

УДК 634.11:575.2

DOI 10.30679/2587-9847-2020-29-160-164

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОТИПОВ ЗЕМЛЯНИКИ ПО ГЕНУ *FaFAD1* АРОМАТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ПЛОДОВ**Лыжин А.С., канд. с.-х. наук***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина» (Мичуринск)*

Реферат. Показаны результаты анализа аллельного полиморфизма сортов и форм земляники по гену *FaFAD1* ароматического комплекса плодов. Идентифицированы носители функционального аллеля гена *FaFAD1*, ассоциированного с высоким уровнем биосинтеза γ -декалактона: сорта Кубата, Царица, Red Gountlet, Vima Kimberly и Vima Tarda, что позволяет использовать их в селекции на аромат плодов в качестве ценных исходных форм.

Ключевые слова: земляника, аромат плодов, γ -декалактон, молекулярные маркеры, ген *FaFAD1*

Summary. The results of the analysis of allelic polymorphism of strawberry varieties and forms for the *FaFAD1* fruit aroma gene were shown. Identified carriers of functional allele *FaFAD1* gene associated with a high level of γ -decalactone biosynthesis: varieties Kubata, Tsaritsa, Red Gountlet, Vima Kimberly and Vima Tarda, which allows us to be used as valuable initial forms in breeding for fruit aroma.

Key words: strawberry, fruit aroma, γ -decalactone, molecular markers, *FaFAD1* gene

Введение. Земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) относится к числу наиболее распространённых ягодных культур в мире. Её популярность обусловлена такими признаками как скороплодность, ранний срок созревания, десертный вкус, аромат и богатый биохимический состав плодов. [1, 2]. Однако селекция земляники до недавнего времени в основном была направлена на повышение товарных качеств плодов, урожайности, устойчивости растений к неблагоприятным биотическим факторам, при этом совершенствованию таких потребительских качеств как биохимический состав и аромат плодов уделялось недостаточно внимания, что привело к снижению данных показателей у многих промышленных высокопродуктивных сортов [3, 4].

Характерный приятный аромат плодов земляники обусловлен содержанием большого количества летучих ароматообразующих органических веществ (сложные эфиры, фураноны, терпены, альдегиды, кетоны, спирты, серосодержащие соединения и др.), общее число которых в плодах превышает 360 [5-7]. Наиболее значительный вклад в формирование ароматического профиля плодов земляники вносят около 20 соединений, к числу которых относится γ -декалактон, добавляющий аромату земляники персиковоподобные фруктовые сладкие ноты [8, 9].

Интенсивность биосинтеза и накопления γ -декалактона в плодах определяется сочетанием многих факторов: генотипом особи, степенью зрелости плодов, погодноклиматическими условиями [10]. При этом, в отличие от большинства компонентов ароматического профиля плодов земляники, формирование которых обусловлено полигенными эффектами, биосинтез γ -декалактона в плодах в основном детерминирован главным геном *FaFAD1*, картированным в дистальном районе длинного плеча хромосомы III-2 генома *F.* × *ananassa* Duch. [11]. По данным Zorrilla-Fontanesi с соавторами [12] высокое содержание γ -декалактона в плодах земляники в 93,3% случаев обусловлено наличием гена *FaFAD1*. При этом установлено, что биосинтез γ -декалактона в плодах

земляники определяется экспрессией функционального аллеля *FaFAD1*, а отсутствие γ -декалактона обусловлено либо блокировкой транскрипции мРНК гена *FaFAD1*, либо отсутствием в геноме функционального аллеля [13].

Идентификация главных детерминант данного признака позволяет вести целенаправленный отбор перспективных форм с использованием диагностических ДНК-маркеров [13, 14].

Целью настоящего исследования являлось молекулярно-генетическое тестирование генотипов сортов и отборных семян земляники по гену *FaFAD1* ароматического комплекса плодов для идентификации форм, перспективных в селекции на аромат плодов.

Объекты и методы исследований. Исследования проведены в 2019-2020 гг. В качестве биологических объектов использованы сорта и отборные формы земляники генетической коллекции ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина».

Экстракция тотальной ДНК осуществлялась согласно протоколу DArT [15] с модификациями, позволяющими согласно проведённым ранее исследованиям [16, 17] получать экстракт геномной ДНК дикорастущих видов и сортов земляники необходимой для постановки ПЦР концентрации и чистоты.

Для идентификации в геноплазме земляники гена *FaFAD1* использовали маркер FaFAD1. Целевым продуктом маркера FaFAD1 является фрагмент размером 500 п.н. (соответствует активному аллелю, γ -декалактон продуцируется). У форм земляники, в плодах которых γ -декалактон не синтезируется, данный фрагмент не амплифицируется [13]. Контролем присутствия в геноме анализируемых форм земляники целевого аллеля гена *FaFAD1* являлся дикорастущий вид *F. orientalis* Los.

Использованные в работе праймеры, синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва) и имели следующую нуклеотидную последовательность: FaFAD1 for 5'-CGGGATTAATGGTTTTGTTGTTGACCGACC-3', FaFAD1 rev 5'-GTAGAAGAGAGAGACCAAGACGAG-3'.

Реакционная смесь для ПЦР общим объемом 15 мкл содержала: 1,5 мМ 10x Taq-буфера (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $-\text{MgCl}_2$), 2,0 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl_2 , 10 пМ каждого праймера, 0,2 U Taq-полимеразы и 20 нг геномной ДНК. Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Амплификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы «BIO-RAD» по следующей программе: денатурация 4 мин при 94°C; далее 25 циклов: 30 с при 94°C, 30 с при 56°C, 30 с при 72°C; далее финальная элонгация 10 мин при 72°C.

Разделение продуктов амплификации проводили электрофоретическим методом в агарозном геле (концентрация агарозы – 2%, буферная система – 1x TBE). Определение размера ампликонов проводили с использованием Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Обсуждение результатов. Согласно проведённым исследованиям функциональный аллель гена *FaFAD1* выявлен у 5 генотипов из 21 проанализированных, что составляет 23,8%. У 76,2% форм ген *FaFAD1* отсутствует (пример электрофоретического профиля маркера FaFAD1 представлен на рисунке, результаты идентификации – в таблице).

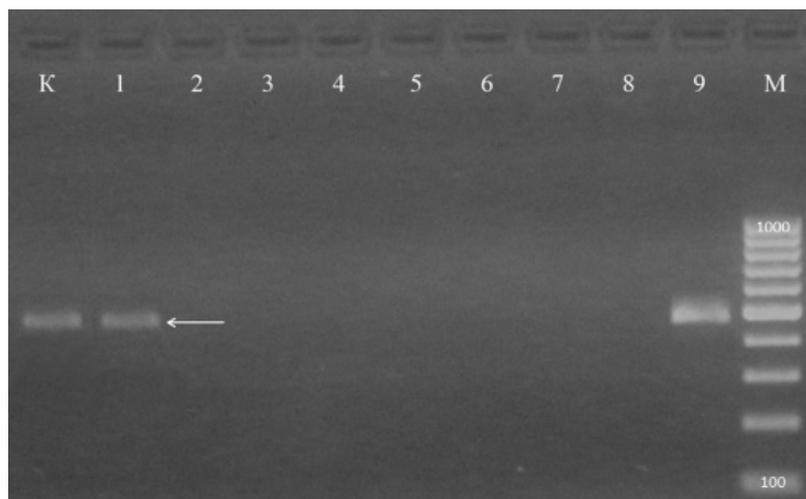


Рисунок 1 – Электрофоретический профиль маркера FaFAD1 генотипов земляники
 К – контроль (*F. orientalis* Los.), 1 – Кубата, 2 – 56-5, 3 – 26-5, 4 – Korona, 5 – Троицкая,
 6 – Яркая, 7 – 932-29, 8 – Ostara, 9 – Царица, М – маркер молекулярного веса

Таблица 1 – Аллельный полиморфизм гена *FaFAD1* у сортов и форм земляники
 (1 – аллель присутствует, 0 – аллель отсутствует)

№	Генотип	<i>FaFAD1</i>
		500 п.н.
1	Боровицкая (Надежда × Red Gauntlet)	0
2	Кубата (Кубенская × Holiday)	1
3	Ласточка (922-67 × Привлекательная)	0
4	Привлекательная (Рубиновый кулон × Allbritton)	0
5	Троицкая (<i>F.</i> × <i>ananassa</i> Duch. × <i>F. moschata</i> Duch.)	0
6	Урожайная ЦГЛ (Zenga Zengana × Redcoat)	0
7	Фейерверк (Zenga Zengana × Redcoat)	0
8	Царица (Venta × Red Gauntlet)	1
9	Яркая (Zenga Zengana × Redcoat)	0
10	Ostara (Red Gauntlet × Masherahs Daurernte)	0
11	Polka (Unduka × Sivetta)	0
12	Quicky (CIVN251)	0
13	Red Gountlet ((NJ New Jersey 1051 × Climax) × (Climax × New Jersey 1051))	1
14	Symphony (Rhapsody × Holiday)	0
15	Vima Kimberly (Gorella × Chandler)	1
16	Vima Tarda (Vima Zanta × Vicoda)	1
17	298-19-9-43 [(<i>F. orientalis</i> Los. × <i>F. moschata</i> Duch.) × <i>F. ananassa</i> Duch.]	0
18	26-5 (<i>F. ananassa</i> Duch. × [(<i>F. orientalis</i> Los. × <i>F. moschata</i> Duch.) × <i>F. ananassa</i> Duch.]])	0
19	928-12 [(<i>F. orientalis</i> Los. × <i>F. moschata</i> Duch.) × <i>F. ananassa</i> Duch.]	0
20	932-29 (<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i> × <i>F. ananassa</i> Duch.)	0
21	56-5 (Gigantella Maxim × Привлекательная)	0

Среди 9 сортов отечественной селекции ген *FaFAD1* присутствует у 22,2% форм (сорта Кубата и Царица). Среди 7 сортов зарубежной селекции ген *FaFAD1* идентифицирован у 42,8% форм (сорта Red Gountlet, Vima Kimberly и Vima Tarda). При этом необходимо отметить, что сорта Кубата и Царица также получены с использованием в гибридизации в качестве родительских форм сортов зарубежной селекции. Более широкое распространение гена *FaFAD1* у сортов земляники иностранной селекции также показано в других работах [18, 19]. Полученный результат предположительно может объясняться генетической близостью многих зарубежных сортов вследствие активного применения в гибридизации одних и тех же исходных форм, одна или несколько из которых могли являться донором функционального аллеля гена *FaFAD1*.

Среди проанализированных отборных семян земляники функциональный аллель гена *FaFAD1* не выявлен, хотя формы 298-19-9-43, 26-5 и 928-12 являются сложными межвидовыми гибридами и получены с использованием доноров гена *FaFAD1* – дикорастущих видов *F. orientalis* Los. и *F. moschata* Duch.

Выводы. Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа аллельного состояния гена *FaFAD1* перспективными источниками высокого содержания γ -декалактона в плодах являются сорта Кубата, Царица, Red Gountlet, Vima Kimberly и Vima Tarda, характеризующиеся наличием активного аллеля гена *FaFAD1*.

Литература

1. Giampieri, F. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health / F. Giampieri, S. Tulipani, J.M. Alvarez-Suarez, J.L. Quiles, B. Mezzetti, M. Battino // Nutrition. – 2012. – V. 28(1). – P. 9-19. DOI: 10.1016/j.nut.2011.08.009.
2. Michalska, A. Profiles of bioactive compounds in fruits and leaves of strawberry cultivars / A. Michalska, C. Carlen, J. Heritier, W. Andlauer // J. Berry Res. – 2017. – V. 7(2). – P. 71-84. DOI: 10.3233/JBR-160146.
3. Ulrich, D. A search for the ideal flavor of strawberry - Comparison of consumer acceptance and metabolite patterns in *Fragaria* \times *ananassa* Duch. / D. Ulrich, K. Olbricht // J. Appl. Bot. Food Qual. – 2016. – V. 89. – P. 223-234. DOI: 10.5073/JABFQ.2016.089.029.
4. Bianchi, G. Analysis of aroma compounds in new strawberry advanced genotypes / G. Bianchi, P. Lucchi, M.L. Maltoni, A.F. Fagherazzi, G. Baruzzi // Acta Hort. -2017. – V. 1156. – P. 673-678. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1156.98.
5. Aharoni, A. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species / A. Aharoni, A.P. Giri, F.W. Verstappen, C.M. Berteau, R. Sevenier, Z. Sun, M.A. Jongsma, W. Schwab, H.J. Bouwmeester // Plant Cell. – 2004. – V. 16(11). – P. 3110-3131. DOI: 10.1105/tpc.104.023895.
6. Jetti, R.R. Quantification of selected aroma-active compounds in strawberries by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and correlation with sensory descriptive analysis / R.R. Jetti, E. Yang, A. Kurnianta, C. Finn, M.C. Qian // J. Food Sci. – 2007. – V. 72. – P. 487-496. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00445.x.
7. Schwieterman, M.L. Strawberry Flavor: Diverse Chemical Compositions, a Seasonal Influence, and Effects on Sensory Perception / M.L. Schwieterman, T.A. Colquhoun, E.A. Jaworski, L.M. Bartoshuk, J.L. Gilbert, D.M. Tieman, A.Z. Odabasi, H.R. Moskowitz, K.M. Folta, H.J. Klee, C.A. Sims, V.M. Whitaker, D.G. Clark // PloS One. – 2014. – V. 9(2). – P. e88446. DOI: 10.1371/journal.pone.0088446.
8. Jouquand, C. A sensory and chemical analysis of fresh strawberries over harvest dates and seasons reveals factors that affect eating quality / C. Jouquand, C. Chandler, A. Plotto, K. Goodner // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2008. – V. 133(6). – P. 859-867. DOI: 10.21273/JASHS.133.6.859.

9. Urrutia, M. Genetic analysis of the wild strawberry (*Fragaria vesca*) volatile composition / M. Urrutia, J.L. Rambla, K.G. Alexiou, A. Granell, A. // Plant Physiol. Bioch. – 2017. – V. 121. – P. 99-117. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.10.015.
10. Olbricht, K. Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria* × *ananassa* Duch. / K. Olbricht, C. Grafe, K. Weiss, D. Ulrich // Plant Breeding. – 2008. – V. 127(1). – P. 87-93. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01422.x.
11. Sánchez-Sevilla, J.F. Deciphering gamma-decalactone biosynthesis in strawberry fruit using a combination of genetic mapping, RNA-Seq and eQTL analyses / J.F. Sánchez-Sevilla, E. Cruz-Rus, V. Valpuesta, M.A. Botella, I. Amaya // BMC genomics. – 2014. – V. 15(1). – P. 218. DOI: 10.1186/1471-2164-15-218.
12. Zorrilla-Fontanesi, Y. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase *FaOMT* as the locus controlling natural variation in mesifurane content / Y. Zorrilla-Fontanesi, J.L. Rambla, A. Cabeza, J.J. Medina, J.F. Sánchez-Sevilla, V. Valpuesta, M.A. Botella, A. Granell, I. Amaya // Plant physiology. – 2012. – V. 159(2). – P. 851-870. DOI: 10.1104/pp.111.188318.
13. Chambers, A.H. Identification of a strawberry flavor gene candidate using an integrated genetic-genomic-analytical chemistry approach / A.H. Chambers, J. Pillet, A. Plotto, J. Bai, V.M. Whitaker, K.M. Folta // BMC genomics. – 2014. – V. 15(1). – P. 217. DOI: 10.1186/1471-2164-15-217.
14. Noh, Y.H. A high-throughput marker-assisted selection system combining rapid DNA extraction high-resolution melting and simple sequence repeat analysis: Strawberry as a model for fruit crops / Y.H. Noh, S. Lee, V.M. Whitaker, K.R. Cearley, J.S. Cha // Journal of Berry Research. – 2017. – V. 7(1). – P. 23-31. DOI: 10.3233/JBR-160145.
15. DArT, 2014 URL: http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DArT_DNA_isolation.pdf (дата обращения: 10.07.2018).
16. Лукьянчук, И.В. Анализ генетической коллекции земляники (*Fragaria* L.) по генам *Rca2* и *Rpfl* с использованием молекулярных маркеров / И.В. Лукьянчук, А.С. Лыжин, И.И. Козлова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – №7. – С. 795-799. DOI: 10.18699/VJ18.423.
17. Лыжин, А.С. Полиморфизм сортов земляники (*Fragaria* × *ananassa*) по гену устойчивости к антракнозу *Rca2* / А.С. Лыжин, И.В. Лукьянчук, Е.В. Жбанова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Т. 180. – №1. – С. 73-77. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77.
18. Cruz-Rus, E. Validation of a PCR test to predict the presence of flavor volatiles mesifurane and γ -decalactone in fruits of cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) / E. Cruz-Rus, R. Sesmero, J.A. Ángel-Pérez, J.F. Sánchez-Sevilla, D. Ulrich, I. Amaya // Molecular breeding. – 2017. – V. 37(10). – P. 131. DOI: 10.1007/s11032-017-0732-7.
19. Лыжин, А.С. Полиморфизм сортов и дикорастущих видов земляники генетической коллекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1* / А.С. Лыжин, И.В. Лукьянчук, Е.В. Жбанова // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020. – Т. 24. – №1. – С. 5-11. DOI: 10.18699/VJ20.588.