

УДК 575.111:634.11:631.52

DOI 10.30679/2587-9847-2018-14-26-29

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ КОМБИНАЦИЙ ГЕНА MD-ACS 1 У НЕКОТОРЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ АВТОХТОННЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ

Супрун И.И., канд. биол. наук, Токмаков С.В., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Добренков Е.А., канд. с.-х. наук

Филиал «Майкопская опытная станция ВИР» (Майкопский р-н, п. Подгорный)

**Реферат.** Приведены результаты ДНК-маркерной идентификации аллельных вариантов гена *Md-ACS1*, участвующего в контроле синтеза эндогенного этилена плодов яблони. По результатам ДНК-маркерного анализа установлены аллельные варианты данного гена у 15 отечественных автохтонных сортов яблони. Выявлено, что у сортов Апорт кубанский и Ахмет (автохтонные сорта юга России) присутствует аллельный вариант *Md-ACS1-1/2*, который может детерминировать средний или пониженный уровень синтеза этилена в плодах при хранении. Данные сорта могут быть рекомендованы как доноры селекционно-ценного признака.

**Ключевые слова:** яблоня, лежкость плодов, синтез этилена, ДНК-маркерный анализ, аллельный полиморфизм

**Summary.** The results of DNA marker identification of the allelic variants of the *Md-ACS1* gene involved in the control of the synthesis of endogenous ethylene apple fruits are presented. According to the results of the DNA marker analysis, allelic variants of this gene were identified for 15 domestic autochthonous apple cultivars. It was revealed that the Aport Kubansky and Ahmet varieties (autochthonous varieties of the South of Russia) have an allele variant *Md-ACS1-1 / 2*, which can determine the average or lower level of ethylene synthesis in the fruits during storage. These varieties can be recommended as donors of a breeding-valuable trait.

**Key words:** apple, fruit storability, ethylene biosynthesis, DNA-markers, gene allelic polymorphism

**Введение.** Одним из признаков, имеющих большое хозяйственное значение у яблони, является лежкоспособность плодов после уборки. В связи с этим создание новых, конкурентоспособных сортов с лёжкими плодами является важнейшим направлением в современной селекции яблони. Генотипы яблони, проявляющие способность к длительному хранению, активно используются в селекционных программах для создания конкурентоспособных сортов. Знание генетической основы данного признака в создаваемом селекционном материале позволяет получить сорта с высоким качеством плодовой продукции. Немаловажными также являются знания о генетическом контроле данного признака у образцов из коллекций генетических ресурсов, что позволяет более целенаправленно отбирать родительские пары для гибридизации.

Этилен является ключевым фактором, регулирующим созревание яблок, и подавление биосинтеза этилена, варьирующему в разных сортах, является основным механизмом продления сроков хранения в контролируемых условиях. Ключевыми ферментами в биосинтезе этилена являются индуцибельные синтаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК-синтаза, ACS) и оксидаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК-оксидаза, ACO) [1, 2].

На начальном этапе биосинтеза этилена фермент АЦК-синтаза преобразует S-аденозил-L-метионин в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК), являющуюся предшественником этилена. Далее, в присутствии кислорода, АЦК под воздействием АЦК-оксидазы разлагается с образованием этилена, аммиака, муравьиной кислоты и CO<sub>2</sub>

[3, 4]. Данные ферменты кодируются серией генов *Md-ACS* и *Md-ACO* соответственно, экспрессирующихся в разных тканях и на разных этапах созревания плодов [5, 6].

Ген *Md-ACS1*, наряду с геном *Md-ACO1*, в значительной степени детерминируют уровень синтеза этилена в плодах во время созревания, а также при хранении, что определяет их значительное влияние на степень лежкости плодов [7]. Две аллельные формы *Md-ACS1-1* и *Md-ACS1-2* обуславливают различный уровень синтеза этилена в плодах при хранении. Гомозиготность по аллелю *Md-ACS1-1* (*Md-ACS1-1/1*) приводит к высокому уровню синтеза этилена в плодах, в то время как для гетерозиготных генотипов (*Md-ACS1-1/2*) и образцов, гомозиготных по аллелю 2 (*Md-ACS1-2/2*), характерен средний и пониженный уровень его синтеза, соответственно.

Ген *Md-ACO1* также влияет на синтез и накопление этилена в созревших плодах: гомозиготность по аллелю *Md-ACO1-1* в сочетании с аллельным вариантом *Md-ACS1-2/2* по гену АЦК-синтазы приводит к значительному снижению синтеза этилена в плодах. Так, к примеру, плоды сорта яблони Фуджи, несущего аллельный набор по данным генам *Md-ACS1-2/2* и *Md-ACO1-1/1*, сохраняют структуру и плотность без существенных изменений в течение восьми месяцев хранения при температуре 2-4 °С [8].

Аллельные различия гена *Md-ACS1* обусловлены inserцией фрагмента ретротранспозона длиной 166 пар оснований в промоторной области гена, приводящей к снижению уровня экспрессии гена [5]. На основании указанного структурного полиморфизма для гена *Md-ACS1* создан эффективный ДНК-маркер, позволяющий идентифицировать их аллельные варианты. Их наличие дает возможность выполнять ДНК-маркерный скрининг генофонда для выявления генотипов, несущих наиболее ценные сочетания аллелей, а также проводить их идентификацию в селекционном материале для создания сортов, обладающих повышенной лежкостью плодов.

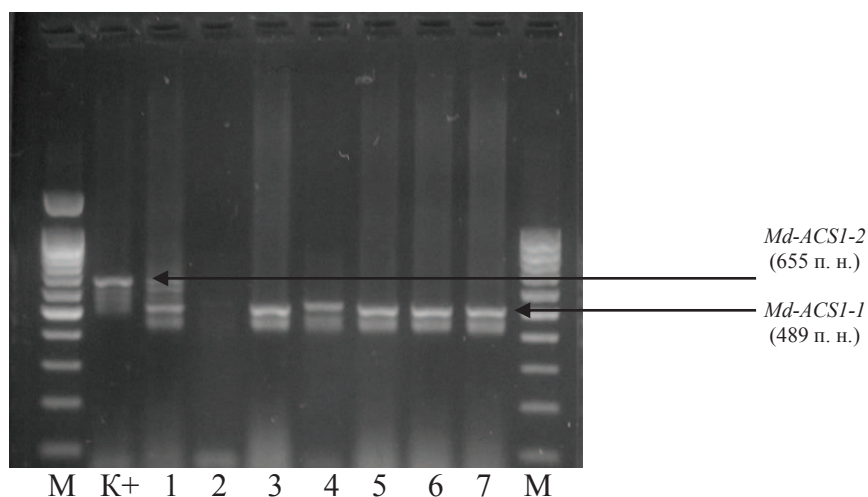
В связи с этим в задачи исследования входило выполнение ДНК-маркерной идентификации аллельных комбинаций гена *Md-ACS1* у сортов яблони, представляющих генофонд юга России: сорта из коллекции СКФНЦСВВ, интродуцированные из разных регионов садоводства и автохтонные сорта Юга России.

**Объекты и методы исследований.** Материалом для исследования послужили 15 автохтонных сортов яблони. Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода ЦТАБ [9]. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: 1,5 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 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 35 циклов: 45 сек. при 94 °С; 45 сек. при 58 °С; финальный цикл синтеза 5 мин. при 72 °С. Для электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов использовали 2 % агарозный гель на основе трис-боратного буфера.

Праймеры для амплификации целевых фрагментов гена *Md-ACS1* были взяты в соответствии с данными [10]. Размер целевых амплифицируемых фрагментов для изучаемых генов следующий: аллель *ACS1-1* – 489 пар оснований, аллель *ACS1-2* – 655 пар оснований.

В качестве сорта-стандарта использовали сорт яблони зарубежной селекции Фуджи, который имеет по данному гену аллельный вариант *Md-ACS1-2/2* [7].

**Обсуждение результатов.** Использование в ходе исследований сортов-стандартов, несущих различные аллельные комбинации генов *Md-ACS1*, дало возможность максимально четко интерпретировать полученные результаты. При этом как для сорта-стандарта, так и для изученных сортов не возникало затруднений при идентификации аллельного набора анализируемого гена. На рисунке продемонстрированы результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР с праймерной парой, фланкирующей вставку ретротранспозона в гене *Md-ACS1* и позволяющей идентифицировать аллельные варианты у ряда сортов яблони из изученной выборки.



Примечание: М – маркер молекулярной массы ДНК; К+ – сорт контроль Фуджи; 1-8 – исследуемые образцы яблоки: 1 – Апорт кубанский, 2 – Антоновка каменка, 3 – Балкарское, 4 – Волошка, 5 – Августовское полосатое, 6 – Антоновка ольгинская, 7 – Анис полосатый.

Рис. Идентификация аллельных вариантов гена *Md-ACSI* у изученных сортов яблоки

Из рисунка видно, что у изученных образцов выявляются разные варианты сочетаний фрагментов амплификации. У сорта Фуджи идентифицируется фрагмент с размером 655 пар нуклеотидов, что соответствует аллелю *Md-ACSI-2*. У образца №1 (сорт Апорт кубанский) – два фрагмента с размерами 655 и 489 пар нуклеотидов (комбинация аллелей *Md-ACSI-1/Md-ACSI-2*). У образцов 2-7 идентифицируется один фрагмент с размером 489 пар нуклеотидов. Наличие неспецифически амплифицированных фрагментов, представляющих более легкую фракцию по отношению к целевым фрагментам, на электрофореграмме (расположены ниже целевого фрагмента) допускается, в соответствии с литературными данными, и не препятствует идентификации целевых аллелей. В таблице приведены результаты суммарные результаты ДНК-маркерного анализа по гену *Md-ACSI*.

Идентификация аллелей гена *Md-ACSI* у сортов яблоки

№	Сорт	<i>Md-ACSI-1</i>	<i>Md-ACSI-2</i>
1	Апорт кубанский	+	+
2	Антоновка каменка	+	-
3	Балкарская	+	-
4	Волошка	+	-
5	Августовское полосатое	+	-
6	Антоновка ольгинская	+	-
7	Анис полосатый	+	-
8	Папировка белая	+	-
9	Анис бархатистый	+	-
10	Антоновка красная	+	-
11	Ахмет	+	+
12	Антоновка краснобочка	+	-
13	Антоновка новая	+	-
14	Антоновка ст. Дондуковская	+	-
15	Агванш Алма	+	-

По гену *Md-ACSI* у большей части образцов идентифицируется аллель *Md-ACSI-1* в гомозиготе. Такой аллельный вариант не является наиболее селекционно-ценным, однако его сочетание с аллелем *Md-ACSI-2* детерминирует средний уровень синтеза эндогенного этилена в плодах, что повышает их лежкоспособность. Наиболее ценным аллельным вариантом является гомозиготность по аллелю *Md-ACSI-2*, однако он не был выявлен ни у одного из изученных образцов. Аллельный вариант *Md-ACSI-1/Md-ACSI-2*, выявленный у сортов Апорт кубанский и Ахмет представляет ценность для селекции, т.к. определяет

средний уровень синтеза этилена в плодах. Кроме того, данный аллельный вариант в сочетании с аллелем гена *Md-ACO1-1* в гомозиготе обуславливает пониженный уровень синтеза этилена. Поэтому сорта яблони Апорт кубанский и Ахмет могут быть рекомендованы как доноры ценного аллеля данного гена.

Анализируя распространение аллелей гена *Md-ACS1* в современном мировом генофонде, можно сделать вывод о том, что в выборке изученных автохтонных сортов уровень распространения аллельной комбинации *Md-ACS1-1/ Md-ACS1-1* значительно выше, чем в современном мировом генофонде яблони. Так, в работе японского коллектива Т. Harada et al 2000 с соавторами, при изучении выборки из 35 сортов, созданных в период 1970-2000, было выявлено следующее распределение частот встречаемости аллелей: *Md-ACS1-1/ Md-ACS1-1* – 10 сортов, *Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2* – 14 сортов, *Md-ACS1-2/ Md-ACS1-2* – 11 сортов [10].

В работе по изучению аллельного полиморфизма данного гена в европейском генофонде яблони, в выборке из 50 сортов, созданных в конце 20 века, выявили, что аллельный вариант *ACS1-1/ Md-ACS1-1* также не является самым распространенным – он был найден у 13 сортов, аллельные варианты *Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2* и *Md-ACS1-2/ Md-ACS1-2* были идентифицированы у 25 и 12 сортов яблони, соответственно [11]. Очевидно, что уровень распространения селекционно-ценных аллельных вариантов в современной мировой генплазме значительно выше, чем у автохтонных сортов. Очевидная причина этого – целенаправленная селекционная работа по хозяйственно-ценным признакам.

**Выводы.** Таким образом, выполненная молекулярно-генетическая идентификация аллельных вариантов гена *Md-ACO1* выявила наличие селекционно-ценных аллелей у двух сортов в общей выборке из 15 образцов яблони. Сорта Апорт кубанский и Ахмет могут быть рекомендованы как доноры селекционно-ценных аллелей.

### Литература

1. Dong, J. G. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit/ J. G. Dong, W. T. Kim, W. K Yip et al // *Planta*, - 1991. - Vol.185. - P.38–45.
2. Dong, J. G. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit / J. G. Dong, D. Olson, A. Silverstone, [et al.] // *Plant Physiology* - 1992. - Vol.98 - P.1530–1531.
3. Adams, D. O., Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene / Adams, D. O., Yang, S. F. // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76 - 1979. – Vol.7 – P.170–174.
4. Kende, H. Ethylene biosynthesis // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, - 1993. - Vol.44. - P.283–307.
5. Sunako, T. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life / T. Sunako, W. Sakuraba, M. Senda // *Plant Physiol.*, - 1999. - Vol.119. - P.1297–1304.
6. Wiersma, P. A. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of 'Sunrise' and 'Golden Delicious' apple fruit / P. A. Wiersma, H. Zhang, C. Lu [et al.] // *Postharvest Biology and Technology*, - 2007. - Vol. 44(3) - P.204-211.
7. Zhu, Y. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker assisted selection / Y. Zhu, B.H., Barritt // *Tree Genetics and Genomes* - 2008. - Vol.4 - P.555–562.
8. Fan, X. 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening / X. Fan, S.M. Blankenship, J.P. Mattheis // *J Am Soc Hortic Sci* - 1999 – Vol.124 – P.690–695
9. 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.
10. Harada, T. An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars / T. Harada, T. Sunako, Y. Wakasa, J. Soejima, T. Satoh, M. Niizeki // *Theor Appl Genet.*- 2000.- V. 101.- P. 742–746.
11. Oraguzie, N. C. Inheritance of *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / N. C. Oraguzie, H. Iwanami, J. Soejima, T. Harada, A. Hall // *Theor Appl Genet.*- 2004.- V. 108.- P. 1526–1533.