УДК 634.11:634.12:577.21

DOI: 10.30679 / 2219-5335-2018-4-52-1-10

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ ПО АЛЛЕЛЯМ САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ (*S*-ЛОКУС)

Лыжин Александр Сергеевич
канд. с.-х. наук
зав. лабораторией ДНК-опосредованных маркерных биотехнологий

Савельева Наталья Николаевна
д-р биол. наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории генофонда

Селекционно-генетический центр ВНИИГиСПР ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина», Мичуринск, Россия

К настоящему времени у яблони выявлено около 50 *S*-аллелей, однако в большинстве исследований анализируются сорта зарубежной селекции, тогда как для многих дикорастущих видов яблони, а также отечественных сортов сведения об аллельном состоянии *S*-гена недостаточны. В настоящем исследовании представлены результаты ПЦР-анализа дикорастущих форм рода *Malus* Mill., а также ряда культивируемых сортов яблони домашней по отдельным аллелям *S*-локуса. В качестве биологических объектов исследования использованы дикорастущие виды, разновидности рода *Malus* Mill., культивируемые сорта яблони домашней (*Malus domestica* Borkh.). Экстракция геномной ДНК проведена согласно протоколу компании Diversity Arrays Technology P/L с модификациями. Определены относительные частоты встречаемости *S*-аллелей в изучаемой коллекции. Аллельный статус *S*-локуса установлен для видовых форм *M. cerasifera* 29494 (S_3S_{10}), *M. purpureav. pendula*2396 ($S_2S_3S_{10}$),

UDC 634.11:634.12:577.21

DOI: 10.30679 / 2219-5335-2018-4-52-1-10

ANALYSIS OF APPLE GENETIC COLLECTION ON SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES (*S*-LOCUS)

Lyzhin Alexander Sergeyevich
Cand. Agr. Sci.
Head of Laboratory of DNA-mediated Marker Biological Technologies

Savel'eva Natalia Nikolaevna
Dr. Biol. Sci.
Leading Research Associate
of Laboratory of the Gene pool

Breeding-Genetical Center ARRIG&BFP FSBSO «I.V. Michurin FSC», Michurinsk, Russia

To date, about 50 *S*-alleles have been identified in the apple tree, but in most study, the foreign varieties are analyzed, whereas for many wild apple species and domestic varieties, information on the allelic state of the *S* gene is insufficient. The present study presents the results of PCR analysis of wild-type forms of the genus *Malus* Mill., as well as a number of apple cultivars homologous for individual alleles of the *S*-locus. Wild species and varieties of the genus Malus Mill., and cultivated apple cultivars of domestic origin (*Malus domestica* Borkh.) were used as biological objects of the study. The extraction of genomic DNA was carried out according to the minutes of the company Diversity Arrays Technology P/L with modifications. Relative frequencies of occurrence of S-alleles in the studied collection are determined. The allelic status of the S-locus is established for the species forms *M. cerasifera* 29494 (S_3S_{10}), *M. purpureav. pendula* 2396 ($S_2S_3S_{10}$), *M. prunifoliav*. ringo

M. prunifoliav. ringo (S_7S_9),*M. spectabilisv. Rubraplena* (S_3S_{10}); сортов Валюта (S_5S_9), Каскад (S_3S_{10}), Красуля (S_7S_9), Успенское (S_2S_3), Фрегат (S_3S_{10}), Чародейка (S_9S_{10}). Чёткой зависимости между аллельным состоянием *S*-локуса и таксономической принадлежностью генотипа не выявлено. У видов серии *Malus* идентифицированы аллели S_2, S_3, S_5, S_7, S_9, S_{10}; у серий *Baccatae* и *Kirghisores* – аллели S_2, S_3, S_5, S_9, S_{10} (аллель S_7 отсутствует). Анализ аллельного состояния *S*-локуса может использоваться в качестве косвенного маркерного признака уровня плоидности. Так как для организмов с диплоидным набором хромосом характерным является наличие двух *S*-аллелей, то присутствие трёх аллелей у вида *M. Purpurea v. pendula* 2396 (S_2, S_3и S_{10}) косвенным образом свидетельствует о триплоидном геноме.

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ, *S*-ЛОКУС, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

(S_7S_9), *M. spectabilisv. Rubraplena* (S_3S_{10}); and for the varieties of Currency (S_5S_9), Cascade (S_3S_{10}), Krasula (S_7S_9), Uspenskoe (S_2S_3), Frigate (S_3S_{10}), Sorceress (S_9S_{10}). There was no clear correlation between the allele state of the *S*-locus and the taxonomic identity of the genotype. For the *Malus* series are identified S_2, S_3, S_5, S_7, S_9, S_{10} alleles; the *Baccatae* and *Kirghisores* series have S_2, S_3, S_5, S_9, S_{10} alleles (the S_7 allele is absent). Analysis of the allelic state of the *S*-locus can be used as an indirect marker of the level of ploidy. Since the presence of two *S*-alleles is characteristics for organisms with a diploid set of chromosomes, the presence of three alleles in the species *M. Purpurea v. pendula* 2396 (S_2, S_3 and S_{10}) indirectly indicates a triploid genome.

Key words: APPLE-TREE, SELF-INCOMPATIBILITY, *S*-LOCUS, MOLECULAR MARKERS

Введение. Самонесовместимость – генетический механизм, препятствующий инбридингу, способствующий поддержанию высокого уровня гетерозиготности и изменчивости наследственного материала, что позволяет получить более жизнеспособное, приспособленное к условиям произрастания потомство.

Яблоня (род *Malus*) характеризуется гаметофитным типом несовместимости, детерминируемым мультиаллельным *S*-локусом, включающим ген *S* пестика и несколько гомологичных *SFBB* (*S locus F-boxbrothers*) генов пыльцы. Ген *S* пестика кодирует рибонуклеазу (*S*-РНКазу), гены *SFBB* пыльцы – особые белки (F-boxproteins). Специфическое взаимодействие *S*-РНКазы пестика и F-boxproteins пыльцы в случае совпадения аллельных вариантов препятствует самоопылению, блокируя прорастание пыльцы на рыльце пестика [1-3].

К настоящему времени у яблони выявлено около 50 *S*- аллелей [4], однако в большинстве исследований по самонесовместимости яблони анализируются культивируемые сорта зарубежной селекции, тогда как для многих дикорастущих видов яблони, а также отечественных сортов сведения об аллельном состоянии *S*-гена недостаточны или отсутствуют [5].

В настоящем исследовании представлены результаты ПЦР-анализа дикорастущих форм рода *Malus* Mill., а также ряда культивируемых сортов яблони домашней по отдельным аллелям *S*-локуса.

Объекты и методы исследований. В качестве биологических объектов исследования использованы дикорастущие виды, разновидности рода *Malus* Mill., культивируемые сорта яблони домашней (*Malus domestica*-Borkh.).Экстракция геномной ДНК была проведена согласно протоколу компании Diversity Arrays Technology P/L с модификациями.

Для идентификации аллелей самонесовместимости использовали фланкирующие целевые локусы праймерные пары: S_2 – OWB122/123, S_3 – FTS177/226, S_5 – FTS10/11, S_7 – FTS143/144, S_9 – FTS154/155, S_{10} – FTS12/228 [7]. Нуклеотидная последовательность использованных праймеров и размер целевых фрагментов показаны в табл. 1.

Контролем наличия в геноме *S*-аллелей являлись сорта Golden Delicious (S_2S_3), Gala (S_2S_5), Red free (S_3S_7), Fuji (S_9), Prima (S_2S_{10}) [8].

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мMdNTPs, 2,5 мММgCL$_2$, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2,5 мМ 10х Taq-буфера (+$(NH_4)_2SO_4$, -KCL). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Аллель-специфичную амплификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы «BIO-RAD» (США) по следующей программе: 94 ºС – 3 мин; 30 циклов: 94 ºС – 15 сек, 60 ºС (для праймеров FTS177/226 – 56 ºС) – 15 сек, 72 ºС – 30 сек; финальная элонгация: 72 ºС – 2 мин.

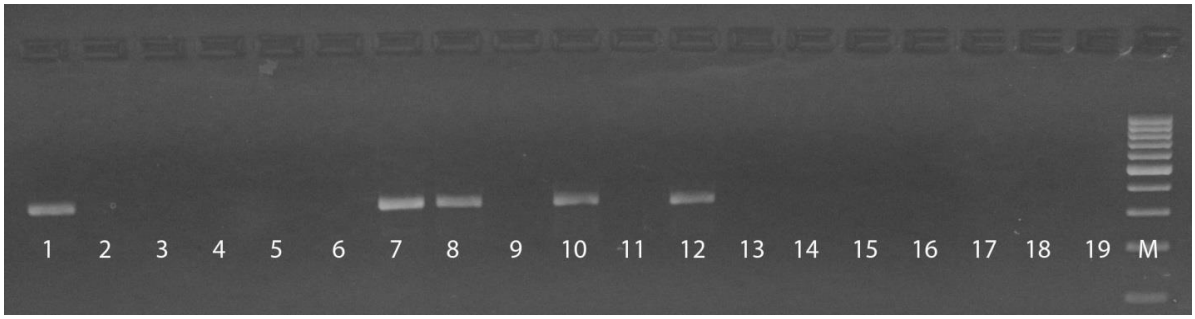
Таблица 1 – Характеристика использованных в работе праймеров

S-локус	Праймер	Нуклеотидная последовательность 5′-3′	Размер целевых фрагментов, п.н.
S$_2$	OWB122	GTTCAAACGTGACTTATGCG	449
	OWB123	GGTTTGGTTCCTTACCATGG	
S$_3$	FTS177	CAAACGATAACAAATCTTAC	500
	FTS226	TATATGGAAATCACCATTCG	
S$_5$	FTS10	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC	346
	FTS11	TAATAATGGATATCATTGGTAGG	
S$_7$	FTS143	ACTCGAATGGACATGACCCAGT	302
	FTS144	TGTCGTTCATTATTGTGGGATGTC	
S$_9$	FTS154	CAGCCGGCTGTCTGCCACTT	343
	FTS155	CGGTTCGATCGAGTACGTTG	
S$_{10}$	FTS12	CCAAACGTACTCAATCGAAG	209
	FTS228	ATGTCGTCCCGTGTCCTGAATC	

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

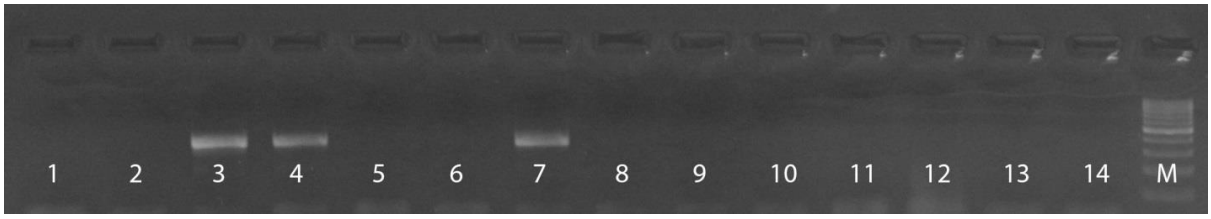
Обсуждение результатов. *S*-локус картирован в дистальной части группы сцепления 17 [9]. Для идентификации аллелей *S*-гена используются фланкирующие целевые локусы праймерные пары. Присутствие на электрофореграмме фрагмента известного размера свидетельствует о наличии у генотипа анализируемого аллеля.

В результате проведённых исследований получены электрофоретические спектры анализируемых генотипов яблони для отдельных аллелей *S*-локуса (рис. 1, 2).



1 – Gala (контроль), 2 – *M. baccata* 2319,3 – *M. spectabilis* 2415,
4 – *M. orientalis* 29484, 5 – *M. pumila v. gallica*, 6 – *M. florentina*,
7 – *M. prunifolia* 2430, 8 – M. caspiriensis 14942,9 – *M. hupehensis*,
10 – *M cerasifera v. adarata*, 11 – *M. niedzwetzkyana* 29429, 12 – *M. ioensis*,
13 – *M. cerasifera* 29494, 14 – *M. baccata* 2324, 15 – *M. coronaria*,
16 – *M. platycarpa*, 17 – *M. transitoria*, 18 – *M. cerasifera v. hiemalis*,
19 – *M. sieboldii*, M – маркер молекулярного веса

Рис. 1. Электрофоретический профиль дикорастущих видов и разновидностей яблони по аллелю S_5 локуса самонесовместимости



1 – Стела, 2 – Былина, 3 – Чародейка, 4 –Красуля, 5 – Стрела,
6 – Памяти Нестерова, 7 –Fuji (контроль), 8 –Жигулёвское, 9 –Гейзер,
10 – Каскад, 11 – Прима, 12 – Благовест, 13 –Антоновка обыкновенная,
14 –Успенское, М – маркер молекулярного веса

Рис. 2. Электрофоретический профиль сортов яблони по аллелю S_9 локуса самонесовместимости

В генетической коллекции видов и разновидностей рода *Malus*Mill. аллель S_2 присутствует у 7,7%, S_3 – у 13,6 %, S_5–у 7,7 %, S_7 – 6,1 %, S_9 – у 10,6 %, S_{10} – 12,1 % генотипов. При этом у 50,0 % изучаемых дикорастущих форм ни одного анализируемого *S*-аллеля не выявлено (табл. 2).

Чёткой зависимости между аллельным состоянием *S*-локуса и таксономической принадлежностью генотипа не выявлено.

У видов серии *Malus* идентифицированы аллели S_2, S_3, S_5, S_7, S_9, S_{10}; серий *Baccatae* и *Kirghisores* – аллели S_2, S_3, S_5, S_9, S_{10} (аллель S_7 отсутствует). В систематических группах с небольшим количеством видов идентифицированы отдельные аллели *S*-локуса.

Таблица 2 – Распространение аллелей гена самонесовместимости (*S*-локус) в геноплазме рода *Malus* Mill.

Виды и разновидности яблони	*S*-аллель
1	2
Секция *Baccato malus* Rehd. (*Gymnomeles*)	
Серия *Baccatae* Rehd.	
M. baccata 2324 L. / Borkh.	S_{10}
M. baccata K 2316	-
M. baccata K 2317	-
M. baccata 2319	S_9
M. baccata 14207	-
M.baccatav.coerulescens 2333	-
M. manshurica K 41277 Maxim./ Komarov	-
M. manshurica K 41947	-
M. pallasiana Juz.	-
M. sachalinensis 85 Juz.	-
M. sachalinensis K 25951	-
M. sachalinensis 9 7	-
M. robusta 43199 Rehd.	S_{10}
M.robustav. persicifolia Rehd.	-
M. cerasiferav. aurantiaca	-
M.cerasifera v. hiemalis	S_2
M. cerasifera 29494 Spach.	S_3S_{10}
M. cerasifera v. adarata	S_5
M. denticulata 29416	-
Серия *Hupehenses* Langenf.	
*M. hupehensis*Pamp. / Rehd.	S_9
Секция *Eumalus* Zabel.	
Серия *Asiaticae* Langenf.	
M. asiatica 2343 Asami.	S_3
Серия *Kirghisores* Langenf.	
M. sieversii 13975 Ledeb. / Roem M.	S_5
M. sieversii K 13280	-
M. sieversii K 29493	-
M.pumila Mill.	-
M. pumila v. gallica	S_2
M. niedzwetzkyana 29429	S_9
M. niedzwetzkyana 13279	S_3
M. niedzwetzkyana K 29422	-
M. purpurea K 2392 Barbier. / Rehd.	-
M. purpurea v. pendula 2396	$S_2S_3S_{10}$
M. purpureav. aldenhamensis	S_3
M. purpureav. eleyi	-
Серия *Orientalis* Langenf.	
M. orientalis 29484 Uglitzk.	S_2
M. orientalis 49478	S_3
M. orientalis K 29476	-

Продолжение таблицы 1

1	2
M. orientalis K 29460	-
M. orientalis K 41623	-
M. turkmenorum 29421 Jut. et M. Pop.	S_9
M. turcmenorum K 13283	-
Серия *Malus* Mill.	
M. sylvestris 73 L. / Mill.	S_3
M. sylvestris 123	S_7
M. silvestris K 41639	-
M. sylvestris ssp. praecox Pall. / Soo.	-
M. caspiriensis 14942 Langenf.	S_5
M. caspiriensis 14943	S_3
M. domestica Borkh. Антоновка обыкновенная	S_2
M. prunifolia 2430 Willd. / Borkh.	S_5
M. prunifolia K 2454	-
*M. prunifolia*Borkh. *v. ringo* Asami	S_7S_9
M. spectabilis 2415 Ait./Borkh.	S_7
M. spectabilis v. rubra plena Siebold.	S_3S_{10}
M. spectabilisv. Albiplena	-
Секция *Sorbomalus* Zabel.	
Серия *Sieboldinae* Rehd.	
M. sieboldii Rgl. / Rehd.	S_9
M. floribunda Siebold.	-
M. sargentii Rehd.	-
*M. zumi*Mats. / Rehd.	-
M. arnoldiana Rehd. / Sarg.	-
M. scheidekerii Spach. / Zabel.	-
M. honanensis Rehd.	S_{10}
Серия *Kansuenses* Rehd.	
M. transitoria Batal. / Schneid.	S_{10}
Секция *Chloromeles* Deone. / Rehd.	
Серия *Coronariae* Rehd.	
M. coronaria L. / Mill.	S_{10}
M. ioensis Wood. / Britt.	S_5
M.soulardii Bailey. / Britt.	-
M. platycarpa Rehd.	S_9
Секция *Eriolobus* Schneid	
M. florentina Zuce. / Schneid.	S_7

Необходимо отметить тот факт, что анализ аллельного состояния *S*-локуса может использоваться в качестве косвенного маркерного признака уровня плоидности. Так как для организмов с диплоидным набором хромосом характерным является наличие двух *S*-аллелей, то присутствие трёх аллелей у вида *M. Purpurea v. pendula* 2396 (S_2, S_3и S_{10}) косвенным образом свидетельствует о триплоидном геноме.

Аллельный статус *S*-локуса среди изучаемых представителей рода *Malus* Mill. выявлен у *M. cerasifera* 29494 (S_3S_{10}), *M. purpureav. Pendula* 2396 ($S_2S_3S_{10}$), *M. prunifoliav. ringo* (S_7S_9) и *M. spectabilisv. Rubraplena* (S_3S_{10}).

В анализируемой коллекции сортов яблони домашней наиболее распространён аллель S_3, присутствующий у 29,2 % проанализированных генотипов. Аллели S_5 и S_9 идентифицированы у 20,8 % сортов, S_{10} – у 16,7 %, S_2 – у 8,3 % форм. Аллель S_7 выявлен у одного генотипа (Красуля). У 25 % проанализированных сортов яблони изучаемые аллели *S*-локуса не выявлены (табл. 3).

Таблица 3 – Аллельное состояние *S*-локуса сортов яблони

Сорт	*S*-аллель
Goldendelicious (контроль)	S_2S_3
Gala (контроль)	S_2S_5
Prima (контроль)	S_2S_{10}
Fuji (контроль)	S_9
Redfree (контроль)	S_2S_7
Стела	S_5
Былина	S_3
Чародейка	S_9S_{10}
Красуля	S_7S_9
Стрела	S_5
Памяти Нестерова	S_5
Академик Казаков	-
Каскад	S_3S_{10}
Благовест	S_{10}
Готика	-
Успенское	S_2S_3
Флагман	-
Вымпел	-
Имант	S_3
Фрегат	S_3S_{10}
Freedom	S_5
Антоновка обыкновенная	S_2
Кандиль орловский	S_9
Валюта	S_5S_9
Московское ожерелье	-
Богатырь	-
Жигулёвское	S_3
Гейзер	S_3
Белорусское сладкое	S_9

Полный аллельный статус *S*-локуса определён для сортов Валюта (S_5S_9), Каскад (S_3S_{10}), Красуля (S_7S_9), Успенское (S_2S_3), Фрегат (S_3S_{10}), Чародейка (S_9S_{10}). Однако, у большинства изучаемых сортов (75,0%) идентифицирован один *S*-аллель из двух или не выявлено ни одного, поэтому для установления аллельного статуса *S*-локуса данных генотипов дополнительно необходимо проведение ПЦР-анализа по другим *S*-аллелям.

Заключение. С использованием ДНК-маркеров проведён анализ генетической коллекции яблони по аллелям *S*-локуса. Род *Malus*Mill. характеризуется как межвидовым, так и внутривидовым полиморфизмом *S*-локуса. Чёткой зависимости между аллельным состоянием *S*-гена и таксономической принадлежностью генотипа не выявлено.

В серии *Baccatae* относительно более распространён аллель S_{10}, серии *Kirghisores* – аллель S_3, серии *Malus* – аллели S_3 и S_7. В систематических группах с небольшим количеством видов (серии *Hupehenses*,*Asiaticae*, *Orientalis*, *Sieboldinae*, *Kansuenses*, *Coronariae* и секция *Eriolobus*) идентифицированы отдельные аллели *S*-локуса.В анализируемой коллекции сортов яблони домашней наиболее распространён аллель S_3.

Литература

1. Minamikawa, M. Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes / M. Minamikawa, H. Kakui, S. Wang, N. Kotoda, S. Kikuchi, T. Koba, H. Sassa // Plant MolBiol, 2010. – V. 74. – P. 143-154.

2. Okada, K. Isolation and characterization of multiple F-box genes linked to the S9- and S10-R Nase in apple (Malus × domestica Borkh.) / K. Okada, S. Moriya, T. Haji, K. Abe // Plant reproduction, 2013. – V. 26(2). - P 101-111.

3. Sassa, H. Molecular mechanism of the *S*-R Nase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae / H. Sassa // Breeding Science, 2016. – V. 66. – P. 116-121.

4. Larsen, B.A high-throughput method for genotyping *S*-RNase alleles in apple / B. Larsen, M. Orgaard, T.B. Toldam-Andersen, C. Pedersen // Mol Breeding, 2016. – V. 36(3). – P. 1-10.

5. Li, T. Determination *S*-genotypes and identification of five novel *S*-R Nase alleles in wild *Malus* species / T. Li, S. Long, M. Li, S. Bai, W. Zhang // Plant Mol. Biol. Rep., 2012. – V. 30. – P. 453-461.

6. DArT, 2014 available at http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DArT_DNA_isolation.pdf

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

8. Hegedus, A. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus*× *domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.) / A. Hegedus // International Journal of Horticultural Science, 2006. – V. 12(2). – P. 31-36.

9. Igarashi, M. Linkage maps of the apple (*Malus*× *domestica* Borkh.) cvs 'Ralls Janet' and 'Delicious' include newly developed EST markers / M. Igarashi, Y. Abe, Y. Hatsuyama, T. Ueda, T. Fukasawa-Akada, T. Kon, T. Kudo, T. Sato, M. Suzuki // Molecular Breeding, 2008. – V. *22*(1). – P. 95-118.

References

1. Minamikawa, M. Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes / M. Minamikawa, H. Kakui, S. Wang, N. Kotoda, S. Kikuchi, T. Koba, H. Sassa // Plant MolBiol, 2010. – V. 74. – P. 143-154.

2. Okada, K. Isolation and characterization of multiple F-box genes linked to the S9-and S10-R Nase in apple (Malus × domestica Borkh.) / K. Okada, S. Moriya, T. Haji, K. Abe // Plant reproduction, 2013. – V. 26(2). - P 101-111.

3. Sassa, H. Molecular mechanism of the S-R Nase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae / H. Sassa // Breeding Science, 2016. – V. 66. – P. 116-121.

4. Larsen, B.A high-throughput method for genotyping S-RNase alleles in apple / B. Larsen, M. Orgaard, T.B. Toldam-Andersen, C. Pedersen // Mol Breeding, 2016. – V. 36(3). – P. 1-10.

5. Li, T. Determination S-genotypes and identification of five novel S-R Nase alleles in wild Malus species / T. Li, S. Long, M. Li, S. Bai, W. Zhang // Plant Mol. Biol. Rep., 2012. – V. 30. – P. 453-461.

6. DArT, 2014 available at http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources /DArT_DNA_isolation.pdf

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

8. Hegedus, A. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus*× *domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.) / A. Hegedus // International Journal of Horticultural Science, 2006. – V. 12(2). – P. 31-36.

9. Igarashi, M. Linkage maps of the apple (Malus× domestica Borkh.) cvs 'Ralls Janet' and 'Delicious' include newly developed EST markers / M. Igarashi, Y. Abe, Y. Hatsuyama, T. Ueda, T. Fukasawa-Akada, T. Kon, T. Kudo, T. Sato, M. Suzuki // Molecular Breeding, 2008. – V. 22(1). – P. 95-118.