

УДК 634.11:577.21

UDC 634.11:577.21

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
АСПЕКТЫ САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ  
ЯБЛОНИ**

**MOLECULAR-GENETICS BASE OF APPLE  
SELF-INCOMPATIBILITY**

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

Suprun Ivan Ivanovich  
Cand.Biol.Sci., head of sector

Степанов Илья Владимирович  
аспирант

Stepanov Ilya Vladimirovich  
postgraduate student

Токмаков Сергей Вячеславович  
к.б.н., м.н.с.  
*Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39, [supruni@mail.ru](mailto:supruni@mail.ru)*

Tokmakov Sergey Vyacheslavovuch  
Cand.Biol.Sci., junior researcher  
*North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, 40 let Pobedy, 39, Krasnodar, Russia*

В результате проведенной работы с использованием методов молекулярного ДНК-маркирования была выполнена идентификация аллелей гена самонесовместимости (S-ген) в сортах яблони Российской селекции. Установлен аллельный набор S-гена для ряда сортов. Выявлены наиболее часто встречающиеся аллели данного гена. Данные о частоте встречаемости аллелей, полученные в ходе работы согласуются с данными о распространении аллелей S-гена в мировой генплазме яблони

Estimation of self-incompatibility allelic diversity in Russian apple varieties was conducted. We have established S-allele gene set for a number of varieties. The most common allele of gene was identified. Alleles frequency data obtained are consistent with those in the world apple germplasm

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, ГЕН САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ, ДНК - МАРКЕРНЫЙ АНАЛИЗ, АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ

Keywords: APPLE, SELF-INCOMPATIBILITY GENE, DNA-MARKERS, ALLELIC POLYMORPHISM

Все цветковые растения с совершенными цветками можно разделить на две группы: самосовместимые – это растения-самоопылители и некоторые перекрестно опыляемые растения и самонесовместимые, перекрестно опыляемые растения.

Несовместимые комбинации опыления цветковых растений не ведут к оплодотворению, несмотря на нормальное развитие генеративных органов растения. В этом случае стерильность является результатом существования генетически запрограммированных препятствий к осуществлению самооплодотворения, невыгодного с эволюционной точки зрения в связи с возникновением инбредной депрессии и ликвидацией возможности рекомбинирования наследственного материала.

Самонесовместимость у цветковых растений обеспечивает популяции возможность свободного перекомбинирования наследственного материала, лежащего в основе эволюционной пластичности видов и гибридной мощности организмов [1].

Первое упоминание в литературе о самонесовместимости можно найти в трудах немецкого ботаника И. Кельрейтера, опубликовавшего в 1765 году сообщение о самонесовместимости у коровяка (*Verbascum theophrasti*). Распространение самонесовместимости в мире растений и ее роль в регуляции перекрестного размножения в растительных популяциях были осознаны в нашем веке после переоткрытия законов Г. Менделя и рождения новой биологической дисциплины – генетики [2, 3].

Исследование самонесовместимости является одной из важных фундаментальных научных проблем в генетике как плодовых, так и других культурных растений с перекрестным типом опыления, является, которая предотвращает самоопыление у перекрестноопыляемых видов и позволяет сохранять внутривидовое генетическое разнообразие.

Данное явление представляет собой один из наиболее ярких примеров межклеточного взаимодействия и, может служить удобной моделью для анализа экспрессии генов. Информация об аллельном составе гена самонесовместимости (*S*-ген) может быть использована при оценке филогенетических дистанций между исследуемыми образцами в связи с высокой степенью полиморфизма локуса гена самонесовместимости. Кроме того, знание аллельного состава *S*-гена может позволить прогнозировать эффективность перекрестного опыления сортов и форм с различными комбинациями аллелей гена, что немаловажно в случае разработки сортовых схем садовых насаждений у плодовых культур, в том числе и яблони.

В популяциях самонесовместимых, перекрестноопыляемых растений *S*-ген 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 (RNase), локализованные в тканях пестика цветка, а также, белковые компоненты пыльцевых зерен, с неустановленной на настоящий день функцией. Ингибирование роста пыльцевых трубок обусловлено специфичным взаимодействием рибонуклеаз с компонентами прорастающих в трубки пыльцевых зерен.

Число аллелей гена может быть достаточно велико. Так, у *Brassica oleraceae* L. и *Oenothera organensis* найдено порядка 50 аллелей, у *Trifolium pratense* около 200 [4, 5]. Совершенно очевидно, что чем больше аллелей гена *S* в популяции растений, тем больше в ней интерфертильных особей. Следует отметить, что известны системы самонесовместимости, включающие не один, а два и более генов. Так, например, А. Лундквист обнаружил у ржи (*Secale cereale* L.) существование двух мультиаллельных локусов самонесовместимости – *S* и *Z* [6]. У *Beta vulgaris* выявлен тетрагенный механизм действия системы самонесовместимости, у *Borago officinalis* и *Ranunculus acris* обнаружено три локуса самонесовместимости [5].

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.

Для семейства *Rosaceae* общепринята гаметофитная моногенная мультиаллельная модель признака [7]. Следует отметить, что для плодовых культур оценка несовместимости по завязываемости плодов крайне сложна и ненадежна, так как их число на один – два порядка ниже числа цветков и сильно варьирует в зависимости от внешних условий. Внешние факторы среды оказывают значительное влияние на рост и развитие плодовых растений. Невозможно выполнить настоящие анализирующие скрещивания, так как это требует получения специальных линий, в том числе самоопылённых [8-10].

Яблоня, принадлежит к растениям с моногенным гаметофитным контролем реакции самонесовместимости. Первоисточник таких сведений – работа Kobel (1938), где система самонесовместимости вида была охарактеризована как моногенная гаметофитная. В этой работе для проверки гипотезы применялась оценка процента завязавшихся плодов от числа опылённых [5]. Для видов с крупными плодами такая методика является недостаточно информативной и совершенной и весьма трудоемкой. Развитие методов молекулярной биологии позволило идентифицировать ряд мРНК, синтезируемых с различных аллелей *S*-гена яблони, что позволило более точно идентифицировать комбинации аллелей в генотипах яблони [7]. Полученные данные позволили разработать ДНК-маркеры различных типов для идентификации аллелей гена и выявить порядка 20 аллелей гена самонесовместимости в пределах вида *Malus domestica* [11, 12].

Использование ДНК-маркеров определило возможность идентифицирования аллелей гена среди образцов коллекций генетических ресурсов яблони в различных странах, где возделывается данная культура. Преимущество при использовании ДНК-маркирования в идентификации генотипа совместимости сортов яблони определяется прежде всего снижением затрат на полевые испытания, зачастую

требующие проведения нескольких повторностей и лабораторные анализы, необходимые для скрининга фенотипических проявлений данного признака. Стоит сказать, что идентифицировать аллельный набор гена самонесовместимости у селекционных форм яблони с применением ДНК-маркерного анализа возможно еще до вступления их в фазу цветения – это одно из преимуществ ДНК-маркерного анализа [13]. В мировой научной практике существует немало примеров успешного выполнения научно-исследовательских работ в данном направлении. Так, к примеру, в работе коллектива шведских ученых были установлены комбинации аллелей гена самонесовместимости у 70 сортов яблони Шведской селекции. Эти данные в комплексе с данными генотипирования сортов с использованием микросателлитных ДНК-маркеров были использованы для составления генетических паспортов сортов, а также выявления степени их генетического родства [14]. Схожие исследования были выполнены и в ряде других крупных мировых научных центров, занимающихся генетическими исследованиями плодовых культур. W. Broothaerst с соавторами (2004) изучил аллельное разнообразие *S*-гена среди образцов Европейской коллекции генетических ресурсов яблони. В исследования были включены также и сорта из Северной Америки и Азии. В ходе работы были определены комбинации аллелей гена в сортах и частота встречаемости тех или иных аллелей [12].

Одно из последних молекулярно-генетических исследований локуса *S*-гена выявило, что данный локус представляет собой кластер генов, состоящий из гена, кодирующего рибонуклеазы в тканях пестика и генов, детерминирующих синтез аллельспецифичных белков пыльцевой трубки (F-box proteins). Наиболее вероятным считается, что данные белки растущей пыльцевой трубки специфично взаимодействуют с рибонуклеазами тканей пестика и, таким образом, определяют совместимость при опылении [15].

Проблема идентификации *S*-аллелей является актуальной в генетических исследованиях, как для яблони, так и в целом для многих видов культурных растений с перекрестным типом опыления.

### **Материал и методы исследований**

Объектами исследования послужили сорта и формы яблони разной ploидности. ДНК экстрагировали методом ЦТАБ [16]. Для идентификации аллелей гена самонесовместимости использовали метод полимеразной цепной реакции ПЦР с праймерами, фланкирующими маркерные участки целевых аллелей [7]. Постановку ПЦР осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками [17]. Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле при напряжении 150 V в течение 30 минут. Гелевые пластины окрашивали бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолете.

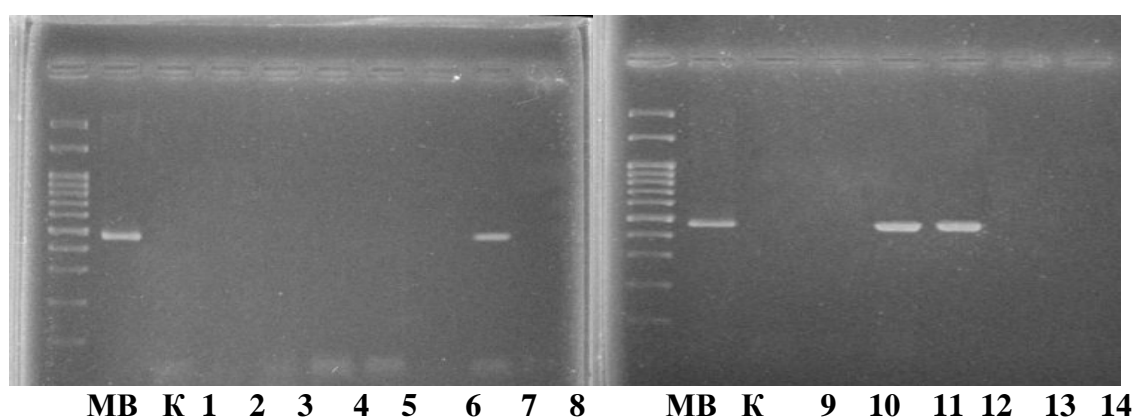
### **Результаты**

В исследованиях российской генплазмы яблони на предмет идентификации аллельного разнообразия гена самонесовместимости за последние годы также были достигнуты значительные успехи [18, 19].

В СКЗНИИСиВ, с использованием ДНК-маркерного анализа в настоящее время продолжается выполнение широкомасштабного исследования по оценке аллельного разнообразия данного гена у отечественных сортов и определению комбинаций аллелей у сортов с разной степенью совместимости при опылении. Наряду с идентификацией аллелей гена самонесовместимости, выполнено цитологическое изучение совместимости сортов при опылении для сопоставления полученных данных с данными о комбинации аллелей *S*-гена и определения перспективности прогнозирования эффективности опыления на основании данных об аллельных комбинациях данного гена у сортов [20].

На рисунке представлен пример электрофоретического разделения продуктов полимеразной цепной реакции с праймерами, фланкирующими маркерный участок аллели *S2* гена самонесовместимости.

Из рисунка видно, что у образцов 7, 11, 12 присутствует ПЦР – фрагмент одного размера с сортом стандартом Голден Делишес. Это свидетельствует о наличии у них данной аллели.



Примечания: МВ-маркер молекулярного веса ДНК («шаг» маркера 100 п.о.); К – положительный контроль (сорт Голден Делишес - стандарт «+» по аллелям *S2*; *S3*). 1-15 сорта яблони: 1-Курнаковское, 2-Орловское Полесье, 3-Старт, 4-Имрус, 5-Юбиляр, 6-Свежесть, 7-Строевское, 8-Первинка, 9-Славянин, 10-Орловский Пионер, 11-Болотовское, 12-Кэтни, 13-Виктория, 14-Долгоу.

### Рисунок – ДНК-идентификация аллели *S2*

По результатам молекулярно-генетического анализа идентифицированы целевые аллели гена самонесовместимости у следующих отечественных сортов и элитных форм яблони:

аллель *S2* – сорта: Персиковое, Союз, Талида, Строевское, Болотовское;; элитные формы: 12/3-20-16, 12/2-21-33, 12/2-20-9, 12/3-21-31, 12/3-21-28, 12/3-20-17, 12/1-21-16, 12/2-21-2, 12/3-20-31; данная аллель была также идентифицирована у крэб формы Кэтни;

аллель *S3* – сорта: Имрус, Свежесть, Строевское, Болотовское, Кубанское багряное; элитные формы: 12/3-21-6, 12/3-21-28;

аллель *S5* – сорта: Старт, Юбиляр, Орфей, Аленушкино;

аллель *S7* – сорта: Орловское Полесье, Старт;

аллель *S9* – сорта: Орловское Полесье, Кубанское багряное; элитная форма 12/2-20-38;

аллель *S10* – сорта: Имрус, Юбиляр, Славянин, Корей; элитные формы: 12/2-20-50, 12/2-20-38, 12/2-21-33, 12/3-21-20, 12/2-21-10, 12/3-21-28, 12/3-20-6, 12/2-20-35, 12/3/21-6, 12/2-20-27;

аллель *S19* – сорта: Корей, Юбиляр; элитные формы: 12/3-20-16, 12/2-20-27, 12/3-20-6, 12/3-20-17, 12/2-21-2.

Как видно из представленных результатов, наиболее распространенными аллелями гена самонесовместимости являются аллели *S2*, *S3*, *S10*. Этот факт согласуется с литературными данными о частоте встречаемости этих аллелей у сортов яблони зарубежной селекции – они являются одними из наиболее распространенных в мировой генетической плазме яблони.

Кроме того, в генеалогии многих отечественных современных сортов и селекционных форм яблони присутствуют сорта Прима, Редфри, Голден Делишес. В связи с этим, аллели *S2*, *S3*, *S10*, представленные у данных сортов, широко распространены в современной отечественной генплазме яблони.

Анализ происхождения и генеалогических связей изученных сортов и элитных селекционных форм, показал, что информация о наличии тех или иных аллелей подтверждается аллельным составом *S*-гена у их родительских сортов.

Данный факт свидетельствует о достоверности данных об аллельном составе *S*-гена у сортов, полученных с помощью молекулярно-генетических методов.

Результаты, полученные в ходе исследования отечественных сортов яблони позволяют дополнить информацию об аллельном полиморфизме *S*-гена в пределах вида *Malus domestica*. Информация о комбинациях аллелей



в сортах яблони отечественной селекции, послужит основой для прогнозирования эффективности опыления и, соответственно для подбора эффективных сортов-опылителей.

Помимо этого, информация об аллельном составе *S*-гена будет, в дальнейшем использована для идентификации генотипов, составления генетических паспортов сортов яблони в комплексе с другими типами ДНК-маркерных систем, используемых для оценки генетического разнообразия.

### Литература

- 1 Суриков, И. М. Несовместимость и эмбриональная стерильность растений. – М., 1991. – 220 с.
- 2 Малецкий, С. И. О происхождении гаметофитных генов у самонесовместимых видов растений // Генетика. – 1969. – Т. 5., №1. – С. 159-167.
- 3 Малецкий, С. И. Гены самонесовместимости контролируют у цветковых растений перекрёстное оплодотворение // Соровский образовательный журнал. – 1996. – №12. – С. 19.
- 4 Вишнякова, М. А. Структурно-функциональные основы самонесовместимости у цветковых растений // Бот. журн. – Т.74, №2. – С. 137-152.
- 5 Вишнякова, М. А. Структурные основы действия генов самонесовместимости у цветковых растений // Генетика. – 1994. – №10. – С. 1381-1389.
- 6 Lundqvist, A. The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. I. The hypothesis of a duplicative origin // Hereditas. – 1962. – V.48, №1-2. – P. 153-168.
- 7 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. – 1995. – Vol. 27. – P. 449-511.
- 8 Калмыков, В. П. Биологические особенности триплоидов яблони // Тр. по прикл. бот., генет. и селекции; – 1982. – Т. 74, Вып.1. – С. 91-97.
- 9 Кочеткова, В. А. Значение факторов внешней среды в жизни плодовых и ягодных растений // Плодоводство. – М., 1982. – С. 58-64.
- 10 Куренной, Н. М. Плодоводство / Н. М. Куренной, В. Ф. Колтунов, В. И. Черепяхин. – М., 1985. – 399 с.
- 11 Broothaerts, W. Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing / W. Broothaerts, J. Keulemans, I. V. Nerum // Plant Cell Rep. – 2004. – V.22. – P. 497-501.
- 12 Broothaerts, W. New finding in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles // Theoretical and applied Genetics. – 2004. – V.106. – P. 703-714.
- 13 Хавкин, Э. Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. – 1997. – №5. – С. 3-19.
- 14 Garkava-Gustavsson, L. Molecular characterization of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis / L. Garkava-Gustavsson, A. Kolodinska-Brantestam, J. Sehic [et al.] // Hereditas. – 2008. – V.145, №3. – P. 99-112.

- 15 Sassa, H. S locus F-box brothers: multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear / H. Sassa, H. Kakui, M. Miyamoto [et al.] // *Genetics*. – 2007. – V.175. – P. 1869-1881.
- 16 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.
- 17 Шибата, Д. К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов / Молекулярная клиническая диагностика. – М. : Мир, 1999. – С. 395-427.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.