

Наличие маркёров, ассоциированных с устойчивостью к вирусу кустистой карликовости малины, у дикорастущих представителей подрода *Idaeobatus* рода *Rubus* на территории Алтая

Presence of RBDV-resistant associated markers within wild specimens of *Rubus* subgenus *Idaeobatus* in the Altay territory

Камнев А. М., Чухина И. Г., Антонова О. Ю.

Kamnev A. M., Chukhina I. G., Antomova O. Yu.

ФИЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова» (ВИР)
г. Санкт-Петербург, Россия. E-mails: antonkamen@mail.ru; irena_wir@mail.ru; olgaant326@mail.ru
FSC “N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources”, St. Petersburg, Russia

Реферат. Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ, в иностранных источниках – Raspberry bushy dwarf virus, RBDV) является одним из самых опасных для культуры малины. Он способен в течение нескольких лет инфицировать 100 % растений в промышленных посадках. ВККМ поражает несколько десятков видов, у малины вызывает карликовость растений, рассыпчатость плодов, снижение урожайности и конечную гибель растения. В связи с этим актуален поиск образцов, являющихся источниками устойчивости к данному вирусу. В данной работе изучено 14 образцов малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.) и 8 образцов малины сахалинской (*R. sachalinensis* Levl.), собранных в области пересечения ареалов этих видов на территории Алтая. В ходе скрининга на наличие маркёрных фрагментов, ассоциированных с устойчивостью к ВККМ, такие фрагменты были обнаружены у образца, собранного в Онгудайском районе Республики Алтай. Данный факт может говорить о наличии в дикорастущих популяциях малины образцов, обладающих устойчивостью к ВККМ. В дальнейшем мы планируем продолжить поиски форм с маркёрными фрагментами, ассоциированными с устойчивостью к ВККМ в дикорастущих популяциях видов малины на территории Алтая и соседних регионов с последующим привлечением потенциально устойчивых образцов в коллекцию ВИР.

Ключевые слова. Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ), гены устойчивости, дикие родичи культурных растений (ДРКР), малина, маркёр-ассоциированный отбор (MAS).

Summary. Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) is one of the most dangerous viruses for raspberry culture. It may infect 100 % plants on the industrial plantings during several years. RBDV is able to infect several dozen of species. In raspberry RBDV causes plant dwarfing, crumbling of fruits, reducing of yield and death of plant. Therefore search of RBDV-resistant specimens is important and actual. In this study we investigated 14 specimen of *Rubus idaeus* L. and *R. sachalinensis* Levl. These specimens were collected in the district of crossing of distribution areas of these species on the Altay territory. During screening for present of marker fragments associated with RBDV-resistance we found specimen from Ongudai district of the Altay Republic which has these markers. This can be an evidence that specimens with RBDV-resistance may present in wild populations. Further we plan to continue looking for specimens with marker fragments associated with RBDV-resistance on the Altay territory and neighbouring regions.

Key words. Genes of resistance, marker-associated selection, raspberry, raspberry bushy dwarf virus (RBDV), wild relatives of cultured plants.

Введение. Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ, в зарубежной литературе известен как raspberry bushy dwarf virus – RBDV) принадлежит к роду *Idaeovirus* (Martin, Keller, 2021). В естественных условиях он поражает преимущественно представителей рода *Rubus* L., реже – виноград (*Vitis vinifera* L.) (Mavric Plesko et al., 2020), а также черешню (Caglayan et al., 2022); экспериментально же подтверждена способность инфицировать около 50 видов из 12 семейств (Martin, Keller, 2021).

ВККМ относится к РНК-вирусам, его геном состоит из двух линейных одноцепочечных положительно-полярных молекул РНК (Martin, Keller, 2021). На данный момент известно 5 штаммов данного вируса: S, известный как шотландский, RB (resistance-breaking), выявленный в малине запад-

ной (*Rubus occidentalis* L.) штамм В, а также два штамма без названия, выделенные из растений вида *R. multibracteatus* H. Lev. et Vaniot и из винограда (на данный момент не имеют обозначения) (Caglayan et al., 2022).

ВККМ способен передаваться как горизонтальным путём (от одного растения к другому через пыльцу), так и вертикальным (от заражённого растения к потомкам через семена) (Fauquet et al., 2005). При этом вирус способен распространяться с высокой скоростью, доля инфицированных растений малины на участке может достигнуть 100 % всего за 5–6 лет (Martin, 2002). ВККМ вызывает карликовость растений, а также резко ухудшает их урожайность и качество плодов, делая их мелкими, рассыпающимися и, как следствие, товарно непригодными. По этой причине данный вирус считается одним из особо опасных патогенов для культуры малины (Isogai et al., 2014).

Ввиду вредоносности ВККМ становится актуальной проблема поиска источников устойчивости к данному патогену. Известен, по меньшей мере, один ген *Ви*, контролирующий данный признак; на данный момент для него разработаны три маркера различных типов – CAPS, SCAR (Ward et al., 2012) и HRM (Stephens et al., 2016). В ходе селекционного процесса были выявлены источники устойчивости к данному вирусу среди сортового генофонда (Kempler, Hall, 2012; Евдокименко, 2020); при помощи маркеров выявлены потенциальные сорта-источники устойчивости (Камнев и др., 2021; Тарасова, Капитова, 2023). Поиск же источников устойчивости к ВККМ среди дикорастущих образцов малины (в том числе и диких родичей малины обыкновенной – *Rubus idaeus* L.) ещё не проводился. При этом образцы из произрастающих в природных условиях популяций малины обыкновенной и её диких родичей могут иметь особое стратегическое значение, поскольку их генофонд содержит в себе то разнообразие, которое утратилось при прохождении культурными формами «бутылочного горлышка» одомашнивания (Хлёткина, Чухина, 2020). Поэтому исследования дикорастущих популяций, в том числе на предмет поиска потенциальных источников устойчивости к вирусам, представляется важной частью стратегии изучения генетических ресурсов растений.

Цель работы – провести скрининг образцов, собранных в дикорастущих популяциях малины на территории Алтайского края и Республики Алтай, на наличие маркеров, ассоциированных с устойчивостью к ВККМ.

Материалы и методы. Материалом послужили 22 образца двух видов – малины обыкновенной (*R. idaeus*) и малины сахалинской (*R. sachalinensis* Levl.), собранных нами на территории Алтайского края и Республики Алтай в зоне пересечения ареалов вышеуказанных видов. Перечень образцов приведён в таблице 1. В качестве положительного контроля послужил сорт новосибирской селекции 'Арочная', у которого маркерные фрагменты гена *Ви* были выявлены нами ранее (Камнев и др., 2021).

Таблица 1

Образцы *R. idaeus* и *R. sachalinensis*, собранные в дикорастущих популяциях на территории Алтайского края и Республики Алтай

№ п/п	Вид	Экспедиционный номер	Местонахождение	Координаты места сбора
1	<i>R. idaeus</i>	8-20	Республика Алтай, Онгудайский р-н, не доезжая п. Хабаровка, правый берег р. Урсул, у каменистых останцев, склон северной экспозиции	N50.725888° E86.246581°
2		2-6	Алтайский край, Чарышский р-н, окр. с. Маралихи, одичавшие посадки яблони, заросшие караганой древесной и спиреей	N51.672177° E83.370829°
3		3-7	Алтайский край, Чарышский р-н, окр. д. Усть-Пихтовки, верховья р. Маралихи, правый берег, мелколиственный-хвойный лес с пихтой, елью, сосной	N51.678665° E83.440244°
4		1-4	Алтайский край, Чарышский р-н, долина р. Сургутки, около пасеки	N51.694272° E83.440244°
5		3-9	Алтайский край, Чарышский р-н, окр. д. Усть-Пихтовка, верховья р. Маралихи, правый берег, мелколиственный-хвойный лес с пихтой, елью, сосной	N51.678665° E83.440244°

Продолжение табл. 1

№ п/п	Вид	Экспедиционный номер	Местонахождение	Координаты места сбора	
6	<i>R. idaeus</i>	3-8	Алтайский край, Чарышский р-н, окр. д. Усть-Пихтовки, верховья р. Маралихи, правый берег, мелколиственно-хвойный лес с пихтой, елью, сосной	N51.678665° E83.440244°	
7		16-25	Республика Алтай, Чойский р-н, по дороге на с. Каракочки, берег р. Талды, высокотравный мелколиственно-хвойный лес (вторичный после вырубki черневой тайги) с травянистыми неморальными элементами	N51.858458° E86.445901°	
8		7-17	Республика Алтай, Усть-Канский р-н, восточные отроги Коргонского хребта, правый берег р. Ерго́л, в березняке по берегу реки	N50.978683° E84.421134°	
9		7-17а	Республика Алтай, Усть-Канский р-н, восточные отроги Коргонского хребта, правый берег р. Ерго́л, в березняке по берегу реки	N50.978683° E84.421134°	
10		22-32	Алтайский край, Курьинский р-н, окр. п. Имени 8 Марта, дорога к сопке Озерной, хвойно-мелколиственный лес с большим количеством березы и подростом пихты	N51.307062° E82.597618°	
11		18-28	Алтайский край, дорога на горнолыжный курорт Белокуриха 2, по берегу р. Мал. Сычевки	N51.91333° E84.873694°	
12		19-29	Алтайский край, Смоленский р-н, за с. Солоновкой, левый берег р. Песчаной, урочище «Щёки», склон юго-восточной экспозиции, высокотравный березняк	N51.939189° E84.627553°	
13		17-27	Алтайский край, окр. Белокурихи, вдоль дороги от памятника природы «Четыре брата», окрестности Серебряного родника	N51.95187° E84.978411°	
14		20-31	Алтайский край, Усть-Калманский р-н, окр. с. Верх-Слюдянки, березово-пихтовый лес	N51.784928° E83.779148°	
15		<i>R. sachalinensis</i>	14-24	Республика Алтай, дорога на Инегень, левобережье Катуня, Теректинский хребет, склон северо-восточной экспозиции, заросли ксерофитных кустарников	N50.29023° E86.681914°
16			6-15	Республика Алтай, Усть-Канский р-н, левый берег р. Чарыша, в устье р. Кайсын (левый приток Чарыша), лиственничник на высокой прирусловой террасе р. Чарыша	N50.967171° E84.569428°
17			9-21	Республика Алтай, ущелье р. Айгулак, левый берег, прибрежный ельник	N50.358816° E87.241488°
18			10-22	Республика Алтай, Улаганский р-н, Улаганский тракт, правый берег р. Кубадра, опушка ельника зеленомошного	N50.570503° E87.848868°
19			14-23	Республика Алтай, дорога на с. Инегень, левобережье Катуня, Теректинский хребет, склон северо-восточной экспозиции, заросли ксерофитных кустарников	N50.29023° E86.681914°
20	7-16		Республика Алтай, Усть-Канский р-н, за п. Тюдрала в сторону Коргона, восточные отроги Коргонского хребта, правый берег р. Ерго́л, опушка лиственничника с елью	N50.967171° E84.569428°	
21	19-30		Алтайский край, Смоленский р-н, за с. Солоновкой, левый берег р. Песчаной, урочище «Щёки», склон южной экспозиции, скалы вдоль дороги	N51.939189° E84.627553°	
22	17-26		Алтайский край, окр. Белокурихи, дорога к памятнику природы «Четыре брата», высокотравный хвойный лес, у скал	N51.945138° E84.980428°	

Скрининг был проведён при помощи двух молекулярных маркёров, разработанных Ward et al. (2012). Амплификацию осуществляли в условиях, предложенных авторами праймеров. В случае CAPS-маркёра BC615_553 обработку ПЦР-продуктов рестриктазой AluI проводили в течение ночи, следуя протоколу фирмы-изготовителя (СибЭнзим; <http://www.sibenzyme.com>). Полученные фрагменты разделяли электрофорезом в 2%-ом агарозном геле в течение 2–3 часов при напряжении 100–125 В. В целях визуализации гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ-свете в аппарате Gel-Doc XR BIO-RAD.

Результаты. В данной работе мы провели исследование 22 дикорастущих образцов видов *R. idaeus* и *R. sachalinensis*, при помощи двух маркёров гена *Vi* – CAPS-маркёра BC615_553 и SCAR-маркёра *rasp_N_gene_1202*. В ходе скрининга фрагменты обоих маркёров были обнаружены только у одного образца *R. idaeus* №8-20, собранного в Онгудайском районе Республики Алтай. Фото гелей с маркёрными фрагментами приведены на нижеследующем рисунке 1. Диагностический фрагмент SCAR-маркёра *rasp_N_gene_1202* у образца №8-20 по размерам был идентичен таковому у контрольного сорта 'Арочная', аналогично, в рестрикционном спектре AluI-фрагментов CAPS-маркера BC615_553 у образца № 8-20 так же, как у сорта 'Арочная', присутствовал дополнительный фрагмент (обозначен на рисунке красной стрелкой). При этом у образца №8-20 были отмечены фрагменты обоих маркёров, хотя в предшествующих исследованиях у устойчивых и потенциально устойчивых образцов мог присутствовать только один из них, а именно ПЦР-бэнд маркёра *rasp_N_gene_1202* (Ward et al., 2012; Камнев и др., 2021).

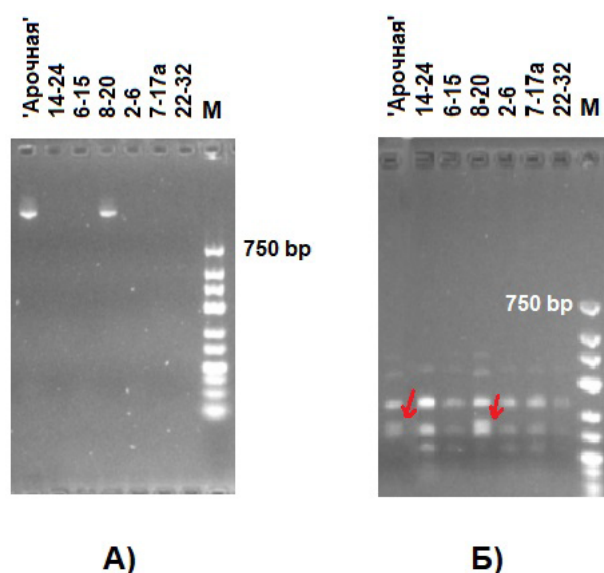


Рис. 1. Маркёрные фрагменты гена *Vi* у образца 8-20: А) маркёр *rasp_N_gene_1202*; Б) маркёр BC615_553.

Следует отметить, что данный образец был собран в локации, имеющей минимальную антропогенную нагрузку и, как следствие, низкий шанс привнесения элементов культурной флоры в естественные природные сообщества. Поэтому этот образец с высокой вероятностью является частью дикорастущего генофонда, а не интродуцированным в природный биоценоз культивируемым сортом.

Заключение. Проведён скрининг на наличие маркёрных фрагментов, ассоциированных с устойчивостью к ВККМ, среди представителей дикорастущих популяций малины. Выявлен дикорастущий образец *R. idaeus* из Республики Алтай, несущий оба маркёра гена устойчивости *Vi*, то есть потенциально устойчивый к ВККМ. Данный факт говорит о том, что в дикорастущих популяциях могут встречаться образцы с геном *Vi*, потенциально устойчивые к ВККМ и представляющие интерес для селекции. Выявленный образец можно привлечь к экспериментальной проверке на поражаемость ВККМ. В дальнейшем планируется расширять выборку путём привлечения образцов из других районов Алтая, а также из других регионов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания FGEM-2022-0008.

ЛИТЕРАТУРА

- Евдокименко С. Н. Скрининг генетической коллекции малины ремонтантного типа по полевой устойчивости к болезням // Плодоводство и ягодоводство России, 2020. – Т. 58. – С. 138–143.
- Камнев А. М., Яговцова Н. Д., Невоструева Е. Ю., Кузьмина А. А., Дунаева С. Е., Антонова О. Ю. Наличие маркёров, ассоциированных с устойчивостью к вирусу кустистой карликовости малины, у сортов малины сибирской и уральской селекции // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2022. – Т. 21, № 2. – С. 59–63. DOI: 10.14258/pbssm.2022055
- Тарасова Е. В., Капитова И. А. Скрининг растений малины *Rubus idaeus* коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства на наличие маркера, ассоциированного с признаком устойчивости к вирусу RBDV // Плодоводство и ягодоводство России, 2024. – Т. 76. – С. 18–26. DOI: 10.31676/2073-4948-2024-76-18-26

Хлёткина Е. К., Чухина И. Г. Генетические ресурсы растений: стратегия сохранения и использования // Вестник Российской академии наук, 2020. – Т. 90, № 6. – С. 522–527.

Caglayan K., Ördök K., Gazel M., Elci E., Roumi V., Lamovsek J., Mavric Plesko I. Incidence and genetic diversity of raspberry bushy dwarf virus (RBDV) in *Rubus* spp. in Turkey // Annals of Applied Biology, 2023. – Vol. 183, № 3. – P. 209–219.

Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. Virus Taxonomy. – Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 1063–1065.

Isogai M., Yoshida T., Nakanowatari C., Yoshikawa N. Penetration of pollen tubes with accumulated Raspberry bushy dwarf virus into stigmas is involved in initial infection of maternal tissue and horizontal transmission // Virology, 2014. – Iss. 452–453. – P. 247–253.

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

Mavric Plesko I., Lamovsek J., Lesnik 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

Martin R. R. Virus diseases of *Rubus* and strategies for their control // Acta Horticulture, 2002. – Iss. 585. – P. 265–270.

Martin R. R., Keller K. E. Idaeoviruses (Mayoviridae) // Encyclopedia of virology (4th ed.) / D. H. Bamford, M. Zuckerman (Eds.). – NY: Academic Press, 2021. – P. 430–438.

Stephens M. J., Buck E. J., Tahir J. Mapping a potential resistance gene for Raspberry bushy dwarf virus in red raspberry // XI International Rubus and Ribes Symposium 1133, 2015. – P. 121–128.

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