

УДК 634.1:631.52

**ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА
САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ
И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ
ОСОБЕННОСТЕЙ ОПЫЛЕНИЯ
СОРТОВ ЯБЛОНИ***

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук

Ульяновская Елена Владимировна
д-р с.-х. наук

Степанов Илья Владимирович

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

Выполнена генетическая идентификация аллелей гена самонесовместимости у ряда сортов яблони. Проведен цитологический анализ опыления сортов яблони. Определены совместимые комбинации сортов.

Ключевые слова: СОРТ, ЯБЛОНЯ,
ГЕН САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ,
ДНК-МАРКИРОВАНИЕ

UDC 634.1:631.52

**STUDYING OF ALLELIC
POLYMORPHISM OF THE
SELF-INCOMPATIBILITY GENE
AND CYTOLOGIC FEATURES
OF POLLINATION OF
APPLE-TREE VARIETIES**

Suprun Ivan
Cand. Biol. Sci.

Ulyanovskaya Elena
Dr. Sci. Agr.

Stepanov Ilya

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute of
Horticulture and Viticulture of the Russian
Academy of Agricultural Sciences,
Krasnodar, Russia*

Genetic identification of allele's gene of self-incompatibility in the apple varieties is executed. Cytological analysis of pollination of apple varieties is conducted. Compatible combinations of varieties are defined.

Keywords: VARIETY, APPLE-TREE,
GENE OF SELF-INCOMPATIBILITY,
DNA-IDENTIFICATION

Введение. Для культуры яблони важное значение имеет явление самонесовместимости, определяющее возможность опыления между разными сортами. Данное явление детерминируется действием гена самонесовместимости (S-гена). На сегодняшний день у яблони идентифицировано порядка 20 аллелей гена самонесовместимости. В результате работ по идентификации аллелей S-гена были разработаны ДНК-маркеры для всех выявленных его аллелей. Их использование позволяет выполнять иденти-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 09-04-96552)

фикацию аллельного состава *S*-гена с применением ДНК-маркерного анализа. Наряду с этим, для целей определения совместимости сортов при опылении, используется цитологический анализ, основанный на анализе интенсивности роста пыльцевых трубок в ткани пестика.

Сопоставление данных цитологического анализа протекания процесса опыления и молекулярно-генетической идентификации аллельных комбинаций у сортов дает возможность оценить перспективность использования данных об аллельном составе *S*-гена у сортов для прогнозирования эффективности опыления. Данная информация может быть использована для ускорения селекционного процесса путем подбора оптимальных комбинаций при гибридизации с целью получения максимального числа гибридных семян, а также для более эффективной разработки сортовых схем садовых насаждений.

Цель исследования – цитологическая оценка эффективности опыления и молекулярно-генетическая идентификация аллелей гена *S* у отечественных сортов и форм яблони, в том числе и устойчивых к парше.

Объекты и методы исследований. Исследования проводили в Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ). Объектами исследования послужили сорта и формы яблони разной ploидности. Для анализа эффективности опыления был использован цитологический анализ, позволяющий охарактеризовать изучаемые формы с точки зрения совместимости при опылении [1-5]. Для идентификации аллелей гена самонесовместимости использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий синтезировать целевые участки генома в условиях *in vitro* [6-7].

Обсуждение результатов. Природные условия южного региона благоприятны для развития плодового хозяйства. Однако, необходимо отметить основные стрессовые абиотические факторы, влияющие на процесс опыления и оплодотворения растений яблони в этом регионе: весенние замо-

розки, резкие колебания температуры, засуха, суховеи, неустойчивый режим естественного увлажнения, неравномерное распределение осадков в течение данного периода.

По полученным нами многолетним данным для яблони оптимальные температурные условия для прорастания пыльцы – 18-25⁰С. При дальнейшем повышении температуры скорость прорастания пыльцы и скорость роста пыльцевых трубок становится ниже. В дальнейшем, при температуре выше 30⁰С, процесс прорастания пыльцевых трубок замедляется в 2-4 раза, при повышении температуры свыше 33⁰С – в 4-5,5 раз.

В ходе исследований выявлено, что рост пыльцевых трубок в высокосовместимых комбинациях яблони при 18-25⁰С продолжается в среднем 24-48 часов. Проросшие пыльцевые трубки имеют прямую форму с редкими плавными изгибами, при встрече с препятствием в виде другой пыльцевой трубки они слегка изгибаются и меняют направление роста.

В условиях повышенной температуры рост пыльцевых трубок сортов яблони имеет ряд особенностей. Момент оплодотворения – важный этап в развитии растений, от этого процесса зависит формирование будущего урожая. Поэтому большой интерес представляет изучение прорастания пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок в тканях пестика. На этот процесс отрицательное влияние оказывает повышенная температура воздуха, повреждающая прорастающую пыльцу и вызывающую стерильность (бесплодие) растений.

Губительно действует на пыльцу в период ее формирования суховеи, включающий в себя действие двух отрицательных факторов – высокую температуру и обезвоживание. На сформировавшуюся пыльцу суховеи значительного влияния не оказывает, однако прорастающие пыльцевые зерна и растущие пыльцевые трубки снова становятся чувствительными к колебаниям температуры. Выявлено, что при повышении температуры в период роста пыльцевых трубок до 30-33⁰С наблюдаются изменения (набухание,

изгибы, закручивания) в характере роста пыльцевых трубок, преждевременный разрыв кончиков трубок, что отражается на их длине, то есть они не успевают достичь своей максимальной длины.

Установлено, что по мере снижения температуры ниже оптимального предела снижается скорость роста пыльцы и пыльцевых трубок различных сортов яблони. Температура в пределах 11-15⁰С также отрицательно влияет на скорость прорастания пыльцевых трубок в тканях пестика, увеличивая время прорастания в 2,5-5 раз.

Длительность периода цветения сортов и форм яблони разной плоидности варьирует по годам. Минимальные сроки цветения яблони отмечены в сухую, жаркую погоду, когда высокие температуры в период цветения провоцировали сокращение сроков цветения, более быстрое прохождение всех фаз развития цветка, что в результате негативно отражалось на процессах опыления и завязывания плодов. В то же время, неблагоприятные погодные условия (низкая температура воздуха, осадки) в период цветения увеличивали оптимальные сроки прохождения фаз развития растений яблони.

Таким образом, в ходе исследований выявлено, что как понижение, так и повышение температуры угнетает рост пыльцы и пыльцевых трубок. Кроме того, повышенная температура в период прорастания пыльцевых трубок вызывает их набухание, закручивание, преждевременный разрыв кончиков трубок, что в дальнейшем ведет к снижению продуктивности плодового растения.

Цитологическое исследование, основной задачей которого являлось определение степени физиологической совместимости при опылении, позволило выявить максимально совместимые и несовместимые комбинации сортов среди изученных 270 комбинаций опыления. В физиологически несовместимых комбинациях наблюдалось подавление роста пыльцевых трубок в тканях пестика, уже в первой 1/3 его длины происходил поворот в

обратном направлении и прекращение роста. В этом случае бесплодие – результат нарушения обмена веществ между тканями столбика и пыльцевой трубкой.

Выявлены комбинации опыления сортов яблони с высокой степенью совместимости: Айдаред × Линда, Айдаред × Престиж, Айдаред × Корей, Айдаред × Прима, Анис кубанский × Голден Делишес тетраплоидный, Анис кубанский × Прима, Алкмене × Престиж, Алкмене × Прима, Василиса × Айдаред, Василиса × Флорина, Василиса × Голден Делишес, Гала × Джонатан, Глостер × Голден Делишес, Глостер × Айдаред, Голден Делишес тетраплоидный × Либерти, Голден Делишес тетраплоидный × Флорина, Грив Руж × Либерти, Джонаголд × Кубань, Золотое летнее × Редфри, Золотое летнее × Прима, Золотое летнее × Красный янтарь, Кубань × Прима, Кубань × Редфри, Кубань × Джонафри, Купава × Любава, Купава × Василиса, Либерти × Прима, Либерти × Редфри, Либерти × Джонафри, Либерти × Алкмене, Линда × Глостер, Прима × Алкмене, Прима × Джонафри, Прима × Либерти, Прима × Талисман и др.

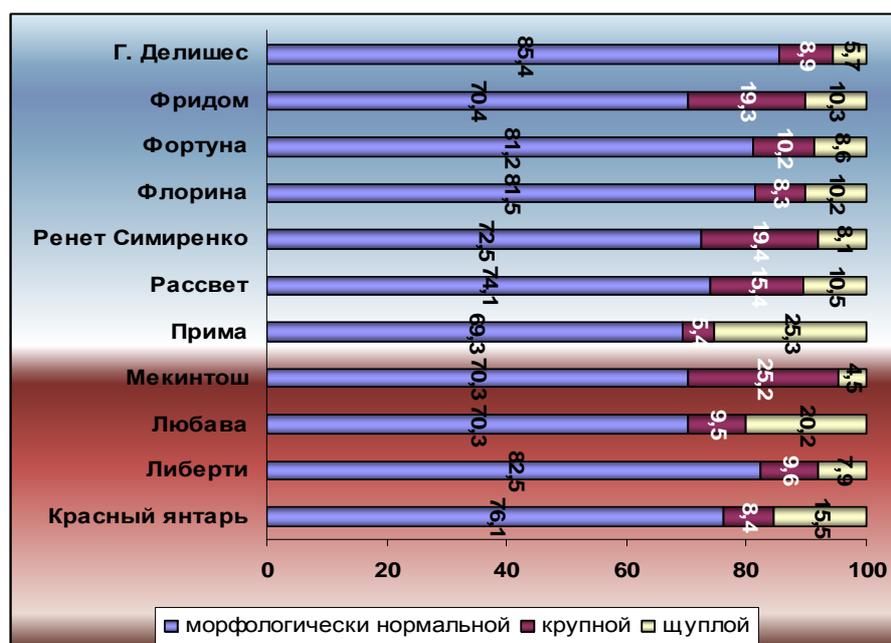


Рис. 1. Соотношение фракций пыльцы диплоидных сортов яблони, %

По данным цитологических исследований выявлены лучшие опылители – сорта яблони: Талисман, Кармен, Любава, Джонафри, Айдаред, Золотое летнее, Голден Делишес, Глостер, Гала, Престиж, Орион, Линда, Фортуна. Высокий процент морфологически нормальной пыльцы (свыше 70%) отмечен нами у сортов: Голден Делишес, Либерти, Флорина, Фридом, Красный янтарь, Фортуна и др. (рис. 1).

Наряду с цитологической оценкой процесса опыления в различных комбинациях сортов, провели молекулярно-генетическую идентификацию аллельного набора данного гена у ряда сортов и элитных селекционных форм яблони.

На рис. 2 приведен пример электрофоретического анализа продуктов ПЦР с ДНК-маркером к данной аллели. У сортов-стандартов идентифицируются ПЦР-фрагменты размером около 340 (S5) и 300 (S7) пар оснований (п.о.), соответственно, что согласуется с литературными данными о размере продуктов ПЦР для данных аллелей.

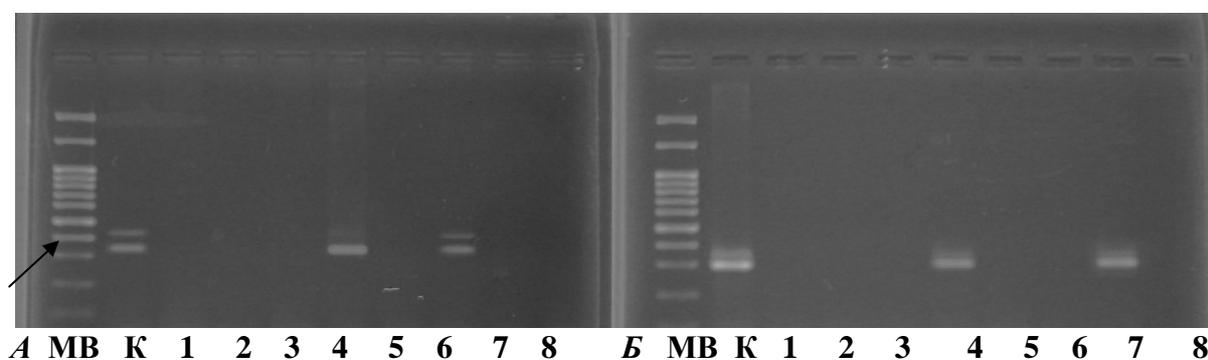


Рис. 2. ДНК-идентификация аллелей S5(A) и S7 (B)

- A:** MB-маркер молекулярного веса ДНК («шаг» маркера 100 п.о.);
 К – положительный контроль (сорт Гала - стандарт «+» по аллели S5).
 1-8 сорта яблони: 1-Строевское; 2-Курнаковское, 3-Орловское Полесье,
 4-Старт, 5-Имрус, 6-Юбиляр, 7-Свежесть; 8-Первинка.
- Б:** MB-маркер молекулярного веса ДНК («шаг» маркера 100 п.о.);
 К – положительный контроль (сорт Айдаред - стандарт «+» по аллели S7).
 1-8 сорта яблони: 1-Кубанское багряное; 2-Болотовское; 3-Орфей;
 4-Старт; 5-Квинти; 6-Зимнее лимонное, 7-Орловское полесье;
 8-Кальвиль снежный.

Наличие у образцов №4, 6 (А) – сорта Старт и Юбиляр, соответственно; № 4, 7 (Б) – сорта Старт и Орловское полесье ПЦР-фрагментов одного размера с сортами – стандартами свидетельствует о наличии у них искомым аллелей.

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

- аллель S2 – сорта: 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;
- 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;
- 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;
- 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.

Следует отметить, что среди сортов с идентифицированным набором аллелей S-гена и входящих в состав совместимых комбинаций опыления нет ни одной комбинации сортов, обладающих одинаковым набором S-аллелей. Комбинации сортов с одинаковым аллельным набором сортов являются несовместимыми. Это говорит о правомерности предположения о возможности прогнозирования эффективности опыления на основании данных об аллельных комбинациях S-гена.

В ходе выполненных исследований сопоставление данных молекулярного и филогенетического анализа позволило предположить наличие определенных аллелей гена S у ряда исходных родительских форм яблони, что является ценной информацией для установления в дальнейшем филогенетических связей.

Анализ генеалогических связей изученных сортов 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.

Заключение. Таким образом, в ходе выполненной работы сопоставление большего объема данных цитологической оценки совместимости при опылении и молекулярно-генетического анализа S-гена позволяет разработать современные подходы, направленные на прогнозирование эффективности опыления яблони на основе данных об аллельном составе гена самонесовместимости.

Литература

1. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений/ З.П. Паушева. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
2. Литвак, А.И. Люминесцентная микроскопия в исследованиях плодовых культур и винограда / А.И. Литвак. – Кишинев: Штиинца, 1978. – 111 с.
3. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1999. – 606 с.
4. Программа селекционных работ по плодовым, ягодным, орехоплодным и цветочно-декоративным культурам Союза селекционеров Северного Кавказа на период до 2010 г. – Краснодар, 2005. – 342 с.
5. Методика опытного дела и методические рекомендации Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства. – Краснодар, 2002. – 215 с.
6. Broothaerts W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles // Theor Appl Genet.– 2003.– V. 106.– P. 703-714.
7. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray and W.F. Thompson // Nucleic Acids Research. – 1980.– V.10.– P. 4321-4325.