

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТЕНИЙ МАЛИНЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ВККМ

Тарасова Елизавета Валентиновна – студентка 1 курса магистратуры
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика
И.Г. Петровского»

Научный руководитель – Немцова Елена Валентиновна, к.б.н., доцент,
доцент кафедры биологии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И.Г. Петровского»

Аннотация: были проанализированы образцы ДНК ремонтантной малины 10 сортов методом ISSR-PCR. В процессе исследования использовали ДНК сортов, устойчивых к ВККМ (вирусу кустистой карликовости малины), восприимчивых, а также сортов с неизвестным статусом. Выявлен высокий уровень внутривидового генетического полиморфизма. Проведена генетическая паспортизация восприимчивых и устойчивых сортов малины, построены дендрограммы генетического сходства. По результатам исследования отмечено некоторое генетическое родство изучаемых гибридов с устойчивыми к вирусу кустистой карликовости сортами.

Ключевые слова: дендрограммы генетического сходства, вирус кустистой карликовости малины, малина ремонтантная, молекулярно-генетический анализ, устойчивость, ISSR-PCR.

ВККМ – вирус кустистой карликовости малины (ВККМ, Raspberry bushy dwarf virus) является одним из самых вредоносных вирусов малины и ежевики [4. С. 265-270]. Вирус обнаружен практически во всех районах выращивания культурных растений рода *Rubus* [3. С. 6]. ВККМ вызывает развитие хлорозов, некрозов, деформированных и «рассыпчатых» плодов, что приводит к существенному снижению продуктивности растений (до 50 %). В естественной среде обитания вирус передается вместе с пыльцой и при размножении семенами [5. С. 4].

Перспективными для селекции являются сорта малины, обладающие устойчивостью к вирусу на генетическом уровне. Молекулярно-генетическое маркирование является быстрым и эффективным способом определения наличия резистентности к ВККМ.

Цель исследования: проведение молекулярно-генетического исследования ДНК малины для выявления генетической устойчивости к вирусу кустистой карликовости малины.

Полученные результаты позволяют дифференцировать разные формы малины, определять степень их родства, изучать генетическое разнообразие и определять потенциально устойчивые и чувствительные к ВККМ сорта. Результаты исследования можно использовать при проведении селекционного процесса для поиска устойчивых к ВККМ форм. Исследования в данной области могут повысить скорость селекционного процесса, направленного на выведение устойчивых к ВККМ сортов малины.

В настоящем исследовании было проанализировано образцы ДНК ремонтантной малины 10 сортов методом ISSR-PCR. В процессе исследования проанализировано 30 образцов.

В ходе исследования были применены модифицированные общепринятые методики молекулярно-генетических исследований [1. С. 236-238]. Молекулярно-генетический анализ проводился в 5 этапов:

- получение препаратов ДНК растений малины, чувствительных и устойчивых к ВККМ;
- проведение ISSR-PCR;
- гель-электрофорез продуктов ISSR-PCR;
- анализ и обработка электрофореграмм, полученных в ходе гель-электрофореза, построение дендрограмм.

Аmplификацию ДНК проводили в многоканальном программируемом термостате «Терцик» («ДНК-Технология»). Для анализа использовали усовершенствованную Taq ДНК-полимеразу Dream™ компании «Fermentas». Состав ПЦР-смеси на одну реакцию указан в таблице 1.

Таблица 1

Состав смеси для проведения анализа методом ISSR-PCR

| № п/п | Компонент | Объем, мкл |
|-------|---------------------------------------|------------|
| 1 | Вода деионизированная | 13,8 |
| 2 | 10X буфер DreamTaq™ Green | 2 |
| 3 | dNTP Mix (2 mM/ml) | 2 |
| 4 | ISSR-праймер (50 пмоль/мкл) | 1 |
| 5 | Taq ДНК-полимеразу Dream™ (5000 u/ml) | 0,2 |
| 6 | Геномная ДНК | 1 |
| | Всего | 20 |

Температурный режим реакции приведен в таблице 2. При проведении исследования использован ISSR-праймер UBC-840, последовательность и температура отжига которого указана в таблице 3.

Таблица 2

Температурный режим ПЦР

| Этап | Температура, °С | Время, сек | Количество циклов |
|-----------------------|-----------------|------------|-------------------|
| Первичная денатурация | 94 | 240 | |
| Денатурация | 94 | 35 | 37 |
| Отжиг | 52 | 30 | 37 |
| Элонгация | 72 | 120 | 37 |
| Финальный синтез | 72 | 240 | |

Таблица 3

Характеристика праймера, используемого для проведения ISSR-PCR

| Наименование | 5'-3' последовательность | Температура отжига |
|--------------|--------------------------|--------------------|
| UBC-840 | (GA) ₈ YT | 52 °С |

Методом горизонтального электрофореза проводили разделение продуктов ISSR-PCR в 2 % агарозном геле. Условия проведения электрофореза: V – 120 В; t – 2 часа. При проведении электрофореза использовался маркер M27, содержащий 12 фрагментов от 100 до 3000 bp (100 bp+1.5 Kb+3 Kb, компании «Сибэнзим»). Определяли длину и количество полученных ампликонов, рассчитывали степень схожести анализируемых образцов малины по коэффициенту Сёренсена-Чекановского:

$$K = \frac{2c}{a+b} \quad (1)$$

где a – количество полиморфных ампликонов выбранного образца; b – количество полиморфных ампликонов другого образца; c – число совпадающих ампликонов для двух образцов. Коэффициент может иметь значения в диапазоне от 0 до 1 [2. С. 61-65].

Вычисление генетической дистанции производилось по формуле: 1 – K . По значениям генетического сходства построен дендрит, на основе анализа которого были выделены отдельные кластеры. Дендрограмма выполнена с использованием программы STATISTICA 3.0 (StatSoft).

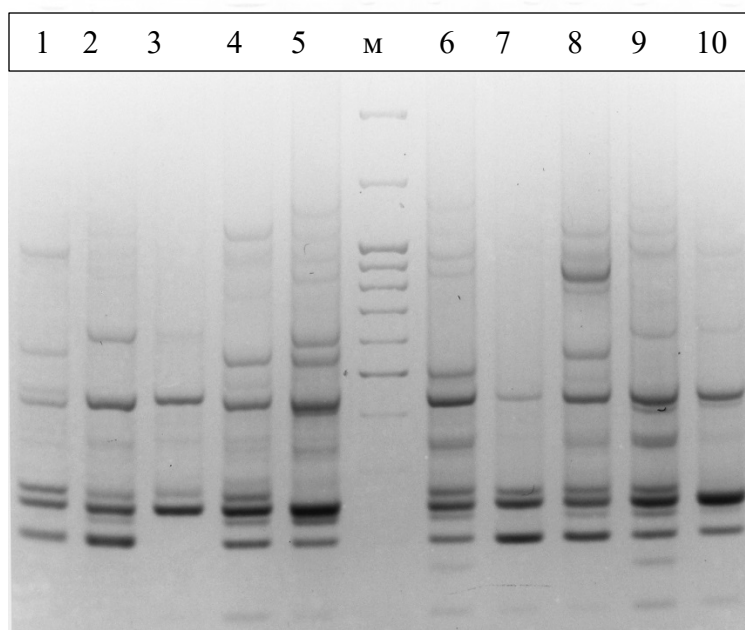


Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов ISSR-PCR некоторых образцов малины с праймером UBC-840: образцы под номерами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, м – маркер.

С использованием ISSR-праймера UBC-840 было получено 25 воспроизводимых полиморфных ампликонов длиной от 200 бп до 1267 бп (рис. 1). Общими ампликонами для всех анализируемых сортов являлись фрагменты длиной 240 бп и 940 бп.

Составлены генетические паспорта чувствительных и устойчивых к ВККМ сортов малины (табл. 4). Уникальных ампликонов, точно указывающих на устойчивость или чувствительность к ВККМ, не обнаружено.

Таблица 4

Характеристика амплифицированных фрагментов ДНК малины чувствительных и устойчивых сортов к ВККМ методом ISSR-PCR с праймером UBC-840

| № | Длина, п.н. | Устойчивые к RBDV | | | | Чувствительные к RBDV | | | Статус неизвестен | | |
|----|-------------|-------------------|---|---|---|-----------------------|---|---|-------------------|---|----|
| | | 2 | 4 | 5 | 6 | 1 | 3 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1. | 1267 | | | + | + | + | + | + | | + | |
| 2. | 1077 | + | + | + | + | | + | + | + | + | + |
| 3. | 1003 | | | | + | | | | | | |
| 4. | 940 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5. | 905 | | | | + | | | | | | + |
| 6. | 837 | + | | + | | | | + | | | |
| 7. | 757 | | | | | + | + | + | | | |
| 8. | 700 | | | | | | + | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9. | 610 | | | | | + | | | | | |
| 10. | 595 | + | + | + | + | | + | | | | |
| 11. | 560 | | | | | | | | + | + | |
| 12. | 550 | | | | | | | + | | | |
| 13. | 530 | | | | + | | | | | | |
| 14. | 495 | | | + | | | + | | + | + | |
| 15. | 430 | | | | | + | | | | | |
| 16. | 420 | + | | + | + | | + | + | + | + | + |
| 17. | 400 | + | + | | | | + | | + | + | |
| 18. | 360 | + | | | + | + | + | | | | |
| 19. | 337 | + | | + | + | | + | + | + | + | + |
| 20. | 317 | | + | + | + | | | + | | + | + |
| 21. | 287 | | | | | | + | | | | |
| 22. | 267 | | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 23. | 240 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 24. | 227 | + | + | + | + | | + | + | + | + | + |
| 25. | 200 | + | + | + | + | | + | + | + | + | + |

В процессе кластерного анализа выявлено, что исследуемые образцы с неизвестным статусом устойчивости к ВККМ № 8, № 9 и № 10 имели значительное генетическое сходство с устойчивыми к вирусу образцами. Возможно, у данных гибридов существует генетическая устойчивость к вирусу (рис. 2).

Родственные образцы № 8 и № 9 формировали общий кластер и имели наибольшее генетическое сходство с устойчивым к ВККМ образцом №4. Данные формы также имели родство с резистентным образцом № 2, а также с чувствительным образцом № 3.

Гибрид № 10 имел наибольшее генетическое родство с устойчивым к ВККМ образцом № 6, а также образовывал кластер совместно с устойчивым образцом № 5 и чувствительным образцом № 7.

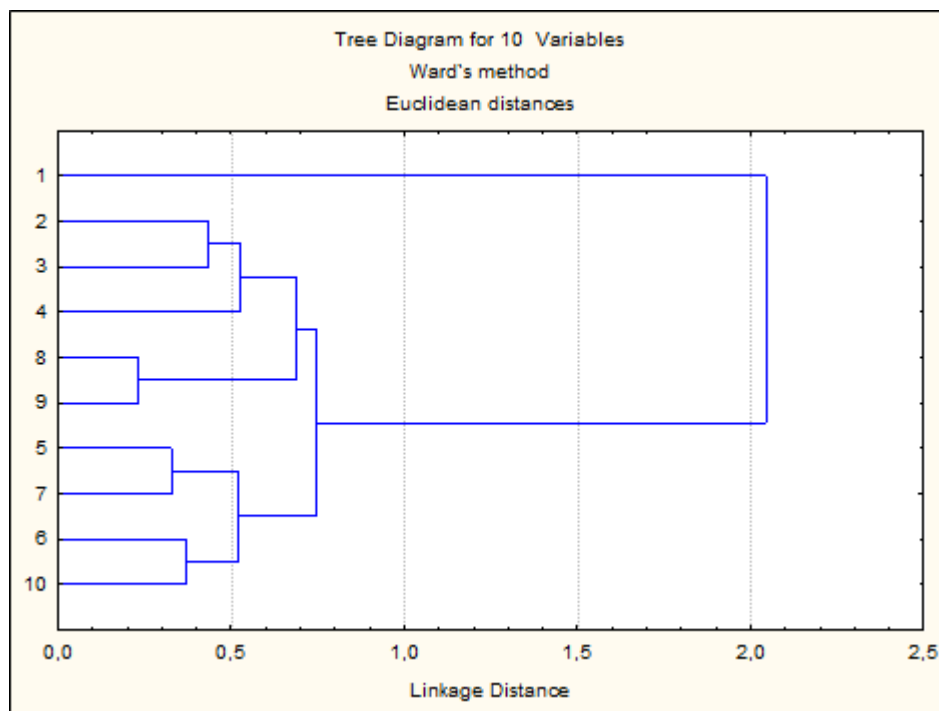


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства сортов малины по праймеру UBC-840

Анализ дендрограммы по праймеру UBC-840 показал некоторое генетическое сходство исследуемых образцов. Однако эти данные ограничены в применении по причине недостаточного числа полиморфных ампликонов, образующихся при использовании для анализа только одного праймера.

Библиографический список:

1. Генная инженерия растений: лабораторное руководство. Пер. с англ. / Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж, Р. Уолден. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
2. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ: учебное пособие. – М.: Издательство БИНОМ, 2009. – 256 с.
3. Jones A.T., Mayo M.A. Raspberry bushy dwarf idaeovirus // Association of Applied Biologists Descriptions of Plant Viruses. – 1998. – №360. – P. 6.
4. Martin R.R. Virus diseases of Rubus and strategies for their control // Acta Horticulturae: VIII International Rubus and Ribes Symposium. – 2002. – Vol. 585. –P. 265-270.
5. Murrant A.F. Raspberry bushy dwarf virus // Description of Plant Viruses, No. 165. Commonwealth Mycological Institute and the Association of Applied Biologists. – UK, 1976. – 4 p.

MOLECULAR GENETIC RESEARCH OF RASPBERRY PLANTS FOR DETECTION OF RBDV RESISTANCE MARKERS

Tarasova Elizaveta Valentinovna – 1st year student of the magistracy of the Bryansk State University named after academician I.G. Petrovsky. Russian Federation.

Scientific supervisor– Elena Valentinovna Nemtsova, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biology, Bryansk State University named after Academician I.G. Petrovsky. Russian Federation.

Abstract: DNA samples of raspberries of 10 varieties were analyzed using 5 sets of primers. During the study, 30 samples were analyzed. A high intra-specific genetic polymorphism was found. Genetic passports for sensitive and resistant raspberry varieties have been developed, dendrograms of genetic relationship have been constructed. According to the results of the study, it was revealed that the studied promising hybrids had a significant genetic relationship with varieties resistant to BKKM, which made it possible to assume that these forms of possible resistance to the virus.

Keywords: dendrograms of genetic similarity, raspberry bushy dwarf virus, remontant raspberry, molecular genetic analysis, resistance, ISSR-PCR.