

УДК 634.11:577.21

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ S2, S3, S5, S6 ГЕНА САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ У СОРТОВ ЧЕРЕШНИ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ СКЗНИИСиб<sup>1</sup>

Супрун И. И. к.б.н., Токмаков С. В. к.б.н., Степанов И. В. аспирант

*Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии (Краснодар)*

**Реферат.** С применением ДНК-маркерного анализа выполнена идентификация аллелей S2, S3, S5 и S6 гена самонесовместимости у ряда сортов черешни из коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиб.

**Ключевые слова:** черешня, S-ген, самонесовместимость, ДНК - маркерный анализ

**Summary:** Identification of alleles S2, S3, S5 and S6 was carried out for the set of sweet cherry cultivars

**Keywords:** sweet cherry, S-gene, self-incompatibility, DNA-markers

**Введение.** В современной генетике плодовых культур значительное внимание уделяется изучению проблеме самонесовместимости, явлению, определяющему возможность протекания перекрестного опыления.

Для вида *Prunus avium*, характерна монолокусная гаметофитная система самонесовместимости, обусловленная действием мультиаллельного S-гена, локализованного в хромосоме 6. Известно два продукта экспрессии S-гена, которые контролируют самофертильности. Механизм процесса самонесовместимости обусловлен взаимодействием этих продуктов гена, каковыми являются ферменты рибонуклеазы (RNase), расположенные в тканях пестика цветка, и белковые компоненты пыльцевых зерен. Ингибирование роста пыльцевых трубок обусловлено специфичным взаимодействием рибонуклеаз с компонентами прорастающих в трубки пыльцевых зерен.

Развитие молекулярно-биологических методов позволило разработать на основании данных о структуре мРНК, синтезируемых с различных аллелей S-гена черешни, специфичные праймеры для ряда наиболее распространенных аллелей.

Применение новых молекулярно-генетических маркеров для анализа послужило толчком к проведению широкомасштабных исследований генплазмы во многих регионах мира. Так, к примеру, одно из наиболее крупных исследований в данном направлении было проведено на 70 сортах черешни из североамериканских коллекций, в том числе и на сортах, входящих в канадские селекционные программы. В ходе проделанной работы была определена частота встречаемости отдельных аллелей и выделены основные самонесовместимые группы [1]. При изучении генплазмы черешни в Хорватии, по результатам анализа 37 сортов и элитных селекционных форм был установлен аллельный набор для всех изученных образцов и выявлено, что наибольшей частотой встречаемости обладают аллели S2, S3, S5, S6, S9, S12 с максимальным уровнем встречаемости у аллелей S3 и S12 [2].

Исследования, направленные на идентификацию аллельного разнообразия, являются актуальными в связи с тем, что информация о комбинациях аллелей в сортах черешни

---

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект №13-04-96597 p\_юг\_a.

может являться основой для прогнозирования эффективности опыления и, соответственно для подбора эффективных сортов-опылителей. Кроме того, данные об аллельном составе S-гена могут быть использованы для идентификации генотипов, составления генетических паспортов сортов черешни в комплексе с другими типами ДНК-маркерных систем, используемых для оценки генетического разнообразия в связи с высоким уровнем аллельного полиморфизма локуса данного гена.

В связи с этим, нами начато исследование, основной целью которого является идентификация аллельного разнообразия локуса самонесовместимости в отечественном генофонде данной культуры и определение аллельных комбинаций данного гена у исследуемых сортов. На первом этапе исследований нами были апробированы ДНК-маркеры к аллелям S2, S3, S5 и S6 и идентифицировано их присутствие/отсутствие у 12 генотипов черешни, представленных в коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиВ.

**Объекты и методы исследований** Материалом для исследований послужили сорта черешни из коллекции СКЗНИИСиВ отечественной и зарубежной селекции.

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода ЦТАБ [3]. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: 1,5 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл ПЦР-буфера, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей программе: 2 минуты при 94° С; следующие 30 циклов: 45 сек. при 94° С, 35 сек. при 60° С, 35 сек. синтез при 72° С; финальный цикл синтеза 5 мин. при 72° С.

Праймеры для амплификации целевых фрагментов гена самонесовместимости были взяты в соответствии с данными Sonneveld T., Robbins T. et al. (2003) для аллеля S2 и, для аллелей S3, S5, S6, в соответствии с данными, представленными в работе Sonneveld T., Tobbut K. et al. (2001) [4, 5]. Размер целевых амплифицируемых фрагментов для изучаемых аллелей: S2 – 640 пар нуклеотидов (п. н.), S3 – 960 п.н.; S5 – 300 и S6 – 470 п. н. Для электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов использовали 2% агарозный гель на основе трис-боратного буфера.

**Обсуждение результатов.** В результате исследований было определено наличие целевых аллелей у ряда изученных сортов. Об их присутствии судили по наличию ПЦР-фрагментов с размером, специфичным для каждого аллеля. На рисунке 1 представлен результат электрофоретического разделения продуктов амплификации с праймерными парами, фланкирующими целевые участки у искомым аллелей.

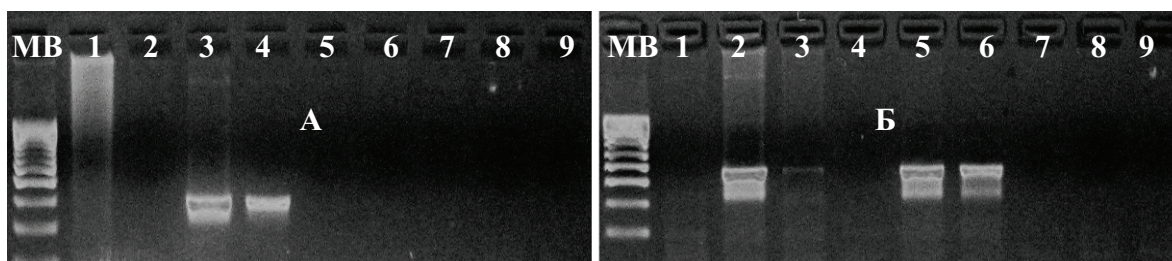


Рисунок 1 — Идентификация аллелей S5(A) и S6(B) у сортов черешни

Примечание: MB – маркер молекулярного веса ДНК («шаг» маркера 100 п.о.); сорта черешни: 1 – Краснодарская ранняя; 2 – Краса Кубани; 3 – Мелитопольская черная; 4 – Мак; 5 – Дар изобилия; 6 – Кавказская; 7 – Деметра; 8 – Францис; 9 – Волшебница.

На представленных электрофореграммах видно, что аллель S5, характеризуемый наличием ПЦР-продукта размером порядка 300 пар оснований, идентифицирован у образцов № 3 и 4 – сорта Мелитопольская черная и Мак, соответственно. Для аллеля S6 (рисунок 1 Б) характерна амплификация фрагмента размером 470 пар нуклеотидов. Из образцов, представленных на электрофореграмме, данный аллель идентифицирован у сортов Краса Кубани, Дар изобилия и Кавказская. Было выявлено наличие «минорного» фрагмента, соответствующего целевому по данному аллелю, у сорта Мелитопольская черная. Для подтверждения/опровержения его наличия у указанного сорта в дальнейшем будет выполнен ПЦР-анализ с консенсусными праймерными парами, также позволяющими получать ПЦР-фрагменты специфичного размера для ряда аллелей данного гена, в том числе и аллеля S6.

По результатам анализа 12 сортов черешни были выявлены все изученные аллели (таблица 1). Частота встречаемости изучаемых аллелей соответствовала частоте их встречаемости в мировом генофонде.

Таблица 1 — Наличие аллелей S-гена у сортов черешни

| Сорта                 | S2 | S3 | S5 | S6  |
|-----------------------|----|----|----|-----|
| Краснодарская ранняя  | +  | -  | -  | -   |
| Краса Кубани          | +  | -  | -  | +   |
| Мелитопольская черная | -  | -  | +  | +/- |
| Мак                   | -  | -  | +  | -   |
| Дар изобилия          | -  | -  | -  | +   |
| Кавказская            | -  | +  | -  | +   |
| Деметра               | -  | +  | -  | -   |
| Францис               | -  | +  | -  | -   |
| Волшебница            | -  | -  | -  | -   |
| Красна девица         | -  | +  | -  | +   |
| Сашенька              | -  | +  | -  | -   |
| Алая                  | -  | -  | +  | -   |

Примечание: «+» – аллель идентифицирован, «-» – отсутствие аллеля, «+/-» – требуется дополнительная проверка

Аллель S3, к примеру, идентифицированный у пяти сортов из 12 изученных является также наиболее распространенным в мировом генофонде черешни. Однако очевидно, что для объективной оценки соответствия частот встречаемости анализируемых аллелей у сортов отечественной селекции и сортов зарубежного генофонда данной культуры необходимо выполнение ДНК-анализа значительно большей выборки генотипов. В настоящее время в СКЗНИИСиВ выполняется данная работа, по результатам которой будут определены комбинации аллелей гена самонесовместимости у сортов черешни отечественной селекции и селекции стран ближнего зарубежья.

При рассмотрении происхождения некоторых из изученных сортов выявляется совпадение данных о наличии ряда аллелей S-гена и генеалогией сортов. Так, к примеру, сорта Мак и Алая несущие аллель S5, в качестве одной из родительских форм имеют сорт Мелитопольская черная, который также обладает данным аллелем. У сорта Сашенька, у которого был идентифицирован аллель S3, одной из родительских форм является сорт Кавказская, также обладающий данным аллелем.

**Заключение.** Результаты ДНК-маркерной идентификации аллелей гена самонесовместимости, подтверждаемые данными о происхождении сортов дают основание сделать заключение об объективности получаемых данных. Идентификация аллельных комбинаций *S*-гена позволит сформировать совместимые группы сортов, что даст возможность более эффективно проводить выбор сортов-опылителей при закладке садовых насаждений данной культуры, а также может быть учтено при формировании родительских пар при гибридизации для получения наибольшего количества гибридного потомства.

#### *Литература*

- 1 Wiersma P.A. Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis / P.A. Wiersma, Z. Wu, L. Zhou [et al.] // *Theor Appl Genet* – 2001. – Vol.102. – P.700-708
- 2 Ercisli S. S-RNase based S-genotyping of Croatian sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes / S. Ercisli, M. Radunicb, J. Gadzeć [et al.] // *Scientia Horticulturae*. – 2012. – Vol.139. – P.21-24
- 3 Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // *Nucleic Acids Research*. – 1980. – Vol.10. – P.4321-4325.
- 4 Sonneveld T. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers / T. Sonneveld, K. R. Tobutt, T. P. Robbins // *Theor Appl Genet*. – 2003. – Vol.107. – P.1059-1070
- 5 Sonneveld T. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection/ T. Sonneveld, T.P. Robbins, R. Bošković [et al.] // *Theor Appl Genet*. – 2001. – Vol.102. – P.1046-1055