературе (Kempler et al., 2012) как устойчивый к ВККМ (табл.). Большинство сортов было получено от оригинаторов для оформления номенклатурных стандартов/ваучеров, а сорта ‘Malling Jewel’ и ‘Соколёнок’ получены из *in vitro* коллекции ВИР.

Для скрининга были взяты два молекулярных маркера, разработанные Ward et al. (2012). Для проведения ПЦР были использованы программы, рекомендованные авторами праймеров. Разделение амплифицированных фрагментов проводилось путём электрофореза в 2%-м агарозном геле в течение 2,5 часов при напряжении 100 В. Гели окрашивали бромистым этидием с последующей визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете на аппарате Gel-Doc XR BIO-RAD.

Таблица

Перечень сортов, участвовавших в исследовании

№ п/п	Название сорта	Селекционное учреждение	Источник получения образца
1	‘Акварель’	Отдел Федерального Алтайского научного центра агротехнологий «НИИСС им. М. А. Лисавенко», г. Барнаул	Оригинатор
2	‘Барнаульская’		
3	‘Блеск’		
4	‘Веста’		
5	‘Добрая’		
6	‘За здоровье’		
7	‘Затонская’		
8	‘Зоренька Алтай’		
9	‘Иллюзия’		
10	‘Кассиопея’		
11	‘Колокольчик’		
12	‘Кредо’		
13	‘Огонёк’		
14	‘Рубиновая’		
15	‘Фантазия’		
16	‘Соколёнок’		
17	‘Алая россыпь’	Свердловская селекционная станция садоводства, г. Екатеринбург	Оригинатор
18	‘Антарес’		
19	‘Высокая’		
20	‘Лель’		
21	‘Любительская Свердловска’		
22	‘Муза’		
23	‘Ровница’		
24	‘Фрегат’		
25	‘Арочная’	Новосибирская зональная станция садоводства, г. Новосибирск	Оригинатор
26	‘Персиковая’		
27	‘Прелесь’		
28	‘Славянка’	East Malling Research Station	<i>In vitro</i> коллекция ВИР
29	‘Malling Jewel’		

Результаты и обсуждение. В скрининге были использованы два маркера гена *Vi*. Согласно литературным данным, SCAR-маркер *rasp_N_gene_1202* связан с наличием ампликона у устойчивых генотипов и с его отсутствием у восприимчивых. К сожалению, размер этого ампликона авторами праймеров не приводится (Ward et al., 2012). По результатам анализа мы выявили у устойчивого к ВККМ сорта ‘Malling Jewel’ ПЦР-продукт размером приблизительно 1300 п. н., который зарегистрировали как диагностический фрагмент (рис. 1А). Этот фрагмент присутствовал у ряда сортов уральской и сибирской селекции, а именно: ‘Арочная’, ‘Высокая’, ‘За здоровье’, ‘Муза’, ‘Огонёк’, ‘Рубиновая’, ‘Соколёнок’, ‘Фантазия’ (рис. 1А).

Для CAPS-маркера BC615_553_Alu I авторы также не обозначили размеры фрагментов и не привели фото гелей (Ward et al., 2012). Рестрикция ферментом Alu I происходила у всех образцов, однако у контрольного устойчивого сорта ‘Malling Jewel’ возникал дополнительный компонент размером примерно 200 п. н., указанный стрелкой на рисунке 1Б. Наличие этого фрагмента было зарегистрировано нами у сортов ‘Арочная’, ‘За здоровье’, ‘Рубиновая’, ‘Соколёнок’, ‘Фантазия’ (рис. 1Б). В то же вре-

мя, характерный фрагмент не был обнаружен у сортов ‘Высокая’, ‘Муза’ и ‘Огонёк’, у которых присутствовал *rasp_N_gene_1202*. Противоречия в результатах скрининга этими двумя маркерами отмечали сами авторы праймеров – у устойчивого сорта ‘Haida’ маркер *rasp_N_gene_1202* был выявлен, а маркер BC615_553_Alu I отсутствовал.

Таким образом, оба маркера гена *Vi* в изученной выборке имели сорта ‘Арочная’, ‘За здоровье’, ‘Рубиновая’, ‘Соколёнок’, ‘Фантазия’.

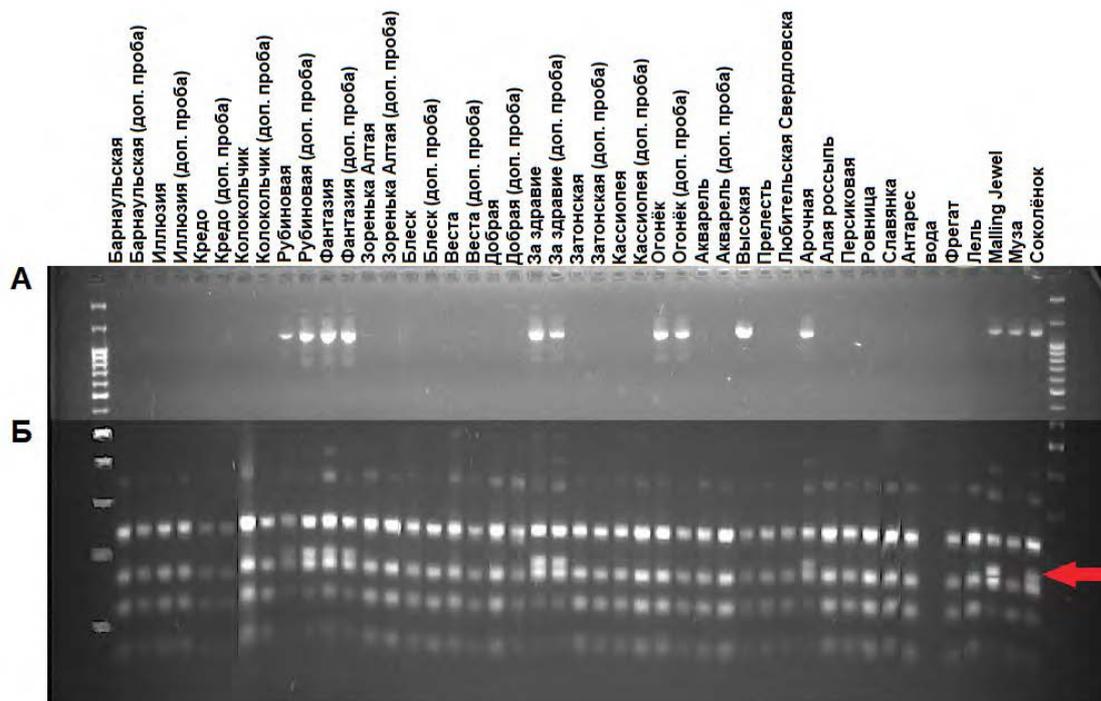


Рис. 1. Результаты молекулярного скрининга сортов малины: А – SCAR-маркер *rasp_N_gene_1202*; Б – CAPS-маркер BC615_553_Alu I.

Сорта, обнаружившие наличие диагностических фрагментов, имели различное происхождение, при этом источник маркеров у них был не всегда очевиден. Сорта ‘За здоровье’ и ‘Соколёнок’ были выведены путем свободного опыления сортов ‘Carnival’ и ‘Malling Jewel’ соответственно (Помология, 2005; Помология, 2014), которые в литературе заявлены как устойчивые к ВККМ (Kempler et al., 2012). Сорт ‘Муза’ был получен от свободного опыления шотландских гибридных сеянцев, несущих ген крупноплодности L1 (Невоструева, 2008; Помология, 2014). Данные крупноплодные формы происходят от мутантного клона устойчивого к ВККМ сорта ‘Malling Jewel’ (Кичина, 2005). Сорта ‘Рубиновая’, и ‘Фантазия’ были получены путём свободного опыления восприимчивых сортов (‘Canby’ и ‘Amber’ соответственно) (Converse, 1973; Dulic-Markovic, Rankovic, 1992; Помология, 2014), и источник маркеров гена *Vi* для них неизвестен.

Интересно, что в родословных многих сортов с выявленными маркерами гена *Vi* участвовали дикие родичи малины обыкновенной или близкородственные ей культурные виды: у сорта ‘Огонёк’ – малина боярышниковлистная (*R. crataegifolius* Bunge), у сорта ‘Высокая’ – малина щетинистая (*R. strigosus*) (Помология, 2014), а у сорта ‘Арочная’ – сорт ‘Прогресс’, полученный И. В. Мичуриным от скрещивания малины сорта ‘Marlboro’ и малино-ежевичного гибрида ‘Техас’ (Мичурин, 1950; Помология, 2005). В этих случаях можно предполагать, что данные сорта унаследовали диагностические фрагменты гена устойчивости именно от диких и культурных родичей малины обыкновенной.

Таким образом, среди сортов малины уральской и сибирской селекции обнаружены потенциально устойчивые к ВККМ генотипы, несущие маркеры гена *Vi*. Для молекулярного скрининга лучше использовать оба маркера в комплексе. В дальнейшем планируется провести фенотипическую оценку образцов на устойчивость к ВККМ, что позволит сделать вывод об эффективности маркеров при проведении молекулярного скрининга.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2019-0004, номер государственной регистрации (РК) ААА-А-А19-119013090158-8 «Коллекции ВИР вегетативно размножаемых культур и их диких родичей – изучение и рациональное использование».

ЛИТЕРАТУРА

Валасевич Н., Кухарчик Н., Кварнхеден А. Молекулярная характеристика изолятов вируса кустистой карликовости малины из Швеции и Беларуси // Архив вирусологии, 2011. – Т. 156, № 3. – С. 369–374. DOI: 10.1007/s00705-010-0912-9

Гавриленко Т. А., Чухина И. Г. Номенклатурные стандарты современных российских сортов картофеля, хранящиеся в гербарии ВИР (WIR): новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках // Биотехнология и селекция растений, 2020. – Т. 3, № 3. – С. 6–17. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-02

Камнев А. М., Язовцева Н. Д., Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А., Чухина И. Г. Номенклатурные стандарты сортов малины Алтайской селекции // Vavilovia, 2021. – Т. 4, № 2. – С. 26–43. DOI: 10.30901/2658-3860-2021-2-26-43

Кичина В. В. Крупноплодные малины России. – М., ВСТИСП, 2005. – 131 с.

Мичурин И. В. Итоги шестидесятилетних работ. – М., Изд-во АН СССР, 1950. – 580 с.

Невоструева Е. Ю. Оценка исходных форм малины по зимостойкости в условиях Среднего Урала // Аграрный вестник Урала, 2008. – № 9(51). – С. 57–58.

Немцова Е. В., Артюхова А. В., Дроздов Е. В., Заякин В. В., Нам. И. Я. Скрининг вируса кустистой карликовости малины методом RT-PCR in vitro и в полевом материале // Вестник Брянского госуниверситета, 2008. – № 4. – С. 119–123.

Помология. Сибирские сорта плодовых и ягодных культур XX столетия / Под общ. ред. И. П. Калининой. – Новосибирск: Юпитер, 2005. – 588 с.

Помология. Т. 5: Земляника, малина, орехоплодные и редкие культуры / Ред. Е. Н. Седов. – Орёл: Издательство ВНИИСПК, 2014. – С. 111–180.

Упадышев М. Т., Тихонова К. О., Метлицкая К. В. Изучение вредоносности вирусов на малине в полевых условиях // Плодоводство и ягодоводство России, 2016. – Т. 45. – С. 188–192.

Converse R. H. Occurrence and some properties of raspberry bushy dwarf virus in *Rubus* species in the United States // Phytopathology, 1973. – Iss. 63. – P. 780–783.

Dulic-Markovic I., Rankovic M. The occurrence of raspberry bushy dwarf virus in Willamette raspberry in Yugoslavia // Acta Horticulturae, 1992. – Iss. 308. – P. 109–112. DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.308.13

Kempler C., Hall H., Finn C. E. Raspberry // Fruit Breeding. – NY, Springer New York, 2012. – P. 263–304.

Mavrii Pleško I., Lamovšek J., Lešnik A., Marn M. V. Raspberry bushy dwarf virus in Slovenia – geographic distribution, genetic diversity and population structure // European Journal of Plant Pathology, 2020. – Iss. 158. – P. 1033–1042. DOI: 10.1007/s10658-020-02115-5

Ward J. A., Boone W. E., Moore P. P., Weber C. A. Developing molecular markers for marker assisted selection for resistance to *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) in red raspberry // Acta Horticulture, 2012. – Iss. 946. – P. 61–66. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.6.