

УДК 634.11:577.21

UDC 634.11:577.21

03.00.00 Биологические науки

Biology

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ S2 И S10 ГЕНА САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ У КРЕБОВ И ЭЛИТНЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ ЯБЛОНИ

IDENTIFICATION OF S2 AND S3 ALLELES OF SELF-INCOMPATIBILITY GENE IN CRAB APPLE AND ADVANCED BREEDING SELECTIONS

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук, SPIN-код: 7124-5304, Scopus ID – 55976135800, Researcher ID – K-9114-2017
supruni@mail.ru

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci., SPIN: 7124-5304, Scopus ID – 55976135800, Researcher ID – K-9114-2017
supruni@mail.ru

Токмаков Сергей Вячеславович
к.б.н., научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ):3196-9049

Tokmakov Sergei Vyacheslavovich
Cand. Biol. Sci., staff scientist
SPIN: 3196-9049

Ульяновская Елена Владимировна
д-р с.-х. наук, зав. лабораторией сортоизучения и селекции садовых культур, SPIN-код: 5577-5173

Ulyanovskaya Elena Vladimirovna
Dr. Sci. Agr., Head of Laboratory of Variety study and Breeding of Garden crops, SPIN: 5577-5173

Степанов Илья Владимирович
младший научный сотрудник, SPIN-код: 3968-1982
ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия", Краснодар, 350901, Россия, ул. 40-летия Победы, 39

Stepanov Ilya Vladimirovich
Junior researcher, SPIN: 3968-1982
Federal State Budget Scientific Organization "North-Caucasian Federal Research Center of Horticulture, Viticulture and Vine production", Krasnodar, Russia

Промышленное садоводство предполагает максимально эффективное использование биологического потенциала культивируемых сортов. Одним из ключевых факторов, определяющим урожайность садовых насаждений является эффективность опыления. Для получения максимального урожая необходимо обеспечение полноценного опыления в период цветения. По этой причине вопросу подбора опылителей уделяется большое внимание. Некоторые кребы достаточно перспективны для использования в качестве опылителей для основных промышленных сортов яблони и создания односортовых насаждений, поэтому данная работа была направлена на идентификацию наиболее распространенных аллелей гена самонесовместимости у кребов с использованием молекулярно-генетического метода анализа. Объектом исследования послужили 27 кребов и 2 элитные селекционные формы яблони. Выполняли молекулярно-генетическую идентификацию аллелей S2 и S10, которые относятся к числу наиболее распространенных в мировом генофонде яблони. Аллель S2 идентифицировался у 14 образцов (13 кребов и 1 элитной селекционной формы), в то время как аллель S10 у одного образца (элитной формы 12/2-20-(24-28)). Данные по аллельному составу S-гена у изученных образцов представляют ценность для формирования генетического паспорта по совместимости изученных образцов яблони с современными промышленными сортами

Industrial horticulture assumes the most effective use of the potential of varieties. One of the key factors determining the yield of garden plantings is the effectiveness of pollination. To obtain the maximum yield, it is necessary to ensure maximum pollination during the flowering period. For this reason, much attention has been paid to the selection of pollinators. Crab-apple forms are promising for use as pollinators, so this work was aimed at identifying the most common alleles of the self-incompatibility gene in the crab-forms using the molecular genetic method of analysis. The object of the study was 29 apple-tree creams and 3 elite selection forms. They carried out the molecular genetic identification of alleles S2 and S10, which are among the most common apple trees in the world gene pool. Allele S2 was identified in 16 samples (14 forms and 2 elite selection forms), while S10 allele in one sample (elite form 12/2-20 (24-28)). Data on the allelic composition of the S gene in the samples studied are of value for the formation of a genetic passport on the compatibility of the studied samples of apple with modern industrial varieties

Keywords: APPLE, POLLINATION, SELF-INCOMPATIBILITY, DNA-MARKERS

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, ОПЫЛЕНИЕ, КРЕБ-ФОРМЫ, САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ, ДНК-МАРКЕРНЫЙ АНАЛИЗ

Doi: 10.21515/1990-4665-132-084

На современном этапе развития методов генетики широкое применение нашли методы ДНК-маркирования, которые основаны на анализе полиморфизма генома. ДНК-маркеры широко используются при изучении генофонда культурных растений: для оценки генетических взаимосвязей изучаемых образцов в коллекциях генетических ресурсов; для ДНК-паспортизации сортов; картирования генов и их отслеживания в селекционном процессе (маркер-опосредованная селекция, позволяющая проводить идентификацию и отбор генотипов, несущих целевые гены, без их оценки по фенотипу) [1]. Необходимо отметить, что ДНК-маркерный отбор может быть наиболее востребованным при оценке признаков, для которых фенотипическая оценка является сложной процедурой или требует временных затрат и зависит от условий окружающей среды.

Для яблони – основной плодовой культуры, высокой актуальностью обладает вопрос, связанный с подбором опылителей и, соответственно, связанным с этим определением совместимости сортов при опылении. От этого напрямую зависит продуктивность садового агроценоза. В системе самонесовместимости яблони основная функция в регуляции принадлежит гену самонесовместимости (*S*-ген). Продукты *S*-гена в пестике – цитотоксические протеины с рибонуклеазной активностью (*S*-РНказы). В процессе самонесовместимого взаимодействия *S*-РНказы контролирует прорастание пыльцевой трубки, проникая в цитоплазму и деградируя пыльцевую РНК [2]. Пыльцевые трубки, прорастающие из пыльцы с определенной аллелью *S*-гена, ингибируются в пестиках растений, несущих тот же аллель [3]. Следовательно, оплодотворение блокируется, когда *S*-аллель пыльцы совпадает с одной или двумя *S*-аллелями пестика.

Два сорта, несущие идентичный набор аллелей S-гена являются несовместимыми. При взаимоопылении таких сортов оплодотворения и последующего формирования плодов не происходит. Сорта, частично совместимые, несут по одной одинаковой S-аллели. Они могут являться опылителями друг для друга, однако эффективность опыления при этом снизится на уровень около 50% [2]. Необходимо сказать, что данный уровень снижения будет обусловлен исключительно генотипом сорта, при воздействии дополнительных факторов (расхождения в сроках цветения, низкая жизнеспособность пыльцы сорта-опылителя, неблагоприятные погодные условия) уровень закладки плодов снизится еще значительно. Очевидно, что для максимальной реализации потенциала продуктивности сортов яблони необходимо выполнять формирование сортовых схем садового насаждения с учетом совместимости при опылении – использовать наиболее эффективных опылителей или комбинации сортов с наибольшим уровнем совместимости. В этой связи, важным этапом является определение аллельного набора S-гена у сортов.

Одним из перспективных путей получения максимального уровня опыления в садовом агроценозе является использование так называемых кребов яблони – сортов и форм, представляющих, как правило, образцы видов рода *Malus* или их межвидовые гибриды с яблоней домашней (*Malus domestica* Borch). Ряд кребов уже зарекомендовали себя в качестве перспективных опылителей для создания моносортных насаждений промышленных сортов, однако, учитывая разнообразие данных сортов и форм и постоянное пополнения промышленного сортимента яблони новыми сортами, следует отметить важность знаний об аллельном составе S-гена у кребов. Это позволит рекомендовать наиболее перспективные среди них для сортов яблони.

Очевидно, что применение ДНК-маркеров для экспресс-идентификации аллельных комбинаций данного гена обладает

значительным преимуществом в сравнении с фенотипической оценкой совместимости, так как может быть выполнено в сжатые сроки. На настоящее время молекулярно-генетический контроль данного процесса глубоко изучен, известно порядка 25 аллелей S-гена. Однако в культурном мировом генофонде яблони наиболее распространены 7-8 основных аллелей, из которых аллели S2, S3, S5, S7, S10 являются наиболее распространенными [4, 5].

Использование ДНК-маркеров определило возможность идентификации аллелей гена самонесовместимости среди образцов коллекций генетических ресурсов яблони в различных странах, где возделывается данная культура [6]. В отечественных генетических исследованиях яблони также получены результаты об аллельных комбинация искомого гена у сортов российской селекции, а также перспективных селекционных форм (элитных форм) [7 – 10].

Важность этих исследований очевидна – появляется возможность прогнозировать степень совместимости сортов при опылении, что позволяет эффективно комбинировать сорта в садовом насаждении, размещая максимально совместимые сорта в саду в непосредственной близости. Это позволит получать наибольший уровень завязи плодов и, соответственно, урожайности, а также создавать моносортные насаждения, экономя затраты на проведение защитных мероприятий и уборку плодов. Наряду с этим, данные об аллельном составе гена самонесовместимости могут являться частью ДНК-паспортов сортов яблони в комплексе с микросателлитным ДНК-фингерпринтом.

В связи с вышесказанным, в задачи наших исследований входило выполнение ДНК - маркерной идентификации аллельных комбинаций гена самонесовместимости у сортов и форм крбев. На данном этапе работы целевыми являлись аллели S2 и S10, относящиеся к числу наиболее распространенных аллелей в мировом сортименте яблони.

Материал и методы исследований

Объектами исследования послужили кребы и элитные селекционные формы яблони. ДНК экстрагировали методом ЦТАБ [11]. Для идентификации аллелей гена самонесовместимости использовали метод полимеразной цепной реакции ПЦР, согласно общепринятым рекомендациям [12] с праймерами, фланкирующими маркерные участки аллелей S2 и S10 гена самонесовместимости [4]. Использовали следующие концентрации компонентов реакционной среды: В состав ПЦР смеси входили: 40-50 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,3мкМ каждого праймера, 1 единица активности (е.а.) Taq-ДНК полимеразы, в общем объеме реакционной смеси 25мкл. Постановку ПЦР осуществляли по следующей программе: 5 минут при 94° С - начальная денатурация; следующие 35 циклов: 30 секунд денатурация при 94° С, 40 секунд отжиг праймеров при 60° С, 30 секунд элонгация при 72° С; последний цикл элонгации 5 минут при 72° С.

Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле, на основе трис боратного буфера при напряжении 150 V в течение 30 минут. Гелевые пластины окрашивали бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолете.

Результаты

Получены результаты молекулярно-генетической идентификации целевых аллелей гена самонесовместимости для 27 кребов и 2 элитных селекционных форм яблони. В изученной выборке образцов идентифицировали обе целевые аллели. На рисунках 1 и 2 представлены результаты ПЦР идентификации данных аллелей у изучаемых образцов.

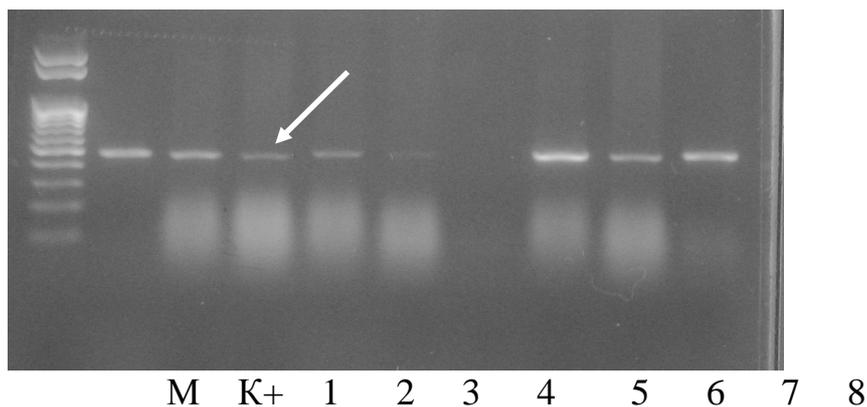


Рисунок 1 – Идентификация аллели S2 у образцов яблони

Примечания: М-маркер молекулярной массы ДНК; К+ - сорт контроль Гала; 1-8- исследуемые образцы яблони: 1- Спартак, 2 - Китайка № 3, 3 - 2-66-10, 4 - Транс Люценс, 5 - Империял Павла, 6 - Пиотош, 7 - Эксельзиор, 8 - Желтогибридное

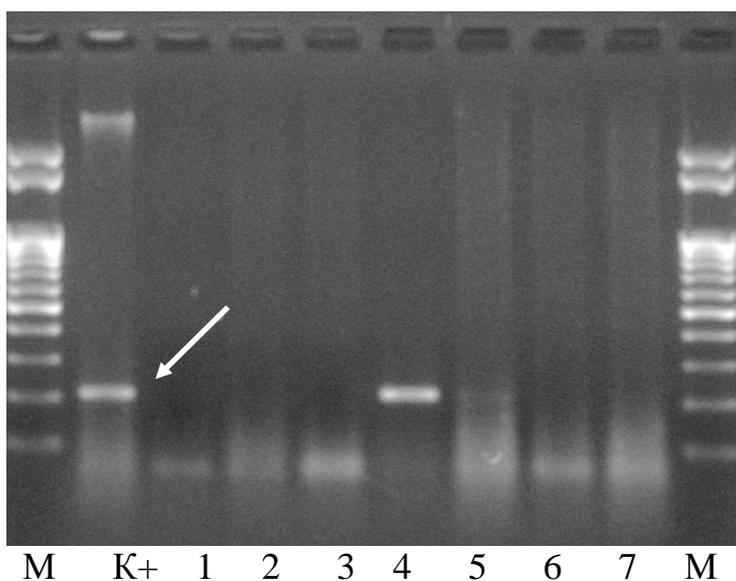


Рисунок 2 – Идентификация аллели S10 у образцов яблони

Примечания: М-маркер молекулярной массы ДНК; К+ - сорт контроль Мекинтош; 1-8 - исследуемые образцы яблони: 1- Желтое румяное, 2- Темно-вишневое, 3- Креб 2-71, 4- 12/1-20-34, 5- 12/2-20(24-28), 6- Геспер Роз, 7- Фейри

Выявление фрагмента на электрофореграмме на уровне, отмеченном стрелкой, соответствующем стандартному образцу, свидетельствует о наличии искомого аллеля гена самонесовместимости, отсутствие фрагмента – об отсутствии аллеля. В ходе исследования идентифицировали все целевые аллели, однако, с разной частотой встречаемости. Наиболее редким оказался аллель S10, который был выявлен у одного образца – элитной формы 12/1-20-34. Результаты генотипирования изученной выборки генотипов яблони по локусу S-гена представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Идентификация аллелей S-гена у образцов яблони

№ п/п	Сорт	S2	S10
1	Пестроокрасное	-	-
2	Красно-вишневое	-	-
3	Краснополосатое	-	-
4	Креб 67-2	+	-
5	Китайка малиновая	-	-
6	Рислинг красный	-	-
7	Виктория	-	-
8	Кетни	-	-
9	Джон Дауни	-	-
10	Долго	+	-
11	Спартак	+	-
12	Китайка № 3	+	-
13	Креб 2-66-10	+	-
14	Транс Люценс	+	-
15	Империап Павла	-	-
16	Пиотош	+	-
17	Эксцельзиор	+	-
18	Желтогибридное	+	-
19	Желтое румяное	+	-
20	Темно-вишневое	+	-
21	Креб 2-71	+	-
22	<u>12/1-20-34</u>	-	+
23	<u>12/2-20(24-28)</u>	+	-
24	Геспер Роз	+	-
25	Фейри	-	-
26	Желто-зеленое	-	-
27	Никита	-	-
28	Гертруда	-	-
29	Экселенц Тиль	-	-

Как видно из таблицы аллели идентифицируются со значительной разницей в частоте встречаемости. Если аллель S2 идентифицировался у

14 образцов (13 кребов и 1 элитной селекционной формы), то аллель S10 – лишь у одного образца (элитной формы 12/2-20(24-28). Примечательно, что аллель S10, относится к наиболее распространенным в мировом генофонде яблони, однако в изученной выборке образцов яблони он не распространен. Видно, что у кребов не идентифицируются одновременно два аллеля из представленных. В случае одновременного наличия у них двух изученных аллелей, которые являются наиболее распространенными, существенно возросла бы вероятность совпадения аллельного набора у кребов и того промышленного сорта, для которого он предлагается как опылитель. На данном этапе работы, можно сделать заключение о том, что кребы Пестроокрасное, Красно-вишневое, Краснополосатое, Китайка малиновая, Рислинг красный, Виктория, Кетни, Джон Дауни, Империял Павла, Фейри, Желтозеленое, Никита, Гертруда и Экселенц Тиль можно рекомендовать, как более перспективные опылители из изученной выборки, так как у них не были выявлены аллели S2 и S10, которые относятся к числу наиболее распространенных в мировом генофонде яблони. Однако, необходимо сказать также и о целесообразности дальнейшего проведения молекулярно-генетической идентификации таких распространенных аллелей как S3, S5, S7, S1. Это даст возможность более обоснованно дать рекомендации по использованию изученных кребов в качестве опылителей для сортов, наиболее распространенных в промышленном садоводстве.

Литература

- 1 Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве / Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология. - 1997.- № 5.- С.3-19.
- 2 Суриков И. М. Несовместимость и эмбриональная стерильность растений. М. 1991. – 220 с.
- 3 Broothaerts W. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple / W. Broothaerts, G. Janssens, P. Proost et al. // Plant Mol Biol. - V. 27. – 1995. — P. 449-511.
- 4 Janssens G. A. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR / G.A. Janssens, I.J. Goderis, W.F. Broekaert et al. // Theor. Appl. Genet. - 1995. – V. 91. – P. 691-698.

5 Broothaerts W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles // *Theor Appl Genet.* - V.106. - 2003. – P. 703–714

6 Hegedûs A. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.) // *International Journal of Horticultural Science.* V. 12. – 2006. – P. 31–36.

7 Супрун И. И. Молекулярно-генетическая идентификация аллелей гена самонесовместимости у сортов яблони отечественной селекции / И. И. Супрун, Е. В. Ульяновская, Я. В. Ушакова, Е. Т. Ильницкая // *Доклады РАСХН.* – 2011. – №5. – С. 15-17.

8 Супрун И. И. Использование методов ДНК-маркирования для идентификации аллелей гена самонесовместимости яблони // И. И. Супрун, Е. В. Ульяновская, Я. В. Ушакова / *Труды Кубанского государственного университета.* – №1(22), 2010. – с. 57-59.

9 Супрун И. И. Цитолого-генетическое изучение особенностей опыления иммунных и высокоустойчивых к парше сортов яблони // И. И. Супрун, Е. В. Ульяновская, Я. В. Ушакова / *Агро XXI.* – №1-3, 2010. – с. 27-28.

10 Супрун И.И., Ульяновская Е.В. Изучение аллельного полиморфизма гена самонесовместимости и цитологических особенностей опыления сортов яблони // *Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]* 2012. № 13 (01). URL: <http://journal.kubansad.ru/pdf/12/01/02.pdf>.

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

12 Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // *Молекулярная клиническая диагностика.* – М.: Мир, 1999. – С. 395-427.

References

1 Khavkin E.E. Molekulyarnye markery v rastenievodstve / E.E. Khavkin // *Sel'skokhozyajstvennaya biologiya.* - 1997.- № 5.- S.3-19.

2 Surikov I. M. Nesovmestimost' i ehmbriional'naya steril'nost' rastenij. M.1991. – 220 s.

3 Broothaerts W. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple / W. Broothaerts, G. Janssens, P. Proost et al. // *Plant Mol Biol.* - V. 27. – 1995. — P. 449-511.

4 Janssens G. A. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR / G.A. Janssens, I.J. Goderis, W.F. Broekaert et al. // *Theor. Appl. Genet.* - 1995. – V. 91. – P. 691-698.

5 Broothaerts W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles // *Theor Appl Genet.* - V.106. - 2003. – P. 703–714

6 Hegedûs A. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.) // *International Journal of Horticultural Science.* V. 12. – 2006. – P. 31–36.

7 Супрун И. И. Молекулярно-генетическая идентификация аллелей гена самонесовместимости у сортов яблони отечественной селекции / И. И. Супрун, Е. В. Ульяновская, Я. В. Ушакова, Е. Т. Ильницкая // *Доклады РАСХН.* – 2011. – №5. – С. 15-17.

8 Suprun I. I. Ispol'zovanie metodov DNK-markirovaniya dlya identifikacii allelej gena samonesovmestivosti yabloni // I. I. Suprun, E. V. Ul'yanovskaya, YA. V. Ushakova / Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo universiteta. – №1(22), 2010. – s. 57-59.

9 Suprun I. I. Citologo-geneticheskoe izuchenie osobennostej opyleniya immunnykh i vysokoustojchivykh k parshe sortov yabloni // I. I. Suprun, E. V. Ul'yanovskaya, YA. V. Ushakova / Agro KHKHI. – №1-3, 2010. – s. 27-28.

10 Suprun I.I., Ul'yanovskaya E.V. Izuchenie allel'nogo polimorfizma gena samonesovmestivosti i citologicheskikh osobennostej opyleniya sortov yabloni // Plodovodstvo i vinogradarstvo YUga Rossii [EHlektronnyj resurs] 2012. № 13 (01). URL: <http://journal.kubansad.ru/pdf/12/01/02.pdf>.

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

12 Shibata, D.K. Polimeraznaya cepnaya reakciya i molekulyarno-geneticheskij analiz bioptatov // Molekulyarnaya klinicheskaya diagnostika. – M.: Mir, 1999. – S. 395-427.