

Е.В. Безлепкина, кандидат биологических наук
 А.А. Гуляева, кандидат сельскохозяйственных наук
 А.В. Пикунова, кандидат биологических наук
 E-mail: Bezlepkina@vniispk.ru

УДК 634.23:631.52

DOI: 10.30850/vrsn/2020/4/26-28

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ У СОРТОВ ЧЕРЕШНИ СЕЛЕКЦИИ ВНИИСПК

Самонесовместимость при опылении – это важнейший механизм предотвращения самооплодотворения у покрытосеменных растений, а, следовательно, обеспечения генетического разнообразия популяции. У представителей *Prunus* самонесовместимость контролируется как минимум двумя генами: *S* (self-incompatibility) и *SFB* (*S* haplotype-specific F-box protein). Ген *S* представлен в популяциях серий множественных аллелей. Совместимость сортов черешни определяется аллельным набором гена *S*. При опылении пыльцой несущей аллель гена *S*, присутствующий в геноматере материнского растения, завязывания не происходит. Таким образом, предотвращается как самооплодотворение, так и оплодотворение пыльцой близкородственных, имеющих идентичный аллельный набор гена *S*, растений. Этот механизм может нарушаться в случае мутаций в гене *S* или *SFB*, что приводит к появлению самоплодных сортов, а также при полиплоидизации как, например, у вишни. В рамках изучения генофонда коллекции косточковых культур ВНИИСПК проведен анализ аллельного полиморфизма гена *S* у сортов черешни селекции ВНИИСПК. Для амплификации были использованы как консенсусные (*PaConsI*, *PaConsII*), так и аллельспецифичные (*S1*, *S5*, *S9*, *S10*) праймеры. Установлен аллельный набор гена *S* у сортов Аделина (*S3/S5*), Поэзия (*S3/S5*), Сяна (*S3/S6*), Орловская фея (*S3/S5*) и Троснянская (*S5/S6*). Для сортов Малыш, Подарок Орлу, Орловская розовая и Орловская янтарная аллельный набор был определен частично, так как эти сорта несут уникальные неописанные ранее или очень редкие аллели. Сорт Подарок Орлу несет аллели *S9* и неописанный ранее аллель. Сорта Малыш и Орловская янтарная – аллель *S6* и предположительно аллель *S17* или *S30*, для которых еще не разработаны аллельспецифичные праймеры, сорт Орловская розовая – аллели *S6* и неописанный ранее.

Ключевые слова: черешня, *Prunus avium* L., совместимость при опылении, ген самонесовместимости *S*, консенсусные и аллельспецифичные праймеры.

Е.В. Bezlepkina, PhD in Biological sciences
 А.А. Gulyaeva, PhD in Agricultural science
 А.В. Pikunova, PhD in Biological sciences
 E-mail: Bezlepkina@vniispk.ru

ALLELIC POLYMORPHISM OF THE SELF-INCOMPATIBILITY GENE IN CHERRY VARIETIES IN SELECTION OF ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE FOR FRUIT CROP BREEDING

Self-incompatibility is one of the most important mechanisms used by flowering plants to prevent self-fertilization and, consequently, to provide the genetic diversity of population. The self-incompatibility in *Prunus* is controlled by two genes as minimum: *S* (self-incompatibility) and *SFB* (*S* haplotype-specific F-box protein). *S* gene is represented in the population by a multiple allele series. Compatibility in pollination is dependent on the *S* allele combination of the cultivars. When *S* allele in the pollen is identical with one of the *S* alleles of the mother plant fertilization is arrested. Thus, both self-fertilization and fertilization by pollen of closely related plants (having identical *S* alleles) are prevented. This mechanism may be interrupted in the case of mutations in the *S* or *SFB* gene, which leads to the appearance of self-compatibility cultivars, and polyploidization, such as in sour cherry. The investigation of the *S* gene allele polymorphism of sweet cherry cultivars of VNIISP breeding was performed as a part of the study of the gene collection of stone crops. Both consensus (*PaConsI*, *PaConsII*) and allele-specific (*S1*, *S5*, *S9*, *S10*) primers were used. The *S*-genotype of cultivars Adalina (*S3/S5*), Poesia (*S3/S5*), Siana (*S3/S6*), Orlovskaja feia (*S3/S5*) and Trosnianskaja (*S5/S6*) were established. The *S*-genotype of cultivars Malish, Podarok Orlu, Orlovskaja rozovaia and Orlovskaja yantarnaia was determined partially, as these cultivars have unique previously undescribed or very rare *S* alleles. Podarok Orlu variety has *S9* allele and undescribed one. Malish and Orlovskaja yantarnaia varieties have *S6* allele and *S17* or *S30* alleles supposedly, for these alleles specific primers have not yet been developed. Orlovskaya rozovaia has *S6* allele and undescribed previously one.

Key words: sweet cherry, *Prunus avium* L., pollination compatibility, self-incompatibility gene *S*, consensus and allele-specific primers.

Самонесовместимость – широко распространенный у цветковых растений механизм предотвращения самоопыления. Для черешни, как и для всех представителей *Prunus*, характерен гаметофитный тип самонесовместимости. Совместимость при опылении определяется взаимодействием мультиаллельного гена *S*, кодирующего рибонуклеазу, и гена *SFB*, кодирующего *S* специфичный F-box протеин. [8] Рост пыльцевой трубки и формирование завязи возможны, только если аллель гена *S* в пыльцевой

трубке отличается от аллельного набора гена *S* ткани пестика. Молекулярный механизм самонесовместимости еще изучается. По мнению ряда авторов, существует пока неопределенный ингибитор рибонуклеазы *S*, активность которого блокируется геном *SFB* при распознавании «своей» рибонуклеазы *S*, таким образом предотвращается рост пыльцевой трубки. [3]

Развитие молекулярно-генетических методов определения совместимости черешни при опылении стимулировало активное генотипирование и

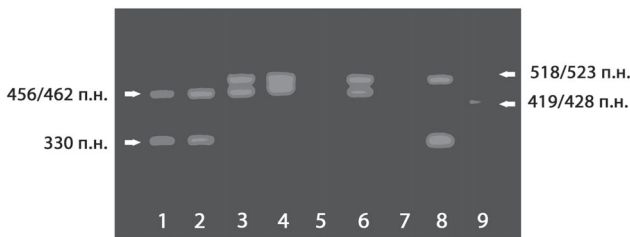


Рис. 1. Электрофоретические профили при амплификации с консенсусными праймерами PaConsI:

1 – Аделина, 2 – Поэзия, 3 – Малыш, 4 – Орловская розовая; 5 – маркер молекулярной массы ДНК MWM-50RL (Диалат); сортообразцы: 6 – Орловская янтарная, 7 – Орловская фея, 8 – Сияна, 9 – Подарок Орлу.

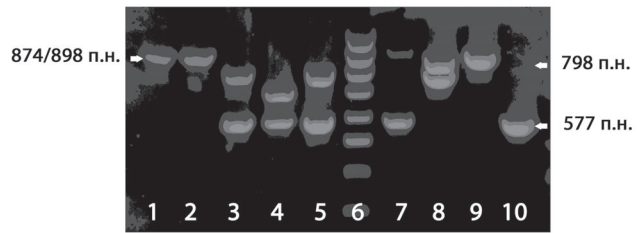


Рис.2. Электрофоретические профили при амплификации с консенсусными праймерами PaConsII:

1 – Аделина, 2 – Поэзия, 3 – Малыш, 4 – Орловская розовая, 5 – Орловская янтарная; 6 – маркер молекулярной массы ДНК MWM-100RL (Диалат); 7 – Сияна, 8 – Подарок Орлу, 9 – Орловская фея, 10 – Троснянская.

группирование сортов черешни по признаку совместимости на основе данных ДНК анализа.

В 2017 году М. Schuster обобщил результаты S генотипирования сортообразцов черешни более чем из 20 стран. [4] Обзор включает данные о 1203 сортообразцах, сгруппированных в 60 групп по признаку совместимости при опылении. Также были выделены группы универсальных доноров (0) с уникальными S аллелями и самоплодных черешен (SC). Данная классификация включает всего несколько сортов российской селекции. Аллельный набор гена S определен для сортов: *Инуль* (S3/S13), *Брянская розовая* (S3/S6), *Анонс* (S5/S9), *Крупноплодная* (S5/S9), *Краса Кубани* (S1/S6), *Кавказская* (S3/S6) и *Василиса* (S3/S9). [1, 4]

Результаты молекулярно-генетического анализа полиморфизма гена S могут быть использованы для прогнозирования успешности опыления, подбора сортов опылителей, а также при планировании гибридизации.

Цель работы – определение аллельного набора гена S у сортов черешни селекции ВНИИСПК. Были использованы консенсусные праймеры PaConsI и PaConsII, позволяющие амплифицировать высоковариабельные зоны интронов 1 и 2, соответственно, а также специфичные праймеры, с помощью которых возможно идентифицировать аллели S1, S5, S9, S10. [5, 6]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – 9 сортов черешни селекции ВНИИСПК: *Аделина*, *Поэзия*, *Малыш*, *Подарок Орлу*, *Орловская розовая*, *Орловская янтарная*, *Орловская фея*, *Троснянская*, *Сияна*.

Выделяли ДНК из листьев согласно протоколу Rogebski S., разработанному для ДНК растительной ткани с высоким содержанием полисахаридов и фенольных соединений. [2] Матрицей для ПЦР служила геномная ДНК в количестве 100 нг. Реакцию амплификации проводили с консенсусными – PaConsI, PaConsII [6] и аллель специфичными – S1, S5, S9, S10 праймерами [5, 6] к гену S. Условия проведения ПЦР соответствовали опубликованным работам. [5, 6]

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2 %-м агарозном геле (1×TBE буфер). В качестве маркера молекулярной массы продуктов ПЦР использовали MWM-50RL и MWM-100RL (Диалат).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления аллельного набора гена S проведена амплификация с консенсусными праймерами PaConsI и PaConsII.

Анализ электрофореграмм ПЦР с праймерами PaConsI позволил определить присутствие аллеля S3 у сортов *Аделина*, *Поэзия*, *Орловская фея* и *Сияна*, так как только в данном случае образуется продукт размером 330 п.н. Однозначных результатов по остальным аллелям получено не было. Однако были идентифицированы продукты ПЦР близкого размера: 456/462 п.н., соответствующие аллелям S1/S5, 518/523 п.н. – S4/S6 и 419...428 п.н. – S2/S7/S9/S12 (рис. 1).

В результате дальнейшего анализа результатов ПЦР с консенсусными праймерами PaConsII установлено присутствие аллеля S6 (577 п.н.) в генотипах сортов *Малыш*, *Орловская розовая*, *Орловская янтарная*, *Троснянская* и *Сияна* (рис. 2).

Проведенного анализа оказалось недостаточно для того, чтобы определить присутствуют ли в геноме части сортов аллели S1 или S5.

Таким образом, на основании результатов ПЦР с праймерами PaConsI и PaConsII установлен аллельный набор гена S только у сортов *Сияна* и *Троснянская* – S3/S6 и S5/S6 соответственно. Для остальных сортов потребовалось подтверждение либо уточнение результатов амплификацией со специфическими праймерами к аллелям S1, S5, S9 и S10.

Аллельспецифичной амплификацией было установлено присутствие аллеля S5 у сортов *Аделина*, *Поэзия*, *Орловская фея* и *Троснянская* (рис. 3), а также аллеля S9 у сорта *Подарок Орлу*. Аллели S1 и S10

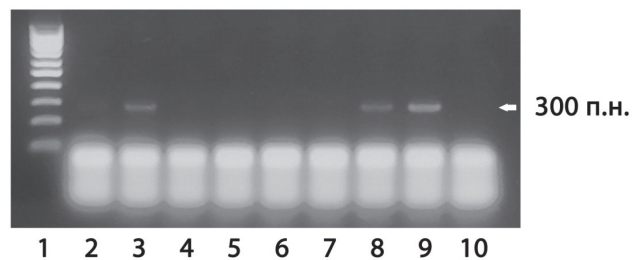


Рис. 3. Электрофоретические профили при амплификации с праймерами специфичными к аллелю S5:

1 – маркер молекулярной массы ДНК MWM-100RL (Диалат); сортообразцы: 2 – Аделина, 3 – Поэзия, 4 – Малыш, 5 – Подарок Орлу, 6 – Орловская розовая, 7 – Орловская янтарная, 8 – Орловская фея, 9 – Троснянская, 10 – Сияна.

Таблица 1.
Результаты идентификации аллелей гена S

Сорт	Аллели	Сорт	Аллели
<i>Аделина</i>	S3/S5	<i>Орловская янтарная</i>	S6/(S17/S30)?
<i>Поэзия</i>	S3/S5	<i>Орловская фея</i>	S3/S5
<i>Малыш</i>	S6/(S17/S30)?	<i>Троснянская</i>	S5/S6
<i>Подарок Орлу</i>	S9/S?	<i>Сияна</i>	S3/S6
<i>Орловская розовая</i>	S6/S?		

по результатам ПЦР анализа у изученных сортов отсутствовали.

Установлен аллельный набор гена S для сортов *Аделина*, *Поэзия*, *Орловская фея*, *Сияна* и *Троснянская* (см. таблицу). У сортов *Малыш* и *Орловская янтарная* на основе размера образующихся продуктов можно предположить наличие аллеля S17 или S30. [8] Оба аллеля встречаются редко. По сводным данным [4] из 1203 проанализированных сортообразцов только два имеют аллель S17 и один – S30. Они отнесены к нулевой группе и считаются универсальными опылителями для других сортов. Специфичные к данным аллелям праймеры не разработаны, поэтому какой именно аллель присутствует, пока точно не установлено. Аллельный набор гена S сортов *Подарок Орлу* и *Орловская розовая* был определен частично. На основе сопоставления электрофоретических профилей можно предположить присутствие в генотипах данных сортов неописанных ранее аллелей гена S. Эта информация требует своего подтверждения секвенированием.

По данным аллельного полиморфизма гена S сорта *Аделина*, *Поэзия*, *Орловская фея* (S3/S5) относятся при опылении к группе совместимости VII, *Троснянская* (S5/S6) – XV, *Сияна* (S3/S6) – VI. [4] Сорта *Малыш*, *Подарок Орлу*, *Орловская розовая* и *Орловская янтарная* согласно классификации относятся к группе универсальных доноров. Необходимо проанализировать встречаемость предположительно редких аллелей среди сортов российской селекции, так как накопленные данные о встречаемости аллелей гена S базируются преимущественно на работах зарубежных ученых.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Супрун, И.И. Использование молекулярно-генетического анализа и фенотипической оценки для определения совместимости сортов черешни при опылении/ И.И. Супрун, Е.М. Алёхина, С.В. Токмаков // Садоводство и виноградарство – 2015 – № 6. – С. 35–39.
2. Porebski, S. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components/ S. Porebski, L.G. Bailey, B.R. Baum// Plant Molecular Biology Reporter – 1997 – 15(1) – P. 8–15.
3. Sassa, H. Molecular mechanism of the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae/ H. Sassa//Breeding science – 2016 – 66 – P. 116–121.
4. Schuster, M. Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview 2017/M. Schuster//

- Julius Kuhn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Fruit. Germany. 2017.
5. Sonneveld, T. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele specific PCR detection / T. Sonneveld, T. Robbins, R. Boskovic, K. Tobutt// Theor Appl Genet. – 2001. – 102 – P. 1046–1055.
6. 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. Tobutt, T. Robbins// Theor Appl Genet. – 2003. – 107 – P. 1059–1070.
7. Vaughan, S.P. Characterization of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.)/ S.P. Vaughan, R.I. Boskovic, A. Gisbert-Climent et al// Tree Genetics & Genomes – 2008. – 4 – P. 531–541.
8. Yamane, H. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*/ H. Yamane, K. Ikeda, K. Ushijima, H. Sassa and R. Tao// Plant Cell Physiology – 2003 – 44 (7) – P. 764–769.

LIST OF SOURCES

1. Супрун, И.И. Ispol'zovanie molekulyarno-geneticheskogo analiza i fenotipicheskoy ocenki dlya opredeleniya sovmestimosti sortov chereszni pri opylenii/ I.I. Suprun, E.M. Alyohina, S.V. Tokmakov // Sadovodstvo i vinogradarstvo – 2015 – № 6. – С. 35–39.
2. Porebski, S. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components/ S. Porebski, L.G. Bailey, B.R. Baum// Plant Molecular Biology Reporter – 1997 – 15 (1) – P. 8–15.
3. Sassa, H. Molecular mechanism of the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae/ H. Sassa//Breeding science – 2016 – 66 – P. 116–121.
4. Schuster, M. Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview 2017/M. Schuster// Julius Kuhn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Fruit. Germany. 2017.
5. Sonneveld, T. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele specific PCR detection / T. Sonneveld, T. Robbins, R. Boskovic, K. Tobutt// Theor Appl Genet. – 2001. – 102 – P. 1046–1055.
6. 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. Tobutt, T. Robbins// Theor Appl Genet. – 2003. – 107 – P. 1059–1070.
7. Vaughan, S.P. Characterization of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.)/ S.P. Vaughan, R.I. Boskovic, A. Gisbert-Climent et al// Tree Genetics & Genomes – 2008. – 4 – P. 531–541.
8. Yamane, H. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*/ H. Yamane, K. Ikeda, K. Ushijima, H. Sassa and R. Tao// Plant Cell Physiology – 2003 – 44 (7) – P. 764–769.