

УДК 634.11:577.21

UDC 634.11:577.21

**АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНА САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ У
НЕКОТОРЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СОРТОВ
ГРУШИ (*PYRUS COMMUNIS* L.) С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНСЕНСУСНЫХ И
S5, S8, АЛЛЕЛЬ - СПЕЦИФИЧНЫХ ДНК
МАРКЕРОВ**

**ANALYSIS OF ALLELIC POLYMORPHISM OF
SELF-INCOMPATIBILITY IN SOME RUSSIAN
VARIETIES OF PEARS (*PYRUS COMMUNIS* L.)
USING CONSENSUS AND S5 AND S8, ALLELE -
SPECIFIC DNA MARKERS**

Супрун Иван Иванович
к.б.н., зав. лабораторией

Suprun Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci. head of the laboratory

Токмаков Сергей Вячеславович
к.б.н., научный сотрудник

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich
Cand.Biol.Sci., staff scientist

Макаркина Марина Викторовна
младший научный сотрудник
*Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт садоводства и
виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет
Победы, 39,
supruni@mail.ru*

Makarkina Marina Viktorovna
junior researcher
*North-Caucasian Zonal Research Institute of
Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let
Pobedy street, 39
supruni@mail.ru*

В ходе выполнения исследований был выполнен анализ аллельного полиморфизма гена самонесовместимости груши у востребованных в производстве и селекции современных сортов груши из коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСИВ. На первом этапе работы использовали консенсусные праймеры PycomC1F и PycomC5R. С учетом полученных данных, после идентификации аллелей у изученных сортов с применением консенсусных праймеров, был проведен анализ с применением аллель специфичных S5 и S8 ДНК-маркеров, подтвердивший наличие/отсутствие данных аллелей у изученных сортов

In the process of the research we had accomplished an analysis of allelic polymorphism of self-incompatibility in pears in demand in the production and breeding of modern varieties of pears of North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture collection of genetic resources. In the first stage the consensus primers PycomC1F and PycomC5R were used. With obtained data, after identification of the alleles studied in varieties using consensus primers an allele specific S5 and S8 DNA markers were used for confirming the presence / absence of data allele studied cultivars

Ключевые слова: ГРУША, *PYRUS COMMUNIS* L., ДНК - МАРКИРОВАНИЕ, ГЕН САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ, АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ

Keywords: PEAR, *PYRUS COMMUNIS* L., DNA-MARKERS, SELF-INCOMPATIBILITY GENE, ALLELIC POLYMORPHISM

Введение

Исследование самонесовместимости, явления, предотвращающего самоопыление, являются актуальными на сегодняшний день в мировой научной практике генетических исследований плодовых культур. Это обусловлено как перспективностью использования данных об аллельном составе S-гена (гена самонесовместимости), у сортов для прогнозирования

их совместимости при опылении и, соответственно, оптимизации сортовых схем садовых насаждений, так и возможностью использования данных об аллельном составе *S*-гена для составления ДНК - паспортов сортов, ввиду высокой аллельной изменчивости его локуса.

Ген самонесовместимости (*S*-ген) в популяциях самонесовместимых, перекрестноопыляемых растений представлен, как правило, серией множественных аллелей. Пыльцевые трубки, прорастающие из пыльцы с определенной аллелью гена *S* ингибируются в пестиках растений, несущих тот же аллель. Механизм взаимодействия аллелей *S*-гена обусловлен взаимодействием продуктов гена, таковыми являются ферменты рибонуклеазы (*S*-РНКазы, *S*-RNase), локализованные в тканях пестика цветка, а также, белковые компоненты пыльцевых зерен (*F*-box proteins) [1].

Белок *F*-box protein, является белком-гликопротеином и относится к классу Е3 полиубиквитин лигаз, ферментом, ковалентно присоединяющим убиквитин к белку-мишени изопептидной связью [2]. Данный белок выполняет полиубиквитинизацию *S*-РНКазы, локализованной в тканях пестика, что приводит к ее деградации, и дает возможность дальнейшему росту пыльцевой трубки. Это происходит если пыльцевое зерно и пестик несут разный *S*-генотип. Если на пестик попадает пыльца с одинаковым *S*-генотипом, *F*-box белок не модифицирует *S*-РНКазу пестика, которая, таким образом сохраняет функциональную активность и ингибирует рост пыльцевой трубки [3].

Общепринято деление систем самонесовместимости на спорофитные (фенотип пыльцевого зерна определяется диплоидным геномом материнского растения) и гаметофитные (фенотип определяется только генами, которые несёт данное пыльцевое зерно). Функционально это обусловлено тем, что в случае спорофитного типа самонесовместимости вещества, обуславливающие протекание данного явления, поступают в

пыльцевое зерно из материнских тканей спорофита. В случае же с гаметофитным типом вещества самонесовместимости продуцируются протопластом самой микроспоры.

Груша (*Pyrus communis*), как и всё семейство Rosaceae, принадлежит к растениям с моногенным гаметофитным контролем реакции самонесовместимости. Развитие молекулярно-биологических методов позволило изолировать матричные РНК, синтезируемые с различных аллелей S-гена черешни и груши, что дало возможность выяснить его структурную организацию у данных видов.

В последовательности данного гена у груши был выявлен один интрон. При этом в последовательности интрона было идентифицировано 5 консервативных участков, один из которых (RC4) является специфичным для розоцветных – C1, C2, C3, RC4, C5. Между консервативными участками расположены вариабельные. Для идентификации аллелей, на основании информации о структурном полиморфизме данного гена, были разработаны как аллель - специфичные ДНК-маркеры, так и консенсусные (константные праймерные пары), позволяющие идентифицировать аллели S-гена. Аллельспецифичные ДНК-маркеры разработаны таким образом, что при ПЦР синтезируются фрагменты только одной целевой аллели – праймеры имеют один, аллель - специфичный сайт отжига. Консенсусные ДНК-маркеры имеют сайты отжига на консервативных участках, что позволяет синтезировать продукты ПЦР с нескольких аллелей, но продукт ПЦР, при этом отличается по размеру, за счет того, что праймеры и, соответственно, сайты их отжига на консервативных участках фланкируют (расположены на границах) вариабельные участки и (или) гипервариабельный [4, 5].

Использование ДНК-маркеров определило возможность идентификации аллелей гена среди образцов коллекций генетических ресурсов груши в различных странах, где возделываются данная культура.

Данная научная проблема является актуальной в генетических исследованиях, как для груши и семейства Розоцветных, так и в целом для многих видов культурных растений с перекрестным типом опыления [6-9].

Был выполнен ряд исследований, направленных на идентификацию аллельных комбинаций S-гена с применением ДНК - маркерного анализа.

Так, коллектив М. Мота с соавторами (2007) выполнил идентификацию аллельных комбинаций S-гена для 14 сортов Португальской селекции [10]. В ходе выполнения другого исследования, анализ аллельного разнообразия данного гена позволил определить 13 групп совместимости при изучении Европейской коллекции сортов груши и идентифицировать S-генотипы для исследуемых образцов [4]. На настоящий момент у груши, с применением молекулярно-генетических методов идентифицировано 24 аллели. В 2009 году Goldwaya M., с соавторами предложил провести ренумерацию аллелей и выявил новый аллель, с номером 109, присвоенный, соответственно с новой, предложенной им номенклатурой аллелей [11].

Однако Sanzol J., один из мировых научных лидеров по данному направлению в генетике груши, в том же году выполнил исследование по созданию расширенного набора новых аллель - специфичных ДНК-маркеров для S-гена груши и предложил оставить прежнюю нумерацию, которая и является более общепринятой на сегодняшний день [12].

В связи с актуальностью данного направления исследований в генетике, как груши, так и плодовых культур в целом, нами поставлена задача выполнить молекулярно-генетическую идентификацию аллельного состава S-гена у некоторых сортов груши отечественной селекции с применением консенсусных ДНК-маркеров и последующим дополнительным подтверждением наличия аллелей S8 и S5 с применением аллель - специфичных ДНК-маркеров.

Объекты и методы исследований

В ходе исследований был выполнен анализ 16 сортов груши обыкновенной из коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиВ. Большая летняя; Джанкойская поздняя; Зимняя млиевская; Запорожская; Мальвина; Перлына, Славянка, Сочинская крупноплодная; Вербена; Вильям ставропольский, Краснодарская зимняя; Самородок; Шихан, Велеса, Скрамница, Вега. ДНК экстрагировали из молодых листьев методом ЦТАБ [13].

Для идентификации аллелей гена самонесовместимости использовали метод полимеразной цепной реакции ПЦР с праймерами РусомС1F и РусомС5R, комплементарными соответствующим консервативным регионам С1 и С5 S-гена и аллель-специфичные праймеры по аллелям S8, S14 [12].

Для повышения специфичности синтеза без дополнительного увеличения неспецифических продуктов была использована ступенчатая ПЦР:

2 минуты при 94°C начальная денатурация; - следующие 10 циклов: 20 секунд денатурация при 94°C ; 1 минута отжиг праймеров при 55°C ; 1,5 минуты элонгация при 72°C; - следующие 10 циклов: 20 секунд при 94°C; 1 минута при 55°C с убыванием температуры на -0,3°C при каждом новом цикле; 1,5 минуты при 72°C; - следующие 15 циклов: 20 секунд при 94°C; 1 минута при 52°C; 1,5 минуты при 72°C; завершающий цикл элонгации 5 минут при 72°C [12].

Электрофорез проводили в 2% агарозном геле в течение 30 минут при напряжении 150 вольт. Гелевые пластины окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолете.

Результаты исследований.

Применяемые консенсусные праймеры по некоторым аллелям, при

ПЦР, дают продукты амплификации сходного размера, поэтому при их одновременном присутствии в генотипе, выявляется один фрагмент на электрофореграмме. Затруднена идентификация между аллелями S6, S8, S11, S22 у которых продукты находятся в диапазоне 670-683 пары нуклеотидов, а также между аллелями S5, S7, S9, S14, S21, S23 и S24 с продуктами в диапазоне 642-661 пар нуклеотидов.

На рисунке 1 представлен пример электрофоретического разделения продуктов полимеразной цепной реакции с консенсусной праймерной парой РусомС1F и РусомС5R, комплементарной консервативным участкам гена самонесовместимости, у ряда сортов груши обыкновенной.

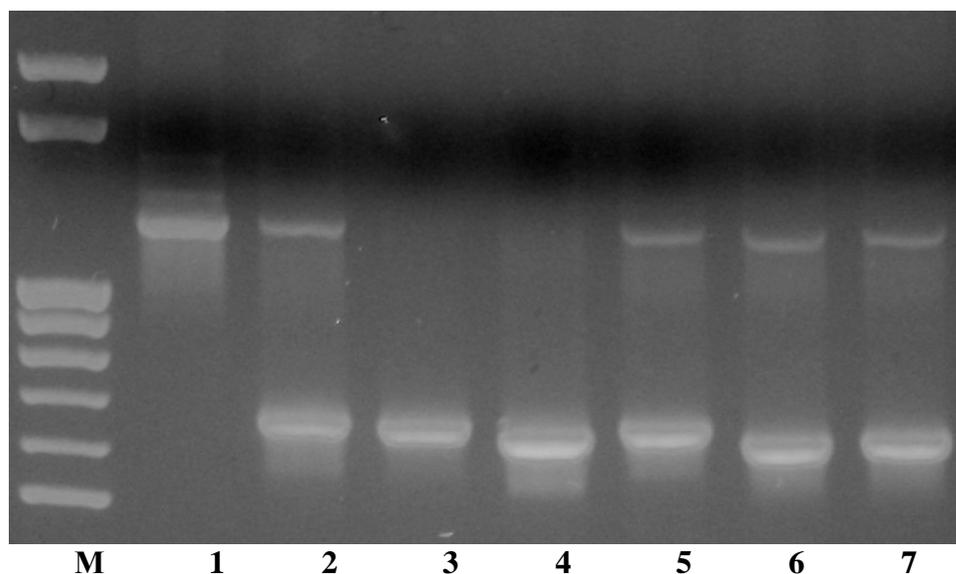


Рисунок 1 Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции с консенсусной праймерной парой РусомС1F и РусомС5R М-маркер молекулярной массы ДНК, 1 – груша иволистная, 2-7 сорта груши обыкновенной: 2-Славянка; 3-Большая летняя; 4-Вега; 5-Скромница; 6-Сочинская крупноплодная; 7-Вильямс ставропольский

По результатам молекулярно-генетического анализа самонесовместимости с применением консенсусных праймеров у значительной части сортов был выявлен четко различимый продукт

свойственный S1 аллелю размером 1302 пары нуклеотидов. Выделены следующие группы сортов груши со сходным размером продуктов ПЦР:

Для сортов Славянка, Большая летняя, Скромница, Запорожская, Краснодарская зимняя, Зимняя Млиевская, Велеса были выделены ПЦР-продукты в диапазоне 670-683 пар нуклеотидов, характерном для аллелей S6,S8 и S11, а также редко встречающейся в мировом генофонде аллели S22.

Сорта Вега, Сочинская крупноплодная, Вильямс ставропольский, Мальвина, Велеса, Вербена и Джанкойская поздняя обладали ПЦР-продуктами в пределах диапазона 642-661 пар нуклеотидов, свойственного как аллелям S5,S7,S9,S14 так и значительно менее распространенным S21,S23 и S24.

Учитывая результаты генотипирования сортов груши, полученные с использованием консенсусных праймерных пар был выполнен анализ с применением аллель - специфичных ДНК-маркеров. На данном этапе изучаемые сорта груши обыкновенной (Славянка, Большая летняя, Вега, Скромница, Сочинская крупноплодная, Вильямс ставропольский, Мальвина и Велеса) были проанализированы с использованием аллель - специфичных маркеров на наличие S8 и S5 аллелей.

На рисунке 2 представлен электрофорез продуктов ПЦР, полученных с аллель - специфичной праймерной парой по S8 аллелю с целевым продуктом 613 п.н. - целевой фрагмент отмечен стрелкой.

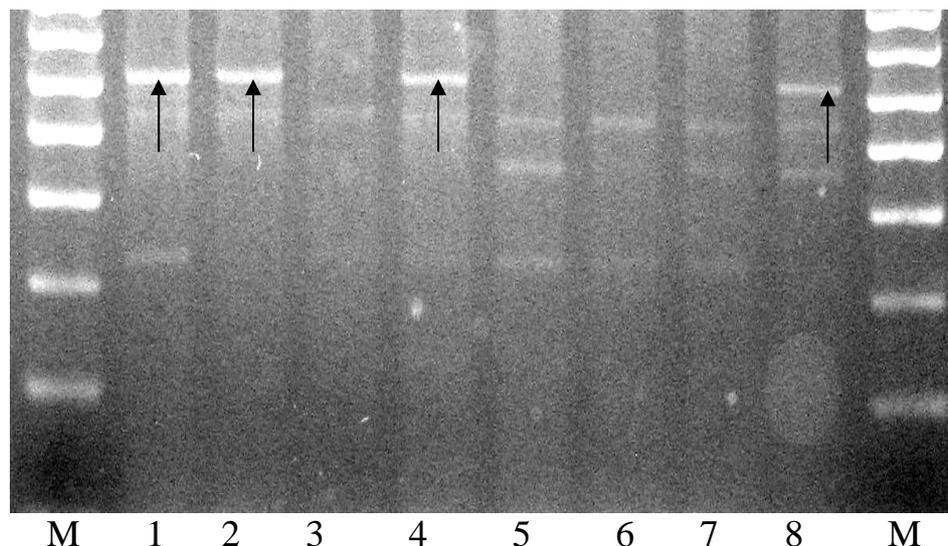


Рисунок 2 Результаты аллель - специфичной ПЦР по аллели S8 у отечественных сортов груши обыкновенной
 М – маркер молекулярной массы ДНК.

1-8 сорта груши: 1 – Славянка; 2 – Большая летняя; 3 – Вега; 4 – Скромница; 5 – Сочинская крупноплодная; 6 – Вильямс ставропольский; 7 – Мальвина; 8 – Велеса.

Комбинирование данных, полученных с использованием консенсусных и аллель - специфичных ДНК-маркеров позволило сделать выводы о наличии ряда аллелей у изученных сортов и определить перечень аллелей, по которым требуется дополнительная проверка по аллель - специфичным ДНК-маркерам, не использованным на данном этапе работы (Таблица 1).

На основе полученных данных был полностью идентифицирован аллельный набор у сортов Славянка и Скромница – S1S8. Для ряда сортов была идентифицирована одна из аллелей: Большая летняя (S8), Скромница (S5), Сочинская крупноплодная (S1), Вильямс ставропольский (S1), Запорожская (S1), Краснодарская зимняя (S1), Перлына (S1), Самородок (S1), Шихан (S1), Вега (S5).

Таблица 1 Обобщенные данные по консенсусным праймерам РусомС1F и РусомС5R и аллель - специфичным маркерам для аллелей S8 и S5.

Сорта	Консенсусные праймеры РусомС1F и РусомС5R			Аллель-специфичные праймеры		Аллели
	S1	S6S8S11	S5S7S9S14	S5	S8	
1 Славянка	+	+		-	+	S1/S8
2 Большая летняя		+		-	+	S8/?
3 Вега			+	+	-	S5/?
4 Скромница	+	+		-	+	S1/S8
5 Сочинская крупноплодная	+		+	-	-	S1/(S7S9) *
6 Вильямс ставропольский	+		+	-	-	S1/(S7S9)
7 Мальвина			+	-	-	(S7S9)/?
8 Запорожская	+	+		-	-	S1/(S6S8S11)
9 Краснодарская зимняя	+	+		-	-	S1/(S6S8S11)
10 Перлына	+			-	-	S1/?
11 Зимняя млиевская		+		-	-	S6S8S11/?
12 Велеса		+	+	-	+	S8/(S7S9)
13 Вербена			+	-	-	(S7S9S14)/?
14 Самородок	+			-	-	S1/?
15 Джанкойская поздняя			+	-	-	S7S9S14/?
16 Шихан	+	+		-	-	S1/(S6S8S11)

Примечание:

* Для сортов, у которых в скобках перечислены предполагаемые аллели, необходимо выполнение дополнительного анализа по аллель - специфичным ДНК-маркерам. «?» – предполагаемая аллель по данному сорту не установлена. “ - “ – продукт амплификации отсутствует, “ + “ – продукт амплификации обнаружен.

Как видно из представленных результатов, наиболее распространенным аллелем гена самонесовместимости является S1. Этот факт согласуется с литературными данными о частоте встречаемости данного аллеля у сортов груши зарубежной селекции, так как S1 аллель является одной из наиболее распространенных в мировой генетической плазме исследуемой культуры.

Заключение.

Результаты исследования дополняют информацию об аллельном

полиморфизме S-гена в пределах вида *Pyrus communis*. Полученные данные будут использованы для дальнейших исследований по идентификации аллельных комбинаций S-гена с применением аллель-специфичных ДНК-маркеров. Информация о комбинациях аллелей в сортах отечественной селекции, послужит основой для прогнозирования эффективности опыления и, соответственно для подбора эффективных сортов-опылителей. Помимо этого, информация об аллельном составе S-гена в дальнейшем может быть использована для идентификации генотипов, составления генетических паспортов сортов в комплексе с другими типами ДНК - маркерных систем, используемых для оценки генетического разнообразия.

Исследования выполняются при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 13-04-96597 р_юг_а)

Литература

1. Kao T.H., Tsukamoto T. The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility // *The Plant Cell*. - 2004.- № 16, P. 72–83.
2. Deshaies R.J. SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases // *Annual Review of Cell Development Biology*.- 1999.- №15.- P. 435-467.
3. Ushijima K., Sassa H., Tao R. et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae // *Molecular Genomics and Genetics*.- 1998.- № 260.- P. 261-268.
4. Sanzol J., Robbins T. P. Combined analysis of S-alleles in European pear by pollinations and PCR-based S-genotyping; correlation between S-phenotypes and S-RNase genotypes // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2008. – №. 2. – P. 213-224.
5. Zuccherelli S., Tassinari P., Broothaerts W., et al. S-Allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sex Plant Reproduction* - 2002.- № 15.- P.153–158.
6. Суриков, И. М. Несовместимость и эмбриональная стерильность растений. – М., 1991. – 220 с.
7. Супрун И. И., Ульяновская Е. В., Ушакова Я. В., Ильницкая Е.Т. Молекулярно-генетическая идентификация аллелей гена самонесовместимости у сортов яблони отечественной селекции // *Доклады РАСХН*. – 2011. – №5. – С. 15-17.
8. Супрун И.И., Ульяновская Е.В., Степанов И.В. Изучение аллельного полиморфизма гена самонесовместимости и цитологических особенностей опыления сортов яблони // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2012. № 13. С. 11-18.
9. Супрун И.И., Степанов И.В., Токмаков С.В. Молекулярно-генетические

аспекты самонесовместимости яблони // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.- 2012.- № 80. С. 80-89.

10. Mota M., Tavares L., Oliveira C. M. Identification of *S*-alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cv. 'Rocha' and other European cultivars // *Scientia Horticulturae*. – 2007. №. 1. – P. 13-19.

11. Goldwaya M., Takashi T.-Y., Sanzol J., et al. Renumbering the *S*-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis* L.) and cloning the S109 RNase allele // *Scientia Horticulturae*.- 2009.- № 119.- P. 417–422.

12. Sanzol J. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (*S*-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles // *Tree Genetics & Genomes*.- 2009.- №5.- P. 393–405.

13. Murray M.G. and Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*.- 1980.- V.10.- P. 4321-4325.

References

1. Kao T.H., Tsukamoto T. The Molecular and Genetic Bases of *S*-RNase-Based Self-Incompatibility // *The Plant Cell*. - 2004.- № 16, P. 72–83.

2. Deshaies R.J. SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases // *Annual Review of Cell Development Biology*.- 1999.- №15.- P. 435-467.

3. Ushijima K., Sassa H., Tao R. et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding *S*-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the *S*-RNases in Rosaceae // *Molecular Genomics and Genetics*.- 1998.- № 260.- P. 261-268.

4. Sanzol J., Robbins T. P. Combined analysis of *S*-alleles in European pear by pollinations and PCR-based *S*-genotyping; correlation between *S*-phenotypes and *S*-RNase genotypes // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2008. – №. 2. – P. 213-224.

5. Zuccherelli S., Tassinari P., Broothaerts W., et al. *S*-Allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sex Plant Reproduction* - 2002.- № 15.- P.153–158.

6. Surikov I. M. Nesovmestimost' i jembrional'naja steril'nost rastenij.-M.,1991.-220.

7. Suprun I. I., Ul'janovskaja E. V., Ushakova Ja. V., Il'nickaja E.T. Molekuljarno-geneticheskaja identifikacija allelej gena samonesovmestivosti u sortov jabloni otechestvennoj selekcii // *Doklady RASHN*. – 2011. – №5. – S. 15-17.

8. Suprun I.I., Ul'janovskaja E.V., Stepanov I.V. Izuchenie allelnogo polimorfizma gena samonesovmestivosti i citologicheskikh osobennostej opylenija sortov jabloni // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Juga Rossii*. 2012. № 13. S. 11-18.

9. Suprun I.I., Stepanov I.V., Tokmakov S.V. Molekuljarno-geneticheskie aspekty samonesovmestivosti jabloni // *Politematicheskij setevoy jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*.- 2012.- № 80. S. 80-89.10. Mota M., Tavares L., Oliveira C. M. Identification of *S*-alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cv. 'Rocha' and other European cultivars // *Scientia Horticulturae*. – 2007. №. 1. – P. 13-19.

11. Goldwaya M., Takashi T.-Y., Sanzol J., et al. Renumbering the *S*-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis* L.) and cloning the S109 RNase allele // *Scientia Horticulturae*.- 2009.- № 119.- P. 417–422.

12. Sanzol J. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (*S*-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles // *Tree Genetics & Genomes*.- 2009.- №5.- P. 393–405.

13. Murray M.G. and Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant

DNA // Nucleic Acids Research.- 1980.- V.10.- P. 4321-4325.