

УДК 634.71:577.2:632.3

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ ЛОКУСА УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ У СОРТОВ МАЛИНЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ФНЦ ИМ. И.В. МИЧУРИНА

Александр Сергеевич Лыжин, Татьяна Владимировна Жидехина

ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина», г. Мичуринск
393774, Тамбовская обл., г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30
E-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru

Кустистая карликовость (Raspberry bushy dwarf virus, RBDV) – одно из опаснейших вирусных заболеваний малины (*Rubus idaeus* L.). Поэтому создание и отбор сортов малины с генетической устойчивостью к RBDV – приоритетное направление многих селекционных программ. Устойчивость малины к RBDV контролируется доминантным геном *Vi*, для детекции которого разработаны ДНК-маркеры. В представленном исследовании показаны результаты молекулярного маркирования гена *Vi* устойчивости к вирусу кустистой карликовости у 24 сортов малины генетической коллекции ФНЦ им. И.В. Мичурина с использованием диагностического ДНК-маркера *rasp_N_gene_1202*. Маркерный фрагмент аллеля резистентности *Vi* выявлен у сортов Клеопатра и Glen Magna, которые можно рекомендовать в качестве перспективных генетических источников устойчивости к RBDV.

Ключевые слова: малина; генотип; RBDV; устойчивость; ген *Vi*; маркер-опосредованный отбор

Введение

Вирус кустистой карликовости (Raspberry bushy dwarf virus, RBDV) – один из важнейших вирусных патогенов малины. Встречается на всей территории промышленного возделывания малины красной (*Rubus idaeus* L.), также способен поражать таких представителей рода *Rubus* L., как *R. occidentalis* Nutt., *Rubus* × *loganobaccus* L.H. Bailey, *Rubus fruticosus* L., *Rubus arcticus* L. [10]. Инфицирование растений малины вирусом кустистой карликовости проявляется рассыпчатостью плодов, уменьшению их размеров возникновением хлорозов и некрозов, частичной стерильностью, а также снижением жизнеспособности [2, 9]. RBDV передается через пыльцу и способен заразить как материнское растение через опыленный цветок (горизонтальная передача), так и семя, формирующееся из оплодотворенного цветка, (вертикальная передача). Способность RBDV к горизонтальной передаче обуславливает его эпидемиологическое значение: при отсутствии профилактических и защитных мероприятий насаждения восприимчивых сортов уже через несколько лет могут быть на 100% инфицированы. Накоплению RBDV в растениях малины также способствует их инфицирование другими вирусами: вирусом крапчатости листьев (RLMV), латентным вирусом малины (BRLV) [10]. Урожайность малины от поражения растений вирусом кустистой карликовости может снижаться более чем на 50%. Большинство широко распространённых и коммерчески успешных сортов малины восприимчивы к RBDV [10, 11]. В соответствии с постановлением Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO) сертификация посадочного материала малины недопустима при наличии вируса кустистой карликовости [6]. Поэтому внедрение в производство устойчивых к вирусу кустистой карликовости сортов малины является важной экономической задачей, а создание и отбор форм с генетической устойчивостью к RBDV – приоритетное направление многих селекционных программ [11].

Устойчивость малины к RBDV контролируется доминантным геном *Vi* (источником является сорт Newburgh), который не картирован и не секвенирован [13,

14], однако для него разработаны молекулярные маркеры, позволяющие вести молекулярный скрининг растений по устойчивости к RBDV. К их числу относятся CAPS-маркер BC615_553_AluI, SCAR-маркер rasp_N_gene_1202 [14], SNP-маркер RubRgeneP8 [13].

CAPS-маркер BC615_553_Alu I, позволяющий выявить устойчивые к RBDV формы малины, был разработан с использованием метода BSA и картографирующей популяции Nootka (устойчивый) × WSU1499 (восприимчивый). Точность идентификации составляет 96,7%. Однако при анализе генетической коллекции устойчивых сортов было установлено, что у некоторых из них (например, сорт Haida) произошла рекомбинация между геном и маркером, что ограничивает возможности его использования для скрининга устойчивых форм. В дальнейшем на основании аннотированной последовательности маркера BC615_553 был разработан SCAR-маркер rasp_N_gene_1202, который поданным авторами [14] характеризуется той же точностью идентификации (96,7%) для исходной картирующей комбинации скрещивания, но также позволяющий выявлять locus устойчивости к RBDV и у других сортов малины. Маркер RubRgeneP8 разработан на основании данных секвенирования локуса BC615_553, выравненной относительно аналогичной последовательности в геноме сорта Heritage (устойчив к RBDV) и аннотированного гена *N* устойчивости земляники к вирусу табачной мозаики. Валидация маркера была проведена с использованием 42 сортов и отборных форм, различающихся по устойчивости к RBDV. Надёжность идентификации с использованием маркера RubRgeneP8 составила 75% для устойчивых и 86% для восприимчивых форм [13]. В связи с вышеизложенным, и так как анализ на наличие маркера BC615_553_AluI технически сложнее (после ПЦР требуется проведение реакции рестрикции ампликонов), в рамках маркер-опосредованной селекции предпочтительнее использование маркера rasp_N_gene_1202. Слабую пригодность маркера BC615_553_Alu I для анализа на устойчивость к RBDV генетически полиморфного генофонда малины отмечают также другие исследователи [12].

Необходимо отметить, что исследования в области молекулярной идентификации устойчивых к RBDV генотипов малины проводили в основном на сортах зарубежной селекции, и к настоящему времени выявлено свыше 80 сортов, устойчивость которых к вирусу кустистой карликовости детерминирована геном *Bu* [11]. Генофонд отечественных сортов малины по гену *Bu* практически не изучался. Первые результаты молекулярного анализа генофонда отечественных сортов малины по устойчивости к RBDV получены А.М. Камневым с соавторами в 2022 году, проанализировавшими 28 сортов малины урало-сибирской селекции. Диагностические маркеры гена *Bu* – BC615_553_AluI и rasp_N_gene_1202 были выявлены у 5 сортов: За здравие, Рубиновая, Соколёнок, Фантазия, Арочная [5]. В 2023 году Е.В. Тарасова и И.А. Капитова протестировали на наличие маркера rasp_N_gene_1202 12 сортов малины отечественной селекции из генетической коллекции ФНИЦ Садоводства. Маркерный фрагмент гена *Bu* (rasp_N_gene_1202) был ими выявлен у сортов Ариша, Гусар, Оранжевое Чудо и Поклон Казакову [7]. В Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации, по состоянию на 2023 год внесено 102 сорта малины [1], помимо этого известно большое количество ценных генотипов (исходные формы, источники, доноры). Поэтому оценка генофонда малины по генетическим детерминантам устойчивости к RBDV является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования являлось выявление сортов малины с генетической устойчивостью к RBDV (ген *Bu*) с использованием метода молекулярного маркирования.

Объекты и методы исследования

Биологическим объектами исследования являлись растения 24 сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.) генетической коллекции ФНЦ им. И.В. Мичурина (таблица 1).

Таблица 1

Анализируемые сорта малины

Сорт	Оригинатор, страна происхождения
Антарес	Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Россия
Фрегат	
Атлант	ФНЦ Садоводства, Россия
Метеор	
Оранжевое чудо	
Пингвин	
Клеопатра	ФНЦ им. И.В. Мичурина, Россия
Суламифь	
Шахзада	
Яркая	
Лавина	ФНЦ Садоводства, Брянский государственный аграрный университет, Россия
Поклон Казакову	
Подарок Кашину	
Улыбка	
Новость Кузьмина	Старинный русский сорт. Создан Кузьминым Н.В. в г. Ветлуга Нижегородской области
Пересвет	ФНЦ Садоводства, ООО Меристема, Россия
Карамелька	Шиблев В.А., Россия
Лимонная	Краснокутская опытная станция садоводства Национальной академии аграрных наук, Украина
Cascade Delight	Washington State University, США
Glen Magna	Scottish Crop Research Institute, Великобритания
Octavia	East Malling research station, Великобритания
Joan J	Medway Fruits, Великобритания
Polana	Sadowniczy Zakład Doświadczalny Brzezna, Польша
Poranna Rosa	

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев методом СТАВ. Концентрацию определяли спектрофотометрическим методом с использованием микрообъёмного спектрофотометра EzDrop 1000 (Blue-Ray Biotech, Тайвань). Качество экстрагированной ДНК определяли с помощью предварительной ПЦР с микросателлитными праймерами (Rim15).

Идентификацию аллеля *Bu* устойчивости к RBDV проводили с использованием SCAR-маркера rasp_N_gene_1202 (For 5'-cgattgagcaactgcaagaa-3', Rev 5'-cacctcctgaattcccatgt-3'). Целевой ампликон маркера rasp_N_gene_1202 (фрагмент размером около 1200 п.н.) соответствует аллелю резистентности *Bu* [14].

ПЦР проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США), условия описаны в оригинальной публикации [14]. Детекцию результатов проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Результаты и обсуждение

В результате проведённых исследований маркер rasp_N_gene_1202 идентифицирован у двух сортов малины: Клеопатра (селекции ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина») и Glen Magna (селекции Шотландского научно-исследовательского института растениеводства (Scottish Crop Research Institute), что составляет 8,3% от

общего количества форм. Среди сортов отечественной селекции их количество составило 5,9%, зарубежной – 14,3%.



Рис. 1 – Электрофоретический профиль маркера *rasp_N_gene_1202* у сортов малины генетической коллекции ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина».

1 – Антарес, 2 – Карамелька, 3 – Подарок Кашину, 4 – Суламифь, 5 – Polana, 6 – Poranna Rosa, 7 – Поклон Казакову, 8 – Оранжевое чудо, 9 – Cascade Delight, 10 – Octavia, 11 – Glen Magna, 12 – Атлант, 13 – Клеопатра, К- – Отрицательный контроль, М – маркер молекулярного веса ДНК

Пример электрофоретических спектров маркера *rasp_N_gene_1202* у изучаемых сортов малины представлен на рисунке 1, результаты идентификации – в таблице 2.

Таблица 2

Аллельное состояние гена устойчивости к RBDV (*Вн*) у сортов малины генетической коллекции ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»

Сорт	Комбинация скрещивания	Маркер <i>rasp_N_gene_1202</i>	Генотип
Антарес	Бархатная × св. оп.	0	<i>bubu</i>
Атлант	2-205-1a × св. оп.	0	<i>bubu</i>
Карамелька	Нет доступной информации	0	<i>bubu</i>
Клеопатра	Маросейка × 188-14	1	<i>Bubu</i>
Лавина	Гусар × смесь пыльцы крупноплодных сортов В.В. Кичины	0	<i>bubu</i>
Лимонная	Нет доступной информации	0	<i>bubu</i>
Метеор	Костинбродская × Новость Кузьмина	0	<i>bubu</i>
Новость Кузьмина	Смелянская × Cuthbert	0	<i>bubu</i>
Оранжевое чудо	Шапка Мономаха × св. оп.	0	<i>bubu</i>
Пересвет	Сольдж × Столичная	0	<i>bubu</i>
Пингвин	Посев семян сложного межвидового происхождения	0	<i>bubu</i>
Подарок Кашину	5-х-1 × св. опыление	0	<i>bubu</i>
Поклон Казакову	1-182-10 × Евразия	0	<i>bubu</i>
Суламифь	Столичная × 188-14	0	<i>bubu</i>
Улыбка	Новость Кузьмина × Бальзам	0	<i>bubu</i>
Фрегат	Бархатная × св. оп.	0	<i>bubu</i>
Шахзада	Столичная × 188-14	0	<i>bubu</i>
Яркая	Коллективная × Новость Мичуринска	0	<i>bubu</i>
Cascade Delight	Chilliwack × WSU-994	0	<i>bubu</i>
Glen Magna	Meeker × SCRI 7719B11	1	<i>Bubu</i>
Octavia	Glen Ample × EM 5928/114	0	<i>bubu</i>
Polana	Zeva × Heritage	0	<i>bubu</i>
Poranna Rosa	83291 × ORUS 1098-1	0	<i>bubu</i>
Joan J	Joan Squire × Terri-Louise	0	<i>bubu</i>

Согласно литературным данным, среди отечественных сортов, доля генотипов с идентифицированным маркерным фрагментом гена *Bu* составляет 28,6% (проанализировано 28 сортов урало-сибирской селекции) [5] и 33,3% (проанализировано 12 сортов генетической коллекции ФНИ Садоводства) [7]. Полученные нами результаты молекулярного скрининга аллельного состояния гена *Bu* для сортов Антарес, Лавина, Фрегат подтверждаются проведенными ранее исследованиями [5, 7]; тогда как для сортов Оранжевое чудо и Поклон Казакову отмечены расхождения с литературными данными. Также необходимо отметить, что с использованием маркера RubRgeneP8 аллель резистентности *Bu* был идентифицирован у сорта малины Octavia [13], тогда как согласно полученным нами данным целевой фрагмент маркера *rasp_N_gene_1202* у данного сорта отсутствует (см. табл. 1).

Сопоставление результатов молекулярного скрининга и литературных данных фенотипической оценки устойчивости к RBDV [3, 8, 11], показало, что к группе устойчивых относятся сорта Glen Magna (маркер присутствует), Octavia (маркер отсутствует); к среднеустойчивым относятся Атлант, Лавина, Оранжевое Чудо, Пингвин, Поклон Казакову, Polana (маркер отсутствует), к восприимчивым – Подарок Кашину (маркер отсутствует). Для сорта Клеопатра, характеризующегося наличием маркерного фрагмента гена *Bu*, данные о степени фенотипической устойчивости к RBDV отсутствуют. При сопоставлении результатов ДНК-анализа и фенотипической оценки устойчивости необходимо учитывать, какой из изолятов RBDV преобладает в конкретном регионе возделывания, так как выявлен изолят RB-RBDV, преодолевающий устойчивость, придаваемой геном *Bu*. Однако область распространения изолята RB-RBDV пока ограничена (имеются сведения о его очаговом присутствии в Европейских странах, России и Северной Америке [2, 11]), в связи с чем устойчивость, детерминируемая геном *Bu* сохраняет свою актуальность.

Сорт Glen Magna выделен в комбинации скрещивания Meeker × SCRI 7719B11. Сорт Meeker восприимчив к RBDV и имеет рецессивный гомозиготный генотип по гену *Bu* [13, 14]. Следовательно, источником аллеля *Bu* для сорта Glen Magna является отборная форма SCRI 7719B11.

Сорт Клеопатра получен от скрещивания сорта Маросейка и отборной формы 188-14 (Обильная × Барнаульская) [4]. При этом сорт Барнаульская имеет рецессивный гомозиготный генотип – *bubu* [5], следовательно, источником аллеля *Bu* для сорта Клеопатра являются исходные формы Маросейка или Обильная.

Необходимо отметить, что ДНК-маркер *rasp_N_gene_1202* является доминантным и, следовательно, сорта с идентифицированным маркерным фрагментом теоретически могут содержать аллель *Bu* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии. Однако согласно литературным данным [13, 14] гомозиготный генотип (*BuBu*) сцеплен с факторами низкой жизнеспособности или летальности, в связи с чем сорта с идентифицированным аллелем резистентности *Bu* имеют гетерозиготный генотип (*Bubu*). Кроме того, доминантный тип маркера обуславливает необходимость предварительной оценки качества выделенной ДНК, так как примеси в недостаточно очищенном экстракте способны ингибировать ПЦР, способствуя получению ложноотрицательных результатов.

Заключение

С использованием диагностического ДНК-маркера *rasp_N_gene_1202* проведено молекулярное маркирование гена *Bu* устойчивости к вирусу кустистой карликовости у сортов малины генетической коллекции ФНИ им. И.В. Мичурина. Наличием маркерного фрагмента аллеля резистентности *Bu* характеризуются сорта Клеопатра (селекции ФГБНУ «ФНИ им. И.В. Мичурина») и Glen Magna (селекции Шотландского

научно-исследовательского института растениеводства), которые можно рекомендовать в качестве перспективных генетических источников устойчивости к RBDV.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России по соглашению № 075-15-2021-1050 и тематического плана ФНЦ имени И.В. Мичурина по проекту FGSU-2024-0001.

Список литературы

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. – Т. 1. «Сорта растений» (официальное издание). – Москва: Росинформаротех. – 2023.
2. Евдокименко С.Н., Упадышев М.Т., Якуб И.А., Метлицкая К.В. Кустистая карликовость малины: проблемы и пути решения // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – № 36(1). – С. 167-174.
3. Евдокименко С.Н. Скрининг генетической коллекции малины ремонтантного типа по полевой устойчивости к болезням // Плодоводство и ягодоводство России. – 2019. – № 58. – С. 138-143. DOI: 10.31676/2073-4948-2019-58-138-143.
4. Жидехина Т.В. Коллекция малины: сохранение, изучение и использование // Современные тенденции устойчивого развития ягодоводства России (земляника, малина). – 2019. – С. 226-265.
5. Камнев А.М., Яговцева 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. – № 21(2). – С. 59-63. DOI: 10.14258/pbssm.2022055.
6. Колбанова Е.В., Божидай Т.Н. Возможность определения вируса кустистой карликовости малины (RBDV) у растений-регенерантов малины в культуре *in vitro* методом DAS-ELISA теста // Плодоводство. – 2022. – № 30(1). – С. 131-135.
7. 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. – № 76. – С.18-26. DOI: 10.31676/2073-4948-2024-76-18-26.
8. Упадышев М.Т., Метлицкая К.В., Евдокименко С.Н., Тумаева Т.А., Борисова А.А., Петрова А.Д., Тутъ Е.А., Радзениеце С., Чердакли А.А. Распространенность вирусных болезней и выделение кандидатов в исходные растения малины *ex situ* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2020. – №61. – С. 109-116. DOI: 10.31676/2073-4948-2020-61-109-116.
9. Graham J., Karley A., Dolan A., Williams D., Jennings N. Advances and challenges in sustainable raspberry/blackberry cultivation // Achieving sustainable cultivation of temperate zone tree fruits and berries. – 2019. – P. 397-422.
10. 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. – Vol. 452. – P. 247-253. DOI: 10.1016/j.virol.2014.02.001.
11. Kempler C., Hall H.K., Finn C. Raspberry // Fruit Breeding. – 2012. – Vol. 8. – P. 263 – 304.
12. Orzeł A., Simlat M., Danek J. Directions in raspberry and blackberry breeding program conducted in NIWA Berry Breeding Ltd., Brzezna, Poland // Acta Hort. – 2016. – Vol. 1133. – P. 29-34. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1133.5.

13. *Stephens M.J., Buck E.J., Tahir, J.* Mapping a potential resistance gene for Raspberry bushy dwarf virus in red raspberry // *Acta Hortic.* – 2016. – Vol. 1133. – P. 121-128. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1133.18.

14. *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 Hortic.* – 2012. – Vol. 946. – P. 61-66. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.6.

Статья поступила в редакцию 20.11.2024 г.

Lyzhin A.S., Zhidekhina T.V. Molecular marking of the raspberry bushy dwarf virus resistance locus in raspberry cultivars of the genetic collection I.V. Michurin FSC // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2025. - № 155 - P.58-64

Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) is one of the most dangerous viral diseases of raspberries (*Rubus idaeus* L.), causing significant damage to plantations. Therefore, the creation and selection of raspberry cultivars with genetic resistance to RBDV is a priority direction of many breeding programs. Raspberry resistance to RBDV is controlled by the dominant gene *Bu*, for the detection of which DNA markers have been developed. The presented study shows the results of molecular marking of the *Bu* RBDV resistance gene in 24 raspberry cultivars from the genetic collection I.V. Michurin FSC using the diagnostic DNA marker *rasp_N_gene_1202*. The marker fragment of the *Bu* resistance allele was identified in the raspberry cultivars Cleopatra and Glen Magna, which can be recommended as promising genetic sources of resistance to RBDV.

Key words: *raspberry; genotype; RBDV; resistance; Bu gene; marker-assisted selection*