

Determinacija *S*-genotipa i *ACSI*-genotipa sejanaca jabuke stvorenih u Institutu za voćarstvo – Čačak

Sladana Marić, Milan Lukić

Institut za voćarstvo, Kralja Petra II/9, 32000 Čačak, Srbija
E-mail: nidzovicladja@yahoo.com

Primljeno: 31. januar, 2013; prihvaćeno: 11. mart, 2013.

Rezime. U radu su predstavljeni rezultati determinacije *S*-genotipa i *ACSI*-genotipa roditeljskih sorti i sejanaca jabuke dobijenih samooprašivanjem sorte Gala Must i potpuno kompatibilnim ukrštanjem sorti Fuji Kiku 8 × Topaz u Institutu za voćarstvo u Čačku. Aleli *S-RNaze* i *ACSI* gena identifikovani su lančanom reakcijom polimeraze. Za roditeljske sorte utvrđeno je da su homozigotne za alel *ACSI*-2 (*ACSI*-2/*ACSI*-2), kao i da su sledećih *S* alelnih konstitucija: Gala Must – S_2S_5 , Fuji Kiku 8 – S_7S_9 i Topaz – S_2S_5 . Analiza sedam sejanaca dobijenih samooprašivanjem sorte Gala Must pokazala je da tri sejanca imaju alelnu konstituciju S_2S_2 , dva S_2S_5 i dva S_5S_5 , kao i da sejaneci homozigotni za S_5 alel ne pripadaju navedenom potomstvu. Od deset sejanaca dobijenih iz ukrštanja Fuji Kiku 8 (S_7S_9) × Topaz (S_2S_5), jedan sejanac ima konstituciju S_7S_2 , tri S_7S_5 , pet S_2S_9 i jedan S_2S_x alelnu konstituciju. Determinacija *ACSI*-genotipa pokazala je da su svi ispitivani sejaneci homozigotni za alel *ACSI*-2, izuzev sejanaca GM×GM-2 i GM×GM-6 za koje je utvrđeno da su heterozigoti (*ACSI*-1/*ACSI*-2).

Ključne reči: *Malus × domestica*, *S-RNaza*, *ACSI*, sejanac

Uvod

Jabuka je samobesplodna vrsta voćaka, čija je auto-inkompatibilnost gametofitnog tipa i pod kontrolom je dva gena *S*-lokusa, od kojih jedan kontroliše komponentu stubića (*S-RNaza*), a drugi komponentu polena (*SFB*). Do sada je kod jabuke identifikovano 39 alela *S-RNaze* (Dreesen et al., 2010), na osnovu kojih se *S*-lokus svrstava u grupu veoma polimorfnih lokusa. Komercijalno značajne sorte jabuke su samobesplod-

ne, stoga je za postizanje visokih prinosa u zasadima neophodno gajenje sorti sa različitim *S* fenotipom. U literaturi postoje podaci o delimičnoj samooplodnosti sorti jabuke Greensleeves, Kent i Fiesta, kao i potvrda da su sorte Early Victoria i Megumi samooplodne, bez razjašnjenog uzroka samooplodnosti (Kato et al., 2002).

Stvaranje novih sorti jabuke visokog kvaliteta ploda i dobrih skladišnih sposobnosti, otpornih na pro-uzrokovane bolesti i to pre svega na *Venturia inaequa-*

alis (Cooke) Wint., danas su osnovni ciljivi oplemenjivanja u Institutu za voćarstvo u Čačku (Marić et al., 2005a; Lukić et al., 2008; Lukić & Marić, 2012). Poslednjih godina pristupi u oplemenjivanju jabuke se menjaju zahvaljujući dostignućima proisteklim iz primene metoda molekularne biologije, stoga su osnovni kriterijumi na osnovu kojih se vrši izbor roditeljskih sorti za plansku hibridizaciju jabuke u Institutu za voćarstvo: *S*-genotip, *ACSI*-genotip (*ACSI* gen kodira ACC sintazu, ključni enzim u sintezi etilena, i predominantno se eksprimira u klimakteričnom plodu jabuke; Marić et al., 2005b), gen za otpornost na *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. i kvalitet ploda.

Cilj rada je bio da se primenom savremenih metoda molekularne biologije testira pedigree nekih sejanaca jabuke stvorenih u Institutu za voćarstvo, koji pripadaju potomstvu dobijenom samooprašivanjem sorte Gala Must i potomstvu dobijenom iz potpuno kompatibilnog ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz. Dalji cilj rada je da se kroz determinaciju *S*-genotipa i *ACSI*-genotipa započnu istraživanja vezana za objašnjenje eventualne samooplodnosti sorte Gala Must, za koju su u višegodišnjem periodu dobijeni plodovi u varijanti samooprašivanja.

Materijal i metode

Biljni materijal i ekstrakcija DNK. U okviru ovih istraživanja analizirane su tri roditeljske sorte (Gala Must,

Fuji Kiku 8 i Topaz), sedam sejanaca dobijenih samooprašivanjem sorte Gala Must (GM×GM-1 do GM×GM-7) i deset sejanaca dobijenih iz potpuno kompatibilnog ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz (F×T-1 do F×T-10). Uzorci lista analiziranih roditeljskih sorti i sejanaca sakupljeni su na objektima Čačak i Preljinsko brdo, Instituta za voćarstvo u Čačku i čuvani na -80 °C do početka ekstrakcije genomske DNK.

Genomska DNK izolovana je primenom CTAB mini prep metode (Doyle & Doyle, 1987), prilagođene za brzu ekstrakciju DNK iz lista jabuke (0,5% β-merkaptoetanol u CTAB puferu). Uzorci genomske DNK su do upotrebe čuvani na -20 °C.

Umnožavanje genomskog fragmenta S-RNaze. Za amplifikaciju fragmenta *S-RNaze* korišćeno je oko 100 ng genomske DNK, 1 × PCR reakcioni pufer, 200 μM deoksiribonukleozidtrifosfata (dNTP, pojedinačno), 0,5 μM prajmera (pojedinačno; Tab. 1), 2,5 mM MgCl₂ i 0,625 U *Taq* DNK polimeraze (Qiagen). Ukupna zapremina reakcione smeše bila je 25 μl. Za lančanu reakciju polimeraze („Polymerase Chain Reaction“ – PCR) korišćen je *TPersonal* Biometra termalni amplifikator. PCR uslovi za umnožavanje genomskog fragmenta *S-RNaze* bili su sledeći: 30 ciklusa – 1 min denaturacija na 94 °C, 1 min sparivanje („annealing“) na 56 °C/60 °C/62 °C/63 °C (u zavisnosti od prajmera) i 1 min polimerizacija na 68 °C, sa finalnom ekstenzijom 15 min na 72 °C (Bošković R., personal communication).

Tab. 1. Nukleotidne sekvence alel-specifičnih prajmera za *S*₁, *S*₂, *S*₅ i *S*₉*, optimalna temperatura sparivanja za PCR reakciju i očekivana veličina PCR-om umnoženog genomskog fragmenta DNK

Nucleotide sequences of the allele-specific primers for S₁, S₂, S₅ and S₉, optimal annealing temperature for PCR and size of genomic amplification product*

Prajmer Primer	S alel i orijentacija <i>S</i> allele and orientation	Sekvenca 5'→3' Sequence 5'→3'	Temperatura sparivanja Annealing temperature (°C)	Očekivana veličina genomskog fragmenta DNK Size of genomic PCR product (bp)
ApS1-F	<i>S</i> ₁ uzvodni/ <i>S</i> ₁ forward	ATA TTG TAA GGC ACC GCC ATA TCA T	63	~ 530
ApS1-R	<i>S</i> ₁ nizvodni/ <i>S</i> ₁ reverse	GGT TCT GTA TTG GGG AAG ACG CAC AA		
ApS2-F	<i>S</i> ₂ uzvodni/ <i>S</i> ₂ forward	GTT CAA ACG TGA CTT ATG CG	56	~ 450
ApS2-R	<i>S</i> ₂ nizvodni/ <i>S</i> ₂ reverse	GGT TTG GTT CCT TAC CAT GG		
ApS5-F	<i>S</i> ₅ uzvodni/ <i>S</i> ₅ forward	CAA ACA TGG CAC CTG TGG GTC TCC	60	~ 350
ApS5-R	<i>S</i> ₅ nizvodni/ <i>S</i> ₅ reverse	TAA TAA TGG ATA TCA TTG GTA GG		
ApS9-F	<i>S</i> ₉ uzvodni/ <i>S</i> ₉ forward	CAG CCG GCT GTC TGC CAC TT	62	~č 340
ApS9-R	<i>S</i> ₉ nizvodni/ <i>S</i> ₉ reverse	CGG TTC GAT CGA GTA CGT TG		

*Nukleotidne sekvence alel-specifičnih prajmera (Broothaerts W., 2003)/*Nucleotide sequences of the allele-specific primers (Broothaerts W., 2003)*

Umnožavanje fragmenta gena ACC sintaze (*ACS1* gena). Za umnožavanje fragmenta *ACS1* gena korišćeno je približno 50 ng genomske DNK u 25 μ l reakcione smeše koja je sadržala: 1 \times PCR reakcioni pufer, 200 μ M dNTP (pojedinačno), 0,2 μ M prajmera [pojedinačno; *ACS1*-5'F (5'AGAGAGATGCCATTTTTTGTTCGTAC3') i *ACS1*-5'R (5'CCTACAAACTTGCGTGGGATTATAAGTGT3'); Sunako et al., 1999] i 2,5 U *Taq* DNK polimeraze (Qiagen). Za PCR umnožavanje korišćen je *TPersonal* Biometra termalni amplifikator. Uslovi umnožavanja fragmenta *ACS1* gena bili su sledeći: 3 min početne denaturacije na 94 °C, nakon čega je usledilo 35 ciklusa: 1 min denaturacija na 94 °C, 1 min sparivanje na 58 °C i 2,5 min polimerizacija na 72 °C, sa finalnom ekstenzijom 10 min na 72 °C.

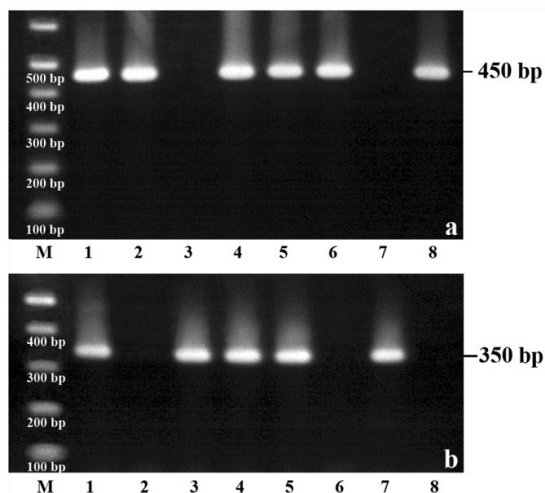
Detekcija fragmenata DNK. Rezultati umnožavanja fragmenata *S-RNaze* i *ACS1* gena analizirani su na 1,5% agaroznom gelu. Nakon završenog umnožavanja u reakcionu smešu je dodato 2 μ l indikator boje (0,25% bromfenol plavo, 40% saharoze) i na agarozni gel naneto po 15 μ l uzorka. Elektroforeza je trajala 3–4 h pri naponu od 70 V cm^{-1} .

Nakon završene elektroforeze gelovi su bojeni u rastvoru etidijum bromida (0,5 μ g ml^{-1}). Razdvojeni fragmenti DNK vizuelizovani su primenom BIO-PRINT-1500/26M (Vilber Lourmat) sistema za fotodokumentaciju. Kao marker molekulske mase korišćen je 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

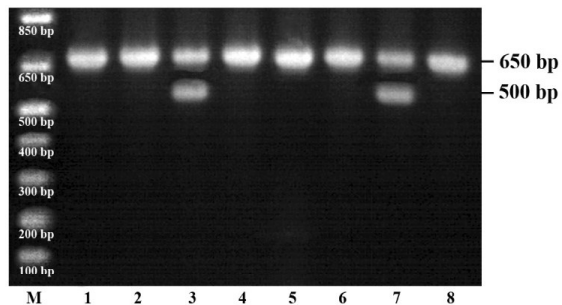
Rezultati i diskusija

Analiza potomstva dobijenog samooprašivanjem sorte Gala Must. Determinacija *S*-genotipa. Umnožavanjem fragmenta *S-RNaze* korišćenjem *S*₂ alel-specifičnih prajmera detektovan je PCR proizvod veličine oko 450 bp. Kod roditeljske sorte i pet sejanaca dobijenih samooprašivanjem sorte Gala Must utvrđen je fragment koji odgovara alelu *S*₂ (Sl. 1a).

Fragment veličine oko 350 bp dobijen je umnožavanjem genomske DNK fragmenta *S-RNaze* prajmerima specifičnim za *S*₅ alel. Roditeljska sorta Gala Must i četiri sejanca su amplifikovali fragment koji odgovara *S*₅ alelu (Sl. 1b).



Sl. 1. PCR proizvodi dobijeni umnožavanjem fragmenta *S-RNaze* sa prajmerima specifičnim za *S*₂ (a) i *S*₅ (b) alele kod roditeljske sorte Gala Must i sedam sejanaca dobijenih u varijanti samooprašivanja: 1 – Gala Must; 2 – GM×GM-1; 3 – GM×GM-2; 4 – GM×GM-3; 5 – GM×GM-4; 6 – GM×GM-5; 7 – GM×GM-6; 8 – GM×GM-7; M – marker molekulske mase 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) PCR products of the *S-RNase* amplified fragment obtained with *S*₂ (a) and *S*₅ (b) allele-specific primers in parental cultivar 'Gala Must' and seven seedlings of selfed progeny: 1 – 'Gala Must'; 2 – GM×GM-1; 3 – GM×GM-2; 4 – GM×GM-3; 5 – GM×GM-4; 6 – GM×GM-5; 7 – GM×GM-6; 8 – GM×GM-7; M – 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)



Sl. 2. PCR proizvodi dobijeni umnožavanjem fragmenta *ACS1* gena, koristeći prajmere *ACS1*-5'F i *ACS1*-5'R, kod roditeljske sorte Gala Must i sedam sejanaca dobijenih u varijanti samooprašivanja: 1 – Gala Must; 2 – GM×GM-1; 3 – GM×GM-2; 4 – GM×GM-3; 5 – GM×GM-4; 6 – GM×GM-5; 7 – GM×GM-6; 8 – GM×GM-7; M – marker molekulske mase 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) DNA fragments obtained by PCR using *ACS1*-5'F and *ACS1*-5'R primers specific for the fragment of *ACS1* gene in parental cultivar 'Gala Must' and seven seedlings of selfed progeny: 1 – 'Gala Must'; 2 – GM×GM-1; 3 – GM×GM-2; 4 – GM×GM-3; 5 – GM×GM-4; 6 – GM×GM-5; 7 – GM×GM-6; 8 – GM×GM-7; M – 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

Na osnovu rezultata umnožavanja sa prajmerima specifičnim za S_2 i S_5 alele kod roditeljske sorte Gala Must (klon sorte Gala) utvrđena je S_2S_5 alelna konstitucija, što je u skladu sa rezultatima koje navode Brothaerts & Van Nerum (2003) za sortu Gala. Od sedam sejanaca dobijenih samooprašivanjem sorte Gala Must, tri imaju alelnu konstituciju S_2S_2 , dva S_2S_5 i dva alelnu konstituciju S_5S_5 . S -genotip ispitivane roditeljske sorte i sejanaca prikazan je u tabeli 2.

Prema podacima iz literature, najčešći uzroci samooplodnosti auto-inkompatibilnih vrsta su: mutacije u S -komponenti stubića – S -RNaza (Bošković et al., 1999; potomstvo segregira na homozigote za jedan alel i heterozigote), mutacije u S -komponenti polena – SFB genu (Ushijima et al, 2004; Vilanova et al., 2006; Beppu et al., 2005; Marchese et al., 2007; potomstvo takođe segregira na homozigote za jedan alel i heterozigote) ili duplikacija nekog od alela – heteroalelni polen (Tsukamoto et al., 2005; potomstvo je isključivo heterozigotno). Polazeći od pretpostavke bazirane na literaturnim podacima, kao i činjenice da su u analiziranom potomstvu utvrđena oba homozigota (S_2S_2 i S_5S_5) i heterozigoti (S_2S_5), dodatno je kod ispitivanih sejanaca određena i alelna konstitucija $ACSI$ gena.

Determinacija ACSI-genotipa. Umnožavanjem fragmenta $ACSI$ gena prajmerima ACS1-5'F i ACS1-5'R detektovana su dva fragmenta veličine približno 500 i 650 bp (Sl. 2). Fragment od 500 bp odgovara alelu $ACSI-1$, dok fragment od 650 bp, u koji je insertovan retrotranspozon SINE, odgovara alelu $ACSI-2$.

U ovom radu je utvrđeno da je sorta Gala Must homozigotna za alel $ACSI-2$, što je u skladu sa rezultatima koje navode Zhu & Barit (2008) za sortu Gala i klon Gala Supreme, kao i rezultatima Costa et al.

(2005) za klon Mondial Gala. Rezultat determinacije $ACSI$ genotipa roditeljske sorte Gala Must ukazuje da se od analiziranog potomstva, odnosno potomstva koje je nastalo u varijanti samooprašivanja, očekuje $ACSI-2/ACSI-2$ alelna konstitucija.

Amplifikovanjem fragmenta $ACSI$ gena utvrđeno je da pet sejanaca ima $ACSI-2/ACSI-2$ alelnu konstituciju i da su dva sejanca heterozigoti ($ACSI-1/ACSI-2$). $ACSI$ -genotip ispitivane sorte i dobijenih sejanaca prikazan je u tabeli 2. Sejanci heterozigotni za $ACSI$ gen su homozigotni za S_5 alel S -RNaze, što je definitivna potvrda kontaminacije. Navedeni rezultati potvrđuju da je potomstvo nastalo samooprašivanjem sorte Gala Must segregiralo u dve grupe S_2S_2 i S_2S_5 , što dalje ukazuje na mutaciju S_2 alela komponente stubića ili komponente polena.

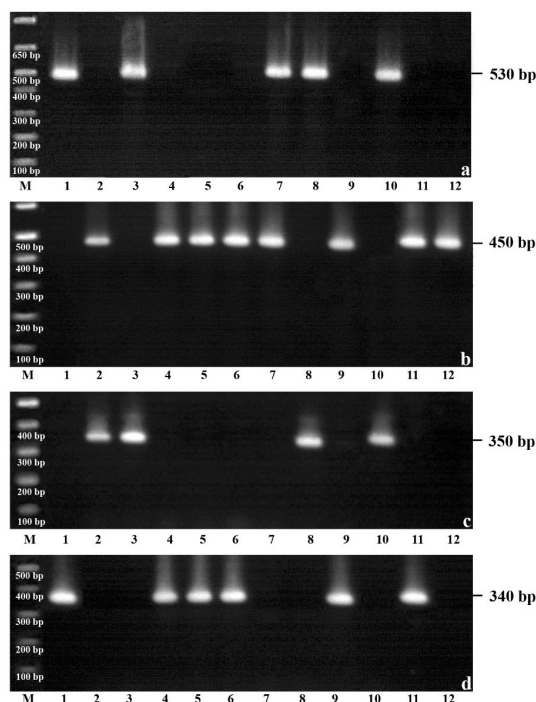
Analiza potomstva dobijenog iz ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz. Determinacija S-genotipa. Amplifikacijom fragmenta S -RNaze prajmerima specifičnim za S_1 alel detektovan je PCR proizvod veličine oko 530 bp. Kod roditeljske sorte Fuji Kiku 8 i četiri sejanca dobijenih iz ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz utvrđen je fragment koji odgovara alelu S_1 (Sl. 3a).

PCR proizvod veličine oko 450 bp dobijen je umnožavanjem genomskog fragmenta S -RNaze prajmerima specifičnim za S_2 alel. Roditeljska sorta Topaz i sedam sejanaca nastalih iz kompatibilnog ukrštanja su amplifikovali fragment koji odgovara S_2 alelu (Sl. 3b).

Prajmeri specifični za S_5 alel korišćeni su za umnožavanje S -RNaze i dobijen je fragment veličine oko 350 bp. Fragment koji odgovara S_5 alelu detektovan je kod sorte Topaz i tri sejanca analiziranog potomstva (Sl. 3c).

Tab. 2. S -genotip i $ACSI$ -genotip roditeljske sorte Gala Must i sejanaca dobijenih u varijanti samooprašivanja *S-genotype and ACSI-genotype of parental cultivar 'Gala Must' and seedlings of selfed progeny*

Sorta/Sejanac Cultivar/Seedling	S_2 alel S_2 allele	S_5 alel S_5 allele	S -genotip S -genotype	$ACSI-1$ alel $ACSI-1$ allele	$ACSI-2$ alel $ACSI-2$ allele	$ACSI$ -genotip $ACSI$ -genotype
Gala Must	+	+	S_2S_5	–	+	$ACSI-2/ACSI-2$
GM×GM-1	+	–	S_2S_2	–	+	$ACSI-2/ACSI-2$
GM×GM-2	–	+	S_5S_5	+	+	$ACSI-1/ACSI-2$
GM×GM-3	+	+	S_2S_5	–	+	$ACSI-2/ACSI-2$
GM×GM-4	+	+	S_2S_5	–	+	$ACSI-2/ACSI-2$
GM×GM-5	+	–	S_2S_2	–	+	$ACSI-2/ACSI-2$
GM×GM-6	–	+	S_5S_5	+	+	$ACSI-1/ACSI-2$
GM×GM-7	+	–	S_2S_2	–	+	$ACSI-2/ACSI-2$



Sl. 3. PCR proizvodi dobijeni umnožavanjem fragmenta *S-RNase* sa prajmerima specifičnim za S_1 (a), S_2 (b), S_5 (c) i S_9 (d) alele kod roditeljskih sorti i deset sejanaca dobijenih iz ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz: 1 – Fuji Kiku 8; 2 – Topaz; 3 – F×T-1; 4 – F×T-2; 5 – F×T-3; 6 – F×T-4; 7 – F×T-5; 8 – F×T-6; 9 – F×T-7; 10 – F×T-8; 11 – F×T-9; 12 – F×T-10; M – marker molekulske mase 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

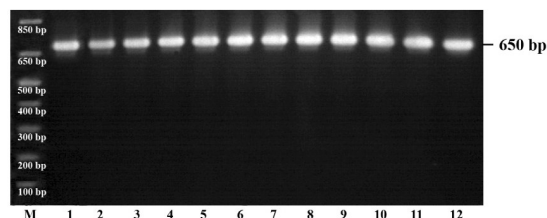
PCR products of the *S-RNase* amplified fragment obtained with S_1 (a), S_2 (b), S_5 (c) and S_9 (d) allele-specific primers in parental cultivars and ten seedlings raised from the fully compatible cross 'Fuji Kiku 8' × 'Topaz': 1 – 'Fuji Kiku 8'; 2 – 'Topaz'; 3 – F×T-1; 4 – F×T-2; 5 – F×T-3; 6 – F×T-4; 7 – F×T-5; 8 – F×T-6; 9 – F×T-7; 10 – F×T-8; 11 – F×T-9; 12 – F×T-10; M – 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

Umnožavanjem genomskog fragmenta *S-RNase* prajmerima specifičnim za S_9 alel detektovan je PCR proizvod veličine oko 340 bp kod roditeljske sorte Fuji Kiku 8 i pet sejanaca nastalih iz navedenog kompatibilnog ukrštanja (Sl. 3d).

Dobijeni rezultati umnožavanja sa prajmerima specifičnim za S_1 , S_2 , S_5 i S_9 alele su potvrdili S_1S_9 genotip sorte Fuji Kiku 8 (klon sorte Fuji) i S_2S_5 genotip sorte Topaz. Naime, rezultati S alelne konstitucije ro-

diteljskih sorti ispitivanih u okviru ovog rada su u skladu sa rezultatima publikovanim od strane Broothaerts & Van Nerum (2003) za sorte Fuji i Topaz. Od deset sejanaca dobijenih iz potpuno kompatibilnog ukrštanja Fuji Kiku 8 (S_1S_9) × Topaz (S_2S_5), utvrđeno je da jedan sejanac ima konstituciju S_1S_2 , tri S_1S_5 , pet S_2S_9 i jedan S_2S_x alelnu konstituciju. S -genotip roditeljskih sorti i sejanaca dobijenih iz potpuno kompatibilnog ukrštanja prikazan je u tabeli 3. Drugi S -alel sejanca F×T-10 nije utvrđen (S_2S_x), a odsustvo amplifikacije sa S_1 i S_9 alel-specifičnim prajmerima ukazuje na kontaminaciju i zahteva dalju analizu sa konsenzus prajmerima.

Determinacija *ACSI*-genotipa. Umnožavanjem fragmenta *ACSI* gena korišćenjem prajmera *ACSI*-5'F i *ACSI*-5'R detektovan je fragment veličine oko 650 bp, koji odgovara alelu *ACSI*-2 (Sl. 4). Determinacija *ACSI*-genotipa je pokazala da su svi sejanaci homozigotni za alel *ACSI*-2, što je i očekivano s obzirom da obe roditeljske sorte imaju *ACSI*-2/*ACSI*-2 alelnu konstituciju. *ACSI*-genotip roditeljskih sorti i sejanaca dobijenih iz potpuno kompatibilnog ukrštanja prikazan je u tabeli 3. Na osnovu dostupnih podataka treba istaći da je *ACSI*-genotip sorte Topaz prvi put određen u ovom radu, dok je *ACSI*-genotip sorte Fuji Kiku 8 u skladu sa rezultatima publikovanim od strane Zhu i Barit (2008) za sortu Fuji.



Sl. 4. PCR proizvodi dobijeni umnožavanjem fragmenta *ACSI* gena, koristeći prajmere *ACSI*-5'F i *ACSI*-5'R, kod roditeljskih sorti i deset sejanaca dobijenih iz ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz: 1 – Fuji Kiku 8; 2 – Topaz; 3 – F×T-1; 4 – F×T-2; 5 – F×T-3; 6 – F×T-4; 7 – F×T-5; 8 – F×T-6; 9 – F×T-7; 10 – F×T-8; 11 – F×T-9; 12 – F×T-10; M – marker molekulske mase 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

DNA fragments obtained by PCR using *ACSI*-5'F and *ACSI*-5'R primers specific for the fragment of *ACSI* gene in parental cultivars and ten seedlings raised from the fully compatible cross 'Fuji Kiku 8' × 'Topaz': 1 – 'Fuji Kiku 8'; 2 – 'Topaz'; 3 – F×T-1; 4 – F×T-2; 5 – F×T-3; 6 – F×T-4; 7 – F×T-5; 8 – F×T-6; 9 – F×T-7; 10 – F×T-8; 11 – F×T-9; 12 – F×T-10; M – 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

Tab. 3. *S*-genotip i *ACSI*-genotip kod roditeljskih sorti i sejanaca dobijenih iz potpuno kompatibilnog ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz
S-genotype and ACSI-genotype of parental cultivars and seedlings raised from the fully compatible cross 'Fuji Kiku 8' × Topaz'

Sorta/Sejanac Cultivar/Seedling	<i>S</i> ₁ alel <i>S</i> ₁ allele	<i>S</i> ₂ alel <i>S</i> ₂ allele	<i>S</i> ₅ alel <i>S</i> ₅ allele	<i>S</i> ₉ alel <i>S</i> ₉ allele	<i>S</i> -genotip <i>S</i> -genotype	<i>ACSI</i> -1 alel <i>ACSI</i> -1 allele	<i>ACSI</i> -2 alel <i>ACSI</i> -2 allele	<i>ACSI</i> -genotip <i>ACSI</i> -genotype
Fuji Kiku 8	+	–	–	+	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₉	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
Topaz	–	+	+	–	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₅	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-1	+	–	+	–	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₅	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-2	–	+	–	+	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₉	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-3	–	+	–	+	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₉	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-4	–	+	–	+	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₉	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-5	+	+	–	–	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₂	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-6	+	–	+	–	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₅	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-7	–	+	–	+	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₉	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-8	+	–	+	–	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₅	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-9	–	+	–	+	<i>S</i> ₂ <i>S</i> ₉	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2
F×T-10	–	+	–	–	<i>S</i> ₂ <i>S</i> _x	–	+	<i>ACSI</i> -2/ <i>ACSI</i> -2

Zaključak

Testiranjem pedigrea sejanaca jabuke dobijenih samooprašivanjem sorte Gala Must (Gala Must × Gala Must) i potpuno kompatibilnim ukrštanjem sorti Fuji Kiku 8 i Topaz (Fuji Kiku 8 × Topaz), kroz determinaciju *S*-genotipa i *ACSI*-genotipa, mogu se izvesti sledeći zaključci:

– Metode za identifikaciju alela *S-RNase* i *ACSI* gena pogodne su za genotipizaciju kako sejanaca u okviru potomstava, tako i za sorte i perspektivne selekcije jabuke;

– Analiza ispitivanih potomstava je potvrdila da je segregacija *S-RNase* i *ACSI* gena u skladu sa Mendelovim zakonima;

– Molekularni markeri su od izuzetnog značaja za izbor roditeljskih sorti i analizu sejanaca u procesu stvaranja novih genotipova jabuke. Ukrštanjem sorti homozigotnih za *ACSI*-2 alel dobijeni su sejanaci koji imaju *ACSI*-2/*ACSI*-2 alelnu konstituciju i predisponirani su za nisku produkciju etilena. Analiza potomstva dobijenog iz ukrštanja Fuji Kiku 8 × Topaz ukazuje da pravilan odabir roditelja, baziran na pozitivnim osobinama i genetičkom polimorfizmu određenih gena, može značajno ubrzati proces stvaranja novih sorti jabuke koje će se odlikovati kvalitetnim plodom dobre skladišne sposobnosti.

Zahvalnica/Acknowledgements

Istraživanja u ovom radu su realizovana sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS, kroz projekat TR-31064 „Stvaranje i očuvanje genetičkog potencijala kontinentalnih vrsta voćaka“.

Literatura

- Beppu K., Komatsu N., Himane H., Yaegaki H., Yamaguchi M., Tao R., Kataoka I. (2005): *S*^c-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80: 760–764.
- Bošković R., Tobutt K.R., Duval H., Batlle I., Dicenta F., Vargas F.J. (1999): A stilar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings, on almond progenies. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 800–810.
- Broothaerts W. (2003): New findings in apple *S*-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some *S*-alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 703–714.
- Broothaerts W., Van Nerum I. (2003): Apple self-incompatibility genotypes: An overview. *Proceedings of XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts, Acta Horticulturae*, 622: 379–387.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinelli M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. (2005): Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACSI* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica*, 141: 181–190.
- Doyle J.J., Doyle L.J. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Dreesen R.S.G., Vanholme B.T.M., Luyten K., Wynsberghe Van L., Fazio G., Roldán-Ruz I., Keulemans J. (2010): Analysis of *Malus S-RNase* gene diversity based on a comparative study

- of old and modern apple cultivars and European wild apple. *Molecular Breeding*, 26, 4: 693–709.
- Katoh N., Goto K., Asano J., Fukushima K., Yamada K., Kasai A., Zhong Li T., Takanoha M., Miyairi K., Okuno T. (2002): S-RNases from self-incompatible and -compatible apple cultivars: purification, cloning, enzymic properties, and pollen tube growth inhibitory activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, 6: 1185–1195.
- Lukić M., Marić S. (2012): Biološke osobine sorti jabuke 'Rajka' i 'Topaz' otpornih prema *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. *Voćarstvo*, 46, 179/180: 83–90.
- Lukić M., Mratinić-Nenadović E., Marić S., Mitrović M. (2008): Perspektivne selekcije jabuke nastale ukrštanjem Idared × Čadel. *Voćarstvo*, 42, 163/164: 67–73.
- Marchese A., Bošković R., Caruso T., Raimondo A., Cutuli M., Tobutt K.R. (2007): A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry 'Kronio', *S₅*, attributable to a pollen-part mutation in the *SFB* gene. *Journal of Experimental Botany*, 58, 15/16: 4347–4356.
- Marić S., Bošković R., Tešović Ž., Lukić M. (2005a): Genetical polymorphism of ACC synthase and ACC oxidase in apple selections bred in Čačak. *Genetika*, 37, 3: 225–235.
- Marić S., Bošković R., Tešović Ž., Lukić M. (2005b): Genetički polimorfizam ACC sintaze i ACC oksidaze kod autohtonih sorti jabuke. *Voćarstvo*, 39, 150: 139–148.
- Sunako S., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. (1999): An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiology*, 119: 1297–1303.
- Tsukamoto T., Ando T., Watanabe H., Marchesi E., Kao T. (2005): Duplication of the S-locus F-box gene is associated with breakdown of pollen function in an S-haplotype identified in a natural population of self-incompatible *Petunia axillaries*. *Plant Molecular Biology*, 57: 141–153.
- Ushijima K., Yamane H., Watari A., Kakchi E., Ikeda K., Hauck N.R., Iezzoni A.F., Tao R. (2004): The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *The Plant Journal*, 39: 573–586.
- Vilanova S., Badenes M.L., Burgos L., Martínez-Calvo J., Llacer G., Romero C. (2006): Self-compatibility of two *Prunus armeniaca* selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology*, 142: 629–641.
- Zhu Y., Barritt B.H. (2008): Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genetic and Genomes*, 4, 3: 555–562.

DETERMINATION OF *S*-GENOTYPE AND *ACSI*-GENOTYPE IN APPLE SEEDLINGS DEVELOPED AT FRUIT RESEARCH INSTITUTE – ČAČAK

Sladana Marić, Milan Lukić

Fruit Research Institute, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Serbia
E-mail: nidzovicladja@yahoo.com

Abstract

The paper presents the results of determination of *S*-genotype and *ACSI*-genotype in parental cultivars and seedlings derived from the progenies obtained after self-pollination of apple cultivar 'Gala Must' and from the fully compatible cross 'Fuji Kiku 8' × 'Topaz' at Fruit Research Institute – Čačak. Alleles of *S-RNase* and *ACSI* genes were identified by polymerase chain reaction (PCR). The parental cultivars were homozygous for allele *ACSI*-2 (*ACSI*-2/*ACSI*-2), and the following *S*-genotypes were determined: 'Gala Must' – S_2S_5 , 'Fuji Kiku 8' – S_1S_9 and 'Topaz' – S_2S_5 . The analysis showed that the selfed progeny of 'Gala Must' segregated 3 S_2S_2 : 2 S_2S_5 : 2 S_5S_5 , as well as that

the seedlings homozygous for S_5 allele do not belong to the selfed progeny. Of ten seedlings derived from the cross 'Fuji Kiku 8' (S_1S_9) × 'Topaz' (S_2S_5), one was S_1S_2 , three were S_1S_5 , five were S_2S_9 and one was S_2S_5 . Determination of *ACSI*-genotype showed that evaluated seedlings were homozygous for allele *ACSI*-2, with two exceptions, i.e. GM×GM-2 and GM×GM-6. These seedlings were expected to be *ACSI*-2/*ACSI*-2, but are observed to be *ACSI*-1/*ACSI*-2 genotype.

Key words: *Malus × domestica*, *S-RNase*, *ACSI*, seedling