

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА *MD-EXP7*, ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕГО ПРИЗНАКИ КАЧЕСТВА ПЛОДОВ ЯБЛОНИ У НЕКОТОРЫХ СОВРЕМЕННЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНОФОНДА СКФНЦСВВ

Супрун И.И., канд. биол. наук, Степанов И.В., Лободина Е.В.

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

Реферат. Приведены результаты генотипирования 13 сортов яблони из коллекции генетических ресурсов СКФНЦСВВ по микросателлитному локусу, сцепленному с геном *MD-EXP7*, участвующему в генетическом контроле плотности мякоти плодов. В изученной выборке сортов яблони было выявлено 5 аллельных вариантов искомого гена. Ряд образцов несет наиболее селекционно-ценные аллели, и могут быть рекомендованы для использования в селекции.

Ключевые слова: яблоня, плотность мякоти плода, *Md-EXP7*, генофонд, аллельный полиморфизм, маркерная селекция

Summary. The results of genotyping of 13 apple varieties from the collection of genetic resources of NCFNCHVW on the microsatellite locus linked to the *MD-EXP7* gene involved in the genetic control of fruit pulp firmness are presented. Five allelic combinations of the target gene were revealed among the studied apple cultivars. A number of samples carry the most valuable alleles, and can be recommended for use in breeding.

Key words: apple, fruit pulp firmness, texture, *Md-EXP7*, gene pool, allelic polymorphism, marker-assisted breeding

Введение. Созревание плодов включает в себя целый ряд физиолого-биохимических процессов, которые в итоге формируют потребительские качества плода, обусловленные органолептическими характеристиками. Размягчение мякоти можно отнести к одному из наиболее очевидных изменений, которое существенно влияет на сенсорные характеристики плодов, то есть определяет их плотность. Чрезмерное размягчение не только делает фрукты менее привлекательными для потребителей, но также и увеличивает стоимость самой продукции, в связи с тем, что транспортировка и хранение таких плодов повышает финансовые издержки, кроме того, эти плоды больше подвержены заболеваниям хранения.

Размягчение плодов при хранении обусловлено рядом комплексных перестроек в архитектонике клеточных стенок, вызываемых энзиматическим гидролизом полисахаридов. Несколько гидролаз, вовлеченных в этот процесс, действуют на ковалентные связи, удерживающие вместе полисахариды различных классов. Тем не менее, было показано, что участие известных ферментов клеточных стенок (эндо-1,4-β-глюканаза, пектин-метил-эстераза, пектат-лиаза, гликозидаза) не может полностью объяснить процесс размягчения [1].

Было установлено, что наряду с указанными ферментами достоверное влияние на деполимеризацию полисахаридов клеточной стенки оказывают ферменты экспансины. У яблони одним из генов, участвующих в контроле активности экспансина, является ген *Md-EXP7*. Он локализован на 1-й хромосоме [2, 3]. Согласно двухступенчатой модели регуляции первый этап размягчения мякоти плодов обусловлен действием экспансинов, в то время как на втором этапе данный процесс детерминирован ферментами полигалактуроназами [4, 5].

Для гена *Md-EXP7* в настоящее время идентифицирован функциональный ДНК маркер – SSR-локус косегрегирующий с данным геном. Длина микросателлитной последова-

тельности достоверно взаимосвязана с уровнем экспрессии гена *Md-EXP7* и плотностью мякоти, соответственно. Было показано, что при наличии аллели с размером амплифицированной последовательности 198 пар нуклеотидов (п.н.), показатель плотности будет максимальным, размер аллелей 202 п.н. характеризует средний уровень показателя. При размере аллелей 214 п.н. показатель плотности будет наиболее низким [2, 3].

В настоящее время выполнен ряд исследований, которые в разной степени подтверждают перспективность использования данного ДНК-маркера для идентификации целевого гена, однако при этом некоторые авторы говорят о варьировании уровня влияния тех или иных аллелей искомого гена на фенотипическое проявление признака [2, 3, 6 -9]. Несмотря на это ДНК-маркерный отбор может быть использован для элиминации из селекционного процесса аллельного варианта, обладающего наименьшей селекционной ценностью.

В селекции на высокое качество плодов применение ДНК-маркеров для идентификации аллелей целевых генов имеет важное значение. Это обусловлено возможностью выявления селекционно-ценных форм, несущих аллельный набор, детерминирующий высокие показатели качества плодов, на ранних этапах вегетации – до вступления гибридных форм в плодоношение. Таким образом, появляется возможность провести отбор и выбраковку сеянцев с «нежелательными» аллелями уже на первом году жизни сеянцев, что позволяет существенно сократить объем селекционного материала и повысить экономическую эффективность селекции. Очевидно, что указанный ДНК-маркер может быть использован в селекционных программах для отбора сеянцев с ценными аллельными вариантами, а также в ходе предселекционной оценки генофонда для подбора оптимальных родительских пар скрещиваний. В связи с этим в задачу наших исследований входило выполнение ДНК-маркерной идентификации аллельных комбинаций гена *Md-EXP7* у сортов яблони из коллекции генетических ресурсов СКФНЦСВВ.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования послужили 13 сортов яблони из коллекции генетических ресурсов СКФНЦСВВ. В выборку изучаемых генотипов входили как сорта современной селекции, так и автохтонные сорта Крыма. Для экстракции ДНК использовали метод ЦТАБ в модификации S. O. Rogers & A. J. Bendich [10]. Анализ наличия гена *Md-EXP7* проводили с использованием сонаследуемого с ними SSR-маркера: *Md-Exp7ssr* [2]. Прямой праймер маркеров на 5' конце был мечен флуоресцентной меткой FAM.

Постановку ПЦР проводили по следующей программе: начальная денатурация 3 мин при 95 °С, далее 35 циклов: 10 секунд при 94 °С денатурация, 45 секунд отжиг праймеров при 58 °С, 45 секунд при 72 °С – элонгация; завершающий цикл элонгации – 5 минут при 72 °С. Использовали следующие концентрации компонентов реакционной смеси: 0,05 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов; 0,3 мкМ каждого праймера; 2,5 мкл ПЦР-буфера и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»); 50 нг ДНК. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл.

Анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов для ДНК-маркера искомого гена *Md-EXP7* проводили с использованием фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Результаты обрабатывали в программе GeneMapper 4.1.

Обсуждение результатов. В результате работы получены данные по молекулярно-генетической идентификации целевых аллелей искомого гена для 13 образцов яблони. На рисунке, в качестве примера, представлены результаты ПЦР идентификации данных генов у изучаемого образца с использованием фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130.

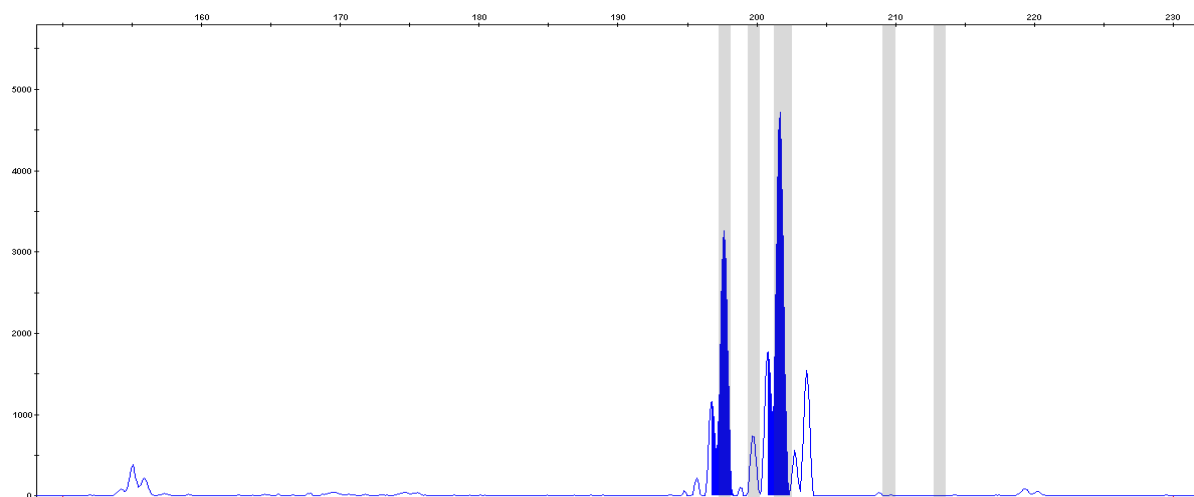


Рис. Анализ полиморфизма по локусу гена *Md-Exp-7* у сорта Витязь с использованием фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130

У представленного на рисунке образца на электрофореграмме идентифицируется 2 пика, что соответствует одной и двум аллелям гена соответственно. Размер амплифицированного фрагмента у данного сорта 198 и 202 пар нуклеотидов. Аллель гена, с которым сцеплена микросателлитная последовательность размером в 198 пар нуклеотидов, детерминирует более высокую плотность мякоти плодов яблони. На основе этих данных можно рекомендовать данный сорт как источник селекционно ценного аллеля.

Обобщённые данные по изученным сортам яблони представлены в таблице. Для сортов, имеющих гомозиготность по локусу гена *Md-EXP7*, идентифицируется один продукт ПЦР – это сорта Соковое 3, Валюта, Осенняя красавица, Быстремовское, Россашанское зимнее и Исеть белая. Образцы, у которых представлено два фрагмента – гетерозиготны.

Аллельный полиморфизм генов *Md-EXP7* у сортов яблони из коллекции генетических ресурсов СКФНЦСВВ.

Сорт	Md-Exp7		
Соковое 3		202	
Валюта		202	
Благая весть	198		214
Имант		202	214
Осенняя красавица		202	
Румяный альпинист		202	206
Витязь	198	202	
Быстремовское		202	
Мечта	198	202	
Белорусское сладкое		202	214
Россашанское зимнее		202	
Исеть белая		202	
Уралец	198	202	

Из таблицы видно, что наиболее распространенным аллелем является аллель с размером амплифицированного фрагмента 202 пары нуклеотидов. Он был выявлен у 12 образцов из 13 изученных, причём у ряда образцов в гомозиготном состоянии. Данный аллель, при наличии его в гомозиготе (сорта Соковое 3, Валюта, Быстремовское, Исеть белая), обуславливает средний показатель скальваемости мякоти. При этом возможно значительное варьирование в фенотипическом проявлении данного признака, которое обусловлено влиянием еще ряда генов, один из которых ген *Md-PG1*.

Образцы, у которых выявлены аллели с размером 206 и 214, имеют повышенную вероятность ухудшения признака. В связи с этим они не рекомендуются в качестве приоритетных для использования в селекции, так как селекционно нежелательные аллели могут быть унаследованы гибридным потомством. Наиболее ценными с точки зрения использования в селекции являются сорта яблони Благая весть, Витязь, Мечта и Уралец. Все они несут микросателлитный локус с размером 198 пар нуклеотидов, который сцеплен с аллелем гена, детерминирующим наибольший уровень скальваемости мякоти. Учитывая тот факт, что у данных сортов этот локус находится в гетерозиготном состоянии, проявление признака у них может отклоняться в сторону снижения характеристики. Несмотря на данный факт, эти сорта являются перспективными источниками селекционно ценного аллеля искомого гена. При этом наиболее перспективным является аллельный вариант 198/202 п.н., так как аллели 198 и 202 п.н. относятся к наиболее ценным.

Литература

1. Brummell, D. A Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plant / D. A. Brummell, M. H. Harpster // *Plant Mol Biol.* – 2001. – № 47. – P. 311–340.
2. Costa, F. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) / F. Costa, W. E. Van de Weg, S. Stella [et al.] // *Tree Genetics & Genomes.* – 2008. – №4. – 575-586.
3. Costa, F. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / F. Costa, C. P. Peace, S. Stella [et al.] // *J Expt Bot.* – 2010. – №61. – P. 3029–3039.
4. Mann, H. S. Differential expression of cell-wall-modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage / H. S. Mann, J. J. Alton, S. Kim [et al.] // *J Amer Soc Hort Sci.* – 2008. – №133. – P. 152–157.
5. Longhi, S. A candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) / S. Longhi, M. T. Hamblin, L. Trainotti [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2013. – №13. – P. 37.
6. Nybom, H. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm / H. Nybom, M. Ahmadi-Afzadi, J. Sehic [et al.] // *Tree Genetics & Genomes.* – 2012. – DOI 10.1007/s11295-012-0554-z
7. Савельев Н.И., Савельева Н.Н., Савельева Е.Н. Скрининг диких видов и разновидностей рода *Malus Mill.* по устойчивости к абиотическим, биотическим стрессорам и длительной лежкости плодов // *Плодоводство и ягодоводство России.* 2014. № 1. С. 273-278.
8. Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Аллельное разнообразие гена Md-Exp7 у сортов яблони и груши // *Вестник мичуринского государственного аграрного университета.* 2012. № 4. С. 23-25.
9. Супрун И.И., Володин В.А., Токмаков С.В., Щербатко В.Д. Анализ аллельного полиморфизма генов *MD-EXP7* и *MD-PG1*, детерминирующих признаки качества плодов, у современных и автохтонных сортов яблони Крыма [Электронный ресурс] // *Плодоводство и виноградарство Юга России.* 2015. № 33(3). С. 1-11. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/15/03/01.pdf>. (дата обращения: 16.09.2019).
10. Rogers, S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // *Plant Molecular Biology.* – 1985. - №5. – С. 69-76.