


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Идентификация аллелей генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* в селекционных формах яблони, устойчивых к парше

И.И. Супрун , С.В. Токмаков, Е.А. Аль-Накиб, Е.В. Лободина


Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия,
Функциональный научный центр «Селекции и питомниководства», Краснодар, Россия
 supruni@mail.ru

Аннотация. Создание сортов яблони, обладающих высоким уровнем плотности мякоти и лежкоспособности плодов, является одной из важных задач в селекции. Среди генов, контролирующих данные признаки, установлена роль гена контроля биосинтеза эндогенного этилена *Md-ACS1* и генов экспансина *Md-Exp7* и полигалактуроназы *Md-PG1*. Применение ДНК-маркерного анализа для решения задач в селекции на признаки качества плодов позволяет не только отслеживать одновременно несколько целевых генов, но и проводить выбраковку растений с нежелательными аллелями, не дожидаясь вступления гибридов в плодоношение, благодаря чему можно ускорить процесс отбора селекционно ценных форм. В целях отбора доноров по комплексу селекционно приоритетных аллелей с использованием мультиплексной ПЦР была выполнена молекулярно-генетическая идентификация генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* у 256 селекционных форм, которые содержат ген устойчивости к парше *Rvi6* и аллельные варианты гена *Md-ACS1*: 90 образцов – *Md-ACS1* (2/2) и 166 образцов – *Md-ACS1* (1/2). Анализ родительских сортов яблони (Ренет Симиренко, Моды, Смеральда, Ренуар, Фулжион и Грени Смит), использованных при получении гибридных форм, выявил три аллеля длиной 198, 202, 214 п. н. по ДНК-маркеру, разработанному для гена *Md-Exp7*. SSR-маркер для гена *Md-PG1* амплифицировал три аллеля (289, 292, 298 п. н.) в геноме родительских сортов. Генотипирование гибридных форм яблони позволило обнаружить образцы, содержащие сочетание приоритетных аллелей генов *Md-Exp7*, *Md-PG1* и *Md-ACS1*. В качестве доноров ценных аллелей отобрано 46 образцов, несущих комбинацию *Md-Exp7* (202:202) + *Md-ACS1* (2/2). Среди изученных гибридов обнаружен 21 образец, содержащий аллели генов *Md-PG1* (292:292) и *Md-ACS1* (2/2). Образцы с различным сочетанием селекционно ценных аллелей генов *Md-Exp7*, *Md-PG1*, *Md-ACS1* и *Rvi6* рекомендуются для создания сортов с высоким уровнем лежкоспособности плодов и устойчивостью к парше.
Ключевые слова: яблоня; селекция; маркер-опосредованный отбор; качество плодов; устойчивость к парше; *Md-Exp7*; *Md-PG1*; *Md-ACS1*; *Rvi6*; комплексные доноры; пирамидирование генов.

Для цитирования: Супрун И.И., Токмаков С.В., Аль-Накиб Е.А., Лободина Е.В. Идентификация аллелей генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* в селекционных формах яблони, устойчивых к парше. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7):645-651. DOI 10.18699/VJGB-22-79

Identification of apple genes *Md-Exp7* and *Md-PG1* alleles in advanced selections resistant to scab

I.I. Suprun , S.V. Tokmakov, E.A. Al-Nakib, E.V. Lobodina

North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-Making, the Functional Scientific Center of "Breeding and Nursery",
Krasnodar, Russia
 supruni@mail.ru

Abstract. The creation of apple varieties with a high level of flesh firmness and long shelf life is one of the important goals in breeding. Among the genes controlling these traits, the role of the endogenous ethylene biosynthesis control gene, *Md-ACS1*, the expansin gene, *Md-Exp7*, and the polygalacturonase gene, *Md-PG1*, has been established. The use of DNA marker analysis to solve problems in breeding for fruit quality traits allows one not only to track several target genes simultaneously, but also to cull plants with undesirable alleles at the early stages of development. In order to select complex donors of breeding traits, molecular genetic identification of the genes that determine the quality traits of apple fruits *Md-Exp7* and *Md-PG1* was performed in 256 breeding selections carrying the scab resistance gene *Rvi6* and valuable allelic variants of the *Md-ACS1* gene, which determines the endogenous synthesis of ethylene in fruits: 90 samples with the *Md-ACS1* allele (2/2) and 166 samples with *Md-ACS1* (1/2). As a result of the study, an allelic combination for the *Md-Exp7* and *Md-PG1* genes was established. Analysis of the parental cultivars (Renet Simirenko, Modi, Smeralda, Renoir, Fulzhion and Granny Smith) used to obtain hybrid selections revealed three alleles 198, 202, 214 bp according to the DNA marker of the *Md-Exp7* gene. The SSR marker for the *Md-PG1* gene amplified three alleles (289, 292, 298 bp) on the abovementioned cultivars. Within the 256 breeding selections samples that have the most priority for breeding alleles of the desired genes in combination with the *Rvi6* gene and/or with selection-priority allelic variants of the *Md-ACS1* gene were identified. Of the most valuable for breeding, 46 accessions carrying the combi-

nation *Md-Exp7* (202:202) + *Md-ACS1* (2/2) were distinguished. Hybrids with alleles *Md-PG1* (292:292) + *Md-ACS1* (2/2) are also most valuable for use in breeding and as donors of selection-valuable alleles; 21 samples were identified. Accessions with a complex of breeding-valuable target alleles are valuable complex donors, as well as valuable breeding material for creating varieties with improved fruit quality characteristics and scab resistance.

Key words: apple; breeding; marker-assisted selection; fruit quality; scab resistance; *Md-Exp7*; *Md-PG1*; *Md-ACS1*; *Rvi6*; complex donors; gene pyramiding.

For citation: Suprun I.I., Tokmakov S.V., Al-Nakib E.A., Lobodina E.V. Identification of apple genes *Md-Exp7* and *Md-PG1* alleles in advanced selections resistant to scab. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):645-651. DOI 10.18699/VJGB-22-79

Введение

К одним из наиболее важных признаков качества плодов у яблони можно отнести плотность мякоти и ее поддержание при хранении плодов. Данный признак не только формирует потребительскую привлекательность, но и обеспечивает повышение экономической эффективности отрасли за счет улучшения лежкоспособности плодов и их транспортабельности. В связи с этим создание сортов, обладающих плотной текстурой мякоти и сохранением таковой при хранении, является важным направлением в селекции. Изменение структуры мякоти плода при созревании и последующем хранении регулируется различными физиолого-биохимическими процессами. Среди них важную роль играет процесс эндогенного синтеза этилена, повышение интенсивности которого ведет к размягчению мякоти, в том числе за счет активации разных ферментативных систем, влияющих на плотность клеточной стенки (Ji, Wang, 2021).

Среди генов контроля биосинтеза эндогенного этилена у яблони одними из ключевых являются гены *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, кодирующие ферменты 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтазу (АЦК-синтаза-1) и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат оксидазу (АЦК-оксидаза-1), которые последовательно, в цепи реакций преобразуют S-аденозил-метионин в этилен (Dong et al., 1991, 1992; Kende, 1993). Данные гены яблони картированы, установлено влияние аллельных вариантов генов на уровень синтеза эндогенного этилена в плодах и, соответственно, на лежкоспособность плодов, а также разработаны эффективные ДНК-маркеры для идентификации аллелей (Sunako et al., 1999; Oraguzie et al., 2004; Costa et al., 2005). С использованием этих маркеров в мире проведена оценка аллельных комбинаций в селекционном материале и коллекционных образцах яблони (Oraguzie et al., 2007; Zhu, Barritt, 2008; Nybom et al., 2012; Супрун, Токмаков, 2013; Савельев и др., 2014б; Лыжин, Савельева, 2020; Шамшин и др., 2020). Также выявлено влияние гена *Md-ACS3a* на синтез эндогенного этилена в плодах (Bai et al., 2012). Однако вклад этого гена в формирование данного признака ниже, нежели у *Md-ACS1* (Dougherty et al., 2016).

Наряду с вышеуказанными генами, в контроле физиолого-биохимических процессов, связанных с формированием структуры мякоти и сохранением ее плотности в процессе хранения у яблони, участвуют ген экспансина – *Md-Exp7* и ген полигалактуроназы – *Md-PG1*. Экспансин – белок, участвующий в ферментативной перестройке клеточных стенок за счет разрыва нековалентных связей между гемицеллюлозной матрицей и микрофибриллами целлюлозы, что повышает восприимчивость этого структурного полимера к действию других ферментов

(Cosgrove, 2000). Активность этилензависимого фермента полигалактуроназы способствует разрушению структуры клеточного полимера пектина путем биохимического катализа гидролитического расщепления (1–4) галактуронана (Brummell, Harpster, 2001).

В генетических исследованиях генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* были выявлены микросателлитные маркеры, косегрегирующие с ними. Для микросателлитного маркера *Md-Exp7SSR* гена *Md-Exp7*, локализованного в первой группе сцепления, установлено, что увеличение размера продукта амплификации коррелирует с уровнем размягчения мякоти плодов в процессе хранения: для фрагмента 198 п. н. характерен низкий уровень размягчения, для 202 п. н. – средний, а для 214 п. н. – наиболее высокий (Costa et al., 2008). В работе (Nybom et al., 2012) сделан предварительный вывод о возможно более существенном влиянии аллеля с размером продукта амплификации по микросателлитному локусу *Md-Exp7SSR* в 202 п. н. в сравнении с аллелем 198 п. н. (Nybom et al., 2012). Ген полигалактуроназы – *Md-PG1*, картированный на расстоянии 37 сМ от гена *Md-ACO1* в группе сцепления 10, вносит более выраженный вклад в фенотипическое варьирование изменения плотности мякоти при хранении плодов при значениях температуры, близких к комнатной, а не в холодильных камерах в диапазоне температур 2–4 °С (Costa et al., 2010). Это имеет большое значение для сохранения коммерческой привлекательности плодов при транспортировке без соблюдения температурного режима, нахождения их на складах временного хранения торговых комплексов, в логистических центрах. В результате исследований был выявлен ряд ДНК-маркеров, тесно сцепленных с данным геном (Costa et al., 2010), в том числе микросателлитный маркер *Md-PG1*_{10kd}, который является наиболее информативным (Longhi et al., 2013b). Анализ аллельных вариантов данного ДНК-маркера показал, что наличие аллеля с размером фрагмента 298 п. н. нежелательно для селекции сортов с улучшенными показателями сохранения плотности мякоти без специальных условий хранения. При этом гомозиготный вариант по аллелю 298 п. н. наименее перспективен для использования в селекции (Longhi et al., 2013a).

Примечательно, что высокий уровень влияния на фенотипическое проявление признака при температурах, близких к комнатной (Costa et al., 2010), был установлен не только для гена *Md-PG1*, но также для гена *Md-ACS1*. При сопоставлении данных об аллельных вариантах генов *Md-PG1*, *Md-ACS1* и *Md-ACO1* и уровня плотности мякоти плодов у 108 сортов яблони на этапе съемной зрелости и спустя 20 дней хранения (при температуре 20–25 °С) после сбора плодов была установлена взаимосвязь между

аллельными вариантами генов *Md-PG1* и *Md-ACSI* и степени снижения плотности мякоти плодов (Kwon et al., 2020). С использованием ДНК-маркеров генов *Md-PG1* и *Md-Exp7* выполнен ряд работ по идентификации их аллелей, включая культурные сорта и видовые образцы рода *Malus* (Costa et al., 2008; Longhi et al., 2013a, b; Nybom et al., 2013; Савельев и др., 2014a; Шамшин и др., 2018; Савельева, Лыжин, 2019; Должикова и др., 2020), для решения селекционных задач и в рамках изучения аллельного разнообразия этих генов в пределах рода *Malus*. Для генов *Md-PG1* и *Md-ACSI* разработаны также аллель-специфичные SNP-маркеры, интегрированные в состав SNP-чипа (SNP-array) для MAS-селекции – International RosBREED SNP Consortium OpenArray v1.0, позволяющего суммарно проводить детекцию аллелей 11 генов (Chagné et al., 2019).

Очевидно, что наличие ДНК-маркеров к генам, детерминирующим такие хозяйственно ценные признаки, как плотность мякоти и сохранение ее характеристик при хранении, позволяет повысить эффективность селекционного процесса, а также предселекционной работы для более эффективного подбора родительских пар для скрещиваний. Особенно актуален вопрос использования ДНК-маркеров для анализа аллельного состава генов, детерминирующих признаки качества в связи с полигенным контролем данного признака и различным вкладом в фенотипическое проявление признака в зависимости от комбинаций аллелей разных генов: *Md-ACSI*, *Md-ACO1*, *Md-PG1* и *Md-Exp7*. Немаловажным преимуществом маркер-опосредованного отбора является возможность отслеживания одновременно нескольких генов, контролируемых не только одним, а разными признаками, включая устойчивость к патогенам.

В рамках выполненной ранее работы нами с применением ДНК-маркерного анализа был создан широкий перечень селекционных форм яблони, несущих ген устойчивости к парше *Rvi6* в сочетании с различными аллелями гена *Md-ACSI*. Очевидно, что расширение набора приоритетных генов, для которых будут идентифицированы аллели у созданных гибридных форм, позволит отобрать наиболее ценный для селекционной работы материал. В связи с этим в представленном исследовании была поставлена задача провести идентификацию аллелей генов *Md-PG1* и *Md-Exp7* у образцов яблони, несущих ген *Rvi6* и селекционно ценные варианты аллелей гена *Md-ACSI* (1/2, 2/2), для создания сортов, сочетающих комплекс хозяйственно ценных признаков.

Материалы и методы

Объектом исследований послужили 256 отборных гибридных форм яблони из шести комбинаций скрещивания: 1) Ренет Симиренко/Моди (62 шт.); 2) Ренет Симиренко/Смеральда (65 шт.); 3) Ренет Симиренко/Ренуар (33 шт.); 4) Ренет Симиренко/Фуджион (22 шт.); 5) Ренуар/Гренни Смит (9 шт.); 6) Моди/Гренни Смит (65 шт.). Гибриды были получены ранее в рамках программы по маркер-опосредованной селекции, направленной на создание устойчивых к парше яблони сортов, обладающих повышенными характеристиками качества плодов. Для всех изученных образцов ранее с применением ДНК-маркерного анали-

за было установлено наличие гена устойчивости к парше *Rvi6* (Супрун и др., 2018), а также селекционно перспективных аллелей гена *Md-ACSI*, детерминирующего эндогенный синтез этилена в плодах.

Экстракцию ДНК осуществляли методом СТАВ (Muray, Thompson, 1980). Молекулярно-генетическую идентификацию аллелей генов *Md-PG1* и *Md-Exp7* проводили с применением микросателлитных маркеров *Md-PG1_{10kd}* и *Md-Exp7SSR* соответственно (Costa et al., 2008; Longhi et al., 2013b). Анализ выполняли по двум маркерам одновременно в одной реакции ПЦР, которая включала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Таq-полимеразы и 2,5 мМ 10× стандартного ПЦР-буфера. ПЦР программа: 94 °С – 150 с; 32 цикла: 60 °С – 45 с, 72 °С – 60 с, 94 °С – 30 с; 1 цикл 72 °С – 10 мин. Электрофорез продуктов ПЦР проводили на автоматическом генетическом анализаторе «Нанофор-05». Данные анализировали в программе GeneMarker V3.0.1.

Результаты

Отсутствие перекрытия диапазонов размеров амплифицированных фрагментов по целевым ДНК-маркерам (198–214 п. н. для маркера *Md-Exp7SSR* и 289–302 п. н. для *Md-PG1_{10kd}*) позволило применить мультиплексную идентификацию (рис. 1).

При анализе родительских форм, использованных при получении гибридных образцов яблони, обнаружены три фрагмента размером 198, 202 и 214 п. н. по маркеру гена *Md-Exp7*, в то время как по *SSR*-маркеру гена *Md-PG1* были идентифицированы фрагменты длиной 289, 292 и 298 п. н. (табл. 1).

Оценка гибридных растений выявила различные комбинации аллелей по ДНК-маркерам. Поскольку по маркеру *Md-Exp7SSR* у родительских сортов аллель с размером амплифицируемого фрагмента 202 п. н. наиболее распространен (представлен у всех сортов, а у сортов Ренет Симиренко, Смеральда и Ренуар в гомозиготном состоянии), закономерно его наличие у всех гибридных образцов, за исключением 21 гибрида из комбинации 6 (Моди/Гренни Смит), несущего аллельную комбинацию 198:214. При этом аллель 202 п. н. в гомозиготе представлен у 113 образцов. Аллельные комбинации 198:202 и 202:214 обнаружены у 7 и 115 гибридных растений соответственно. Идентификация аллелей маркера гена *Md-PG1* показала, что наиболее распространен аллель с размером продукта 292 п. н., при этом у 65 образцов он присутствовал в гомозиготе. Наряду с аллельным вариантом 292:292 установили наличие аллельных комбинаций 289:292 (7 образцов); 292:298 (129 образцов); 289:298 (38 образцов) и 298:298 (17 образцов).

Обсуждение

Молекулярно-генетический анализ родительских сортов по ДНК-маркерам генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* позволил для некоторых из них впервые идентифицировать аллельные комбинации, а также подтвердить уже имеющуюся научную информацию для сортов Гренни Смит и Моди. Согласно данным (Longhi et al., 2013b), Гренни Смит имеет аллель 292 п. н. в гомозиготе по ДНК-маркеру гена *Md-PG1*. Сорт Моди характеризуется аналогичным ал-

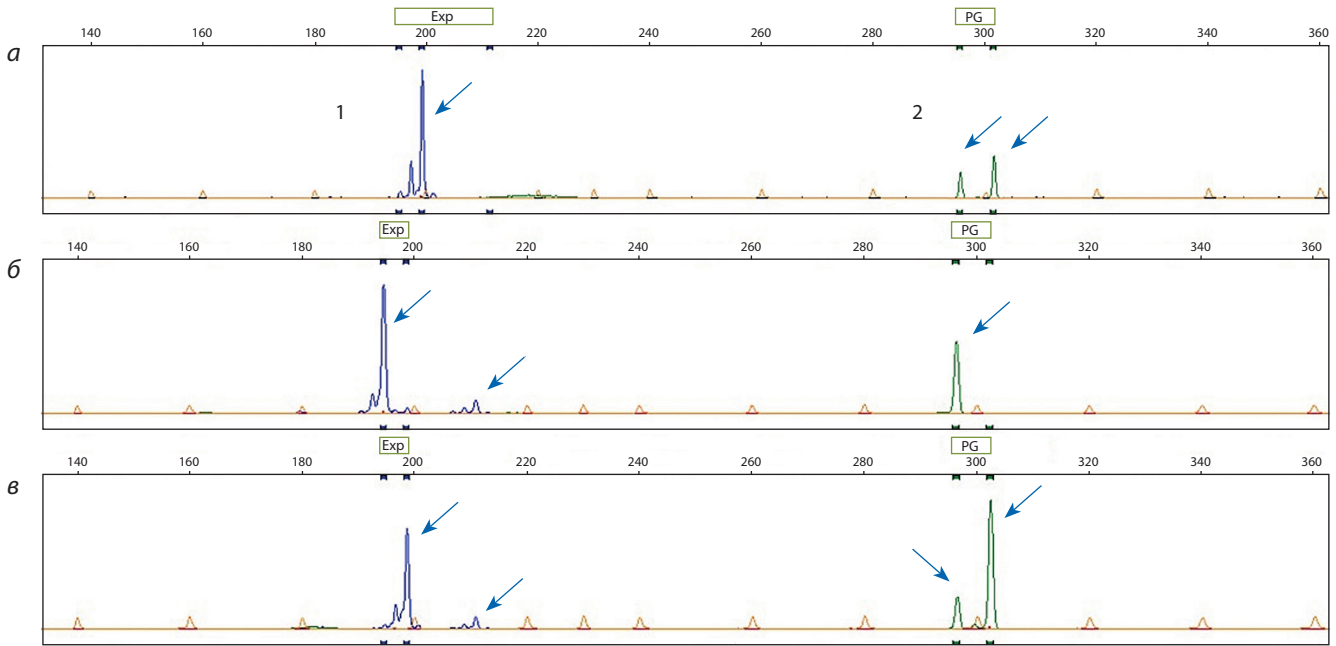


Рис. 1. Мультиплексный фрагментный анализ продуктов амплификации по ДНК-маркерам генов *Md-Exp7* (1) и *Md-PG1* (2).

На электрофореграмме приведены примеры результатов анализа образца, гомозиготного по *Md-Exp7*SSR и гетерозиготного по *Md-PG1*_{10kd} (а); гетерозиготного по *Md-Exp7*SSR и гомозиготного по *Md-PG1*_{10kd} (б) и гетерозиготного одновременно по двум целевым локусам (в).

Таблица 1. Размер фрагментов амплификации ДНК-маркеров для генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* у родительских сортов яблони

Родительский сорт	<i>Md-Exp7</i> SSR		<i>Md-PG1</i> _{10kd}	
Ренет Симиренко	202	202	298	298
Моди	202	214	292	292
Смеральда	202	202	292	292
Ренуар	202	202	289	298
Фуджион	202	214	289	289
Гренни Смит	198	202	292	292

лельным вариантом (Longhi et al., 2013a). По ДНК-маркеру *Md-Exp7*SSR известно о наличии аллельного варианта 198:202 п. н. для сорта Гренни Смит (Costa et al., 2008), что было подтверждено и в нашей работе.

Из сортов, послуживших родительскими формами для получения гибридных растений, к генотипам с наиболее селекционно ценными комбинациями аллельных вариантов одновременно двух генов можно отнести сорта Смеральда и Гренни Смит. По маркеру *Md-PG1*_{10kd} наименее селекционно ценный аллель 298 п. н. выявлен у сортов Ренуар (289:298) и Ренет Симиренко (298:298). При этом по маркеру гена *Md-Exp7* у них идентифицирован аллельный вариант, представляющий ценность для селекции 202:202, что, вероятно, может компенсировать негативное влияние аллельных вариантов по гену *Md-PG1*. В пользу этого говорит тот факт, что сорт Ренет Симиренко, хотя и уступает Гренни Смит по лежкоспособности, проявляет достаточно высокий уровень этого признака. Также для

него характерно резкое снижение плотности мякоти плода при повышении температуры хранения, чего нельзя сказать о сорте Гренни Смит, имеющем самые высокие показатели лежкоспособности плодов (Причко, 2018; Причко и др., 2019). Можно предположить, что таким образом у сорта Ренет Симиренко проявляется негативное влияние аллельного варианта 298:298 по ДНК-маркеру гена *Md-PG1*, поскольку, как сказано выше, данный ген вносит более выраженный вклад в фенотипическое варьирование изменения плотности мякоти при хранении плодов при значениях температуры, близких к комнатной (Costa et al., 2010). В целом наличие информации об аллельных комбинациях ДНК-маркеров целевых генов дает возможность корректировать пары скрещиваний для повышения выхода гибридов с приоритетными аллельными комбинациями.

Рассматривая распределение аллелей по ДНК-маркеру гена *Md-Exp7*, можно отметить гибридные семьи 2 и 3, в которых все образцы имеют гомозиготу по аллелю 202 п. н., что соответствует аллельным вариантам родительских сортов (202:202 у всех родительских форм в этих комбинациях). В гибридной комбинации 5, по которой было проанализировано девять растений, идентифицированы аллельные варианты 198:202 и 202:202, что соответствует аллелям родительских сортов. Малый объем выборки не позволяет достоверно оценить отклонение распределения от ожидаемого 1:1 – (198:202) : (202:202). Специфическое распределение наблюдалось в гибридных семьях 1, 4 и 6. В этих гибридных популяциях преобладают растения, имеющие аллель 214 п. н. (аллельные варианты 202:214 и 198:214) (табл. 2). Однако, учитывая аллели по ДНК-маркеру этого гена у родительских сортов, соотношение растений, несущих аллельный ва-

Таблица 2. Аллельные комбинации ДНК-маркеров генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* в сочетании с аллелями гена *Md-ACS1*

Md-ACS1*	Md-Exp7SSR	Md-PG1 _{10kd}	Кол-во образцов (номер комбинации)				
1/2	198	202	289	292	4 (семья № 5)		
			292	292	1 (№ 6)		
			292	298	2 (№ 5)		
	214	292	292		14 (№ 6)		
			289	292	2 (№ 5)		
	202	202	289	298	13 (№ 3 – 12 образцов, № 4 – 1 образец)		
			292	292	2 (№ 6)		
			292	298	37 (№ 1 – 6 образцов, № 2 – 31 образец)		
			298	298	13 (№ 3)		
			214	289	298	9 (№ 4)	
202	214	292	292	27 (№ 6)			
		292	298	42 (№ 1)			
		292	292	7 (№ 6)			
2/2	198	214	292	292	7 (№ 6)		
			202	202	289	292	1 (№ 5)
					289	298	4 (№ 3)
	292	298	292	298	37 (№ 1 – 3 образца, № 2 – 34 образца)		
			298	298	4 (№ 3)		
	214	289	298	298	12 (№ 4)		
			292	292	14 (№ 6)		
292			298	11 (№ 1)			

* Указаны аллельные варианты гена *Md-ACS1* согласно нумерации, предложенной в (Sunako et al., 1999).

риант 202:214, к растениям с аллелем 202 в гомозиготе (т.е. 202:202) в гибридных комбинациях 1 и 4 должно быть близким к распределению 1:1, а в выборке растений, полученных в комбинации 6, ожидаемым является распределение 1:1:1:1 по аллельным комбинациям 198:202, 198:214, 202:202, 202:214. Очевидно существенное преобладание растений, несущих аллель 214 п.н.

Причиной отклонения в распределении аллельных вариантов является локализация гена *Md-Exp7* и гена устойчивости к парше *Rvi6* в первой хромосоме; при этом дистанция между ними составляет около 9 сМ (Costa et al., 2008). В этом исследовании картирование гена *Md-Exp7*

проводилось на гибридной популяции, полученной в комбинации скрещивания сортов Прима (202:214), *Rvi6rvi6*/Фиеста (202:202), *rvi6/rvi6*, что позволило установить дистанцию между данными генами.

В нашем исследовании в гибридных комбинациях 1, 4 и 6 в качестве донора гена устойчивости к парше использовался сорт Моды, имеющий аллельную комбинацию 202:214 п.н. по ДНК-маркеру *Md-Exp7*SSR. В своей работе мы анализировали растения, несущие доминантный аллель гена *Rvi6*, поэтому можно говорить о закономерности полученного результата и о подтверждении генетической дистанции между генами *Md-Exp7* и *Rvi6*. Суммирование всех растений их трех гибридных комбинаций 1, 4 и 6 показывает, что аллель 214 п.н. представлен у 136 растений из 149, а число растений без него составляет 13 (около 9% от общего количества), что согласуется с генетической дистанцией между генами *Md-Exp7* и *Rvi6*.

Для дополнительной проверки отсутствия ошибочно интерпретируемых результатов мы выполнили молекулярно-генетический анализ по ДНК-маркеру *Md-Exp7*SSR для всех гибридных растений наиболее крупной гибридной семьи 1 (из трех семей, по которым наблюдалось отклонение наблюдаемого распределения аллелей от ожидаемого), независимо от наличия доминантного аллеля гена *Rvi6*. Установили, что 113 из 231 гибридного растения имеют аллельный вариант 202:214, а 118 растений – аллельный вариант 202:202. Таким образом, значимое отклонения от соотношения 1:1 не наблюдается ($\chi^2(1:1) = 0.11$ при $\chi^2_{крит.} = 3.8$).

Распределение аллелей по ДНК-маркеру гена *Md-PG1* соответствует аллельным вариантам у родительских сортов: в комбинациях 1, 2, 4 и 6 гибридное потомство единообразно и имеет аллельные варианты 292:298, 292:298, 289:298 и 292:292 соответственно. В гибридных комбинациях 3 и 5 представлено по два типа аллельных комбинаций, согласующихся с аллельными вариантами родительских сортов.

Рассматривая комбинации аллельных вариантов генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* с аллелями гена *Md-ACS1*, присутствующими в генотипе изучаемых гибридных образцов яблони, можно увидеть преобладание аллельного варианта 202:202 п.н. по ДНК-маркеру гена *Md-Exp7* и 292:298 п.н. по ДНК-маркеру гена *Md-PG1* как в выборке гибридов с аллельным вариантом 1/2, так и в выборке гомозиготных по аллелю 2 гена *Md-ACS1* гибридных образцов яблони (рис. 2).

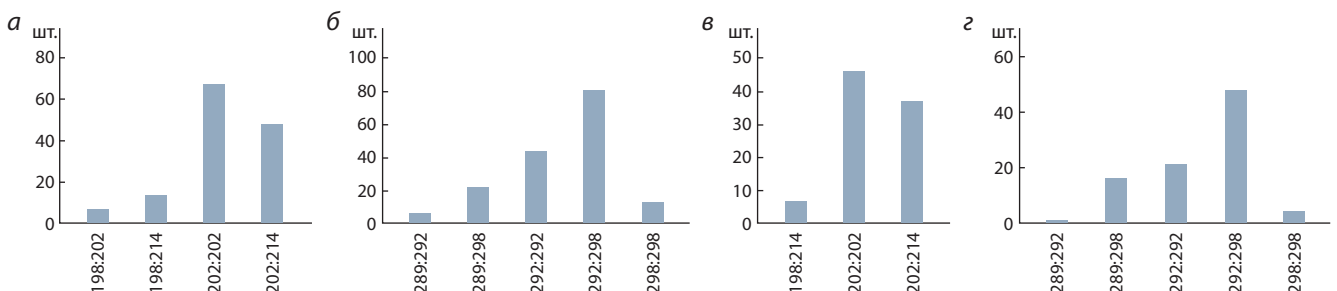


Рис. 2. Соотношение аллельных вариантов генов *Md-Exp7* (а, в) и *Md-PG1* (б, г) у гибридных растений с разными аллельными вариантами гена *Md-ACS1*: 1/2 (а, б) и 2/2 (в, г).

Необходимо также отметить высокую долю растений с аллельным набором 202:214 по ДНК-маркеру гена *Md-Exp7* и 292:292 по ДНК-маркеру гена *Md-PG1*.

Приоритетными для селекции являются образцы, несущие комбинацию *Md-Exp7* (202:202) + *Md-ACSI* (2/2). Идентифицировано 46 таких образцов. Образцы, несущие комбинации аллелей *Md-PG1* (292:292) + *Md-ACSI* (2/2), тоже перспективны для использования в селекции и в качестве доноров селекционно ценных аллелей – идентифицирован 21 образец.

Однако, учитывая тот факт, что гомозиготных образцов по аллели 214 маркера гена *Md-Exp7* не было идентифицировано, а образцов с аллельным вариантом 298:298 (наименее приоритетный для селекции) по ДНК-маркеру гена *Md-PG1* выявлено незначительное количество – 17 образцов из 256 растений, вошедших в изучаемую выборку, можно говорить о наличии широкого перечня селекционных форм, представляющих ценность как для дальнейшей селекции, так и для применения в качестве доноров устойчивости к парше (ген *Rvi6*) и комплекса селекционно важных аллелей одновременно нескольких генов, детерминирующих плотность мякоти, – *Md-Exp7*, *Md-PG1* и *Md-ACSI*. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что среди современных промышленных сортов, активно используемых в мировом садоводстве, варианты аллелей, обуславливающие средний уровень проявления целевого признака, имеют широкое распространение (Costa et al., 2008, 2010; Nybom et al., 2012; Longhi et al., 2013a, b), что, очевидно, обусловлено полигенным контролем признака, при котором присутствие «средних» по селекционной ценности аллелей одновременно по локусам нескольких генов дает желаемый фенотипический эффект.

Заключение

Таким образом, выполненная работа позволила определить группы образцов с различными комбинациями аллелей генов *Md-Exp7* и *Md-PG1* среди гибридных форм, несущих ген устойчивости к парше *Rvi6* и обладающих селекционно ценными аллельными вариантами гена *Md-ACSI*. Выделены доноры с комплексом приоритетных аллелей для дальнейшего использования в селекции с целью создания сортов нового поколения, устойчивых к парше и обладающих высоким уровнем лежкоспособности плодов.

Список литературы / References

Должикова М.А., Пикунова А.В., Толпекина А.А., Седов Е.Н. Аллельное разнообразие гена этилен-зависимой полигалактуроназы *Md-PG1* в новом гибридном генофонде яблони (*Malus* Mill.) ВНИИСПК. В: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: 20-я Всерос. конф. молод. ученых (Москва, 27–29 окт. 2020 г.), сборник тезисов докл. М.: ВНИИСБ, 2020;97-99. DOI 10.48397/ARRIAB.2020.20.056.
[Dolzhikova M.A., Pikunova A.V., Tolpekina A.A., Sedov E.N. Allelic diversity of the gene for ethylene-dependent polygalacturonase *Md-PG1* in the new hybrid gene pool of apple (*Malus* Mill.) VNIISP. In: Biotechnology in Crop Production, Animal Husbandry, and Agricultural Microbiology: Abstracts from the 20th All-Russia Conference of Young Scientists (Moscow, October 27–29, 2020). Moscow: All-Russia Research Institute for Agricultural Biotechnology, 2020;97-99. DOI 10.48397/ARRIAB.2020.20.056. (in Russian)]

Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Молекулярно-генетический анализ гибридных сеянцев яблони по генам *Md-ACSI* и *Md-ACOI* биосинтеза этилена. *Науч. труды СКФНЦСВВ*. 2020;30:9-14. DOI 10.30679/2587-9847-2020-30-9-14.
[Lyzhin A.S., Savelyeva N.N. Molecular analysis of the ethylene biosynthesis genes *Md-ACSI* and *Md-ACOI* in hybrid apple seedlings. *Nauchnyye Trudy SKFNCSVV = Scientific Works of the North Caucasian Federal Center for Horticulture, Viticulture, and Wine Making*. 2020;30:9-14. DOI 10.30679/2587-9847-2020-30-9-14. (in Russian)]
Причко Т.Г. Сроки уборки и режимы хранения яблок с учетом сортовых особенностей. Краснодар: ФГБНУ СКФНЦСВВ, 2018.
[Prichko T.G. Apple Harvesting Terms and Storage Modes Taking into Account Varietal Features. Krasnodar: North Caucasian Federal Center for Horticulture, Viticulture, and Wine Making, 2018. (in Russian)]
Причко Т.Г., Смелик Т.Л., Германова М.Г. Сохранение качественных показателей плодов яблони, обусловленных сортовыми особенностями и составом среды в регулируемой атмосфере. *Науч. труды СКФНЦСВВ*. 2019;23:253-258. DOI 10.30679/2587-9847-2019-23-259-263.
[Prichko T.G., Smelik T.L., Germanova M.G. Preservation of apple fruit quality indicators with regard to varietal features and medium composition in a controlled atmosphere. *Nauchnyye Trudy SKFNCSVV = Scientific Works of the North Caucasian Federal Center for Horticulture, Viticulture, and Wine Making*. 2019;23:253-258. DOI 10.30679/2587-9847-2019-23-259-263. (in Russian)]
Савельев Н.И., Шамшин И.Н., Кудрявцев А.М. Генетический полиморфизм исходных форм яблони по аллелям генов длительной лежкости и качества плодов. *Докл. РАСХН*. 2014а;3:17-20.
[Savel'ev N.I., Shamshin I.N., Kudryavtsev F.M. Apple for the alleles of genes of shelf life and quality of fruits. *Doklady Rossiyskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2014a;3:17-20. (in Russian)]
Савельев Н.И., Шамшин И.Н., Савельева Н.Н., Лыжин А.С. Полиморфизм дикорастущих видов рода *Malus* Mill. по гену (*Md-Exp7*) биосинтеза экспансина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014б;18(4/1):713-717.
[Savel'ev N.I., Shamshin I.N., Savel'eva N.N., Lyzhin A.S. Polymorphism for the *Md-Exp7* gene for expansin biosynthesis in wild species of the genus *Malus* Mill. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014b;18(4/1):713-717. (in Russian)]
Савельева Н.Н., Лыжин А.С. Биосинтез этилена (гены *Md-ACSI* и *Md-ACOI*) и экспансина (ген *Md-Exp7*) в геноплазме сортов и форм яблони селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина. В: Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XVI Междунар. науч. конф. Брянск: Изд-во Брянского ГАУ, 2019;762-766.
[Savelyeva N.N., Lyzhin A.S. Biosynthesis of ethylene (*Md-ACSI* and *Md-ACOI* genes) and expansin (*Md-Exp7* gene) in the genoplasm of apple varieties and forms bred at the Michurin Federal Scientific Center. In: Agroecological Aspects of Sustainable Development of the Agro-industrial Complex: Proceedings of the XVI Int. sci. conf. Bryansk: Bryansk State Agrarian University, 2019;762-766. (in Russian)]
Супрун И.И., Насонов А.И., Лободина Е.В., Володина Е.А. Комплексный подход в создании устойчивых к парше форм яблони: фитопатологическое тестирование и маркер-опосредованный отбор. *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):25-33. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-25-33.
[Suprun I.I., Nasonov A.I., Lobodina E.V., Volodina E.A. An integrated approach to creating scab-resistant apple: phytopathological testing and marker-assisted selection. *Biotechnologiya i Selekcija Rastenij = Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):25-33. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-25-33. (in Russian)]
Супрун И.И., Токмаков С.В. Изучение аллельного разнообразия генов синтеза этилена *Md-ACSI* и *Md-ACOI* в отечественной

- генплазме яблони. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(2):298-302.
- [Suprun I.I., Tokmakov S.V. Allelic diversity of ethylene biosynthesis-related *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genes in the Russian apple germplasm. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2013;6:451-454. DOI 10.1134/S2079059713060105.]
- Шамшин И.Н., Тележинский Д.Д., Шлявас А.В. Оценка сортов яблони Свердловской селекционной станции садоводства по генам биосинтеза этилена с использованием молекулярных маркеров. *Аграр. наука Евро-Северо-Востока*. 2020;21(6):706-712. DOI 10.30766/2072-9081.2020.21.6.706-712.
- [Shamshin I.N., Telezhinsky D.D., Shlyavas A.V. Evaluation of apple varieties of the Sverdlovsk horticultural breeding station according to the ethylene biosynthesis genes using molecular markers. *Agrarnaya Nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science of the Euro-North-East*. 2020;21(6):706-712. DOI 10.30766/2072-9081.2020.21.6.706-712. (in Russian)]
- Шамшин И.Н., Шлявас А.В., Трифонова А.А., Борис К.В., Кудрявцев А.М. Полиморфизм генов биосинтеза этилена и экспансина у местных и стародавних сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) из коллекции генетических ресурсов растений ВИР. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(6):660-666. DOI 10.18699/VJ18.408.
- [Shamshin I.N., Shlyavas A.V., Trifonova A.A., Boris K.V., Kudryavtsev A.M. Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(6):660-666. DOI 10.18699/VJ18.408.]
- Bai S., Wang A., Igarashi M., Kon T., Fukasawa-Akada T., Li T., Harada T., Hatsuyama Y. Distribution of *MdACS3* null alleles in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and its relevance to the fruit ripening characters. *Breed. Sci.* 2012;62(1):46-52. DOI 10.1270/jsbbs.62.46.
- Brummell D.A., Harpster M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 2001;47(1-2):311-340. DOI 10.1023/A:1010656104304.
- Chagné D., Vanderzande S., Kirk C., Proffitt N., Weskett R., Gardiner S.E., Peace C.P., Volz R.K., Bassil N.V. Validation of SNP markers for fruit quality and disease resistance loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) using the OpenArray® platform. *Hort. Res.* 2019; 6:30. DOI 10.1038/s41438-018-0114-2.
- Cosgrove D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 2000;407(6802):321-326. DOI 10.1038/35030000.
- Costa F., Peace C.P., Stella S., Serra S., Musacchi S., Bazzani M., Sansavini S., Van de Weg W.E. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *J. Exp. Bot.* 2010;61(11):3029-3039. DOI 10.1093/jxb/erq130.
- Costa F., Sara S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinell M., Dal-livina J., Koller B., Sansavini S. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica*. 2005;141:181-190. DOI 10.1007/s10681-005-6805-4.
- Costa F., Van de Weg W.E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S., Sansavini S. 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*). *Tree Genet. Genomes*. 2008;4:575-586. DOI 10.1007/s11295-008-0133-5.
- Dong J.G., Kim W.T., Yip W.K., Thompson G.A., Li L., Bennett A.B., Yang S.F. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta*. 1991;185(1):38-45. DOI 10.1007/BF00194512.
- Dong J.G., Olson D., Silverstone A., Yang S.F. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit. *Plant Physiol.* 1992;98(4):1530-1531. DOI 10.1104/pp.98.4.1530.
- Dougherty L., Zhu Y., Xu K. Assessing the allelotypic effect of two aminocyclopropane carboxylic acid synthase-encoding genes *MdACS1* and *MdACS3a* on fruit ethylene production and softening in *Malus*. *Hort. Res.* 2016;3:16024. DOI 10.1038/hortres.2016.24.
- Ji Y., Wang A. Recent advances in phytohormone regulation of apple-fruit ripening. *Plants*. 2021;10(10):2061. DOI 10.3390/plants10102061.
- Kende H. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1993;44(1):283-307. DOI 10.1146/annurev.pp.44.060193.001435.
- Kwon Y.S., Kwon S.I., Kim J.H., Park M.Y., Park J.T., Kim S.A. Validation assay of *Md-ACS1*, *Md-ACO1*, and *Md-PG1* molecular markers associated with storability in apples. *Korean J. Breed. Sci.* 2020;52(4):322-331. DOI 10.9787/KJBS.2020.52.4.322.
- Longhi S., Cappellin L., Guerra W., Costa F. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) *Mol. Breed.* 2013a;32: 841-852. DOI 10.1007/s11032-013-9912-2.
- Longhi S., Hamblin M.T., Trainotti L., Peace C.P., Velasco R., Costa F. A candidate gene based approach validates *MdPG1* as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *BMC Plant Biol.* 2013b;13:37. DOI 10.1186/1471-2229-13-37.
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4325.
- Nybohm H., Ahmadi-Afzadi M., Garkava-Gustavsson L., Sehic J. Selection for improved fruit texture and storability in apple. *Acta Hort.* 2012;934:849-854. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.934.112.
- Nybohm H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J., Hertog M. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm. *Tree Genet. Genomes*. 2013;9:279-290. DOI 10.1007/s11295-012-0554-z.
- Oraguzie N.C., Iwanami H., Soejima J., Harada T., Hall A. Inheritance of the *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;108(8):1526-1533. DOI 10.1105/tpc.17.00349.
- Oraguzie N.C., Volz R.K., Whitworth C.J., Bassett H.C.M., Hall A.J., Gardiner S. Influence of *Md-ACS1* allelotype and harvest season within an apple germplasm collection on fruit softening during cold air storage. *Postharvest Biol. Technol.* 2007;44(3):212-219. DOI 10.1016/j.postharvbio.2006.12.013.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 1999;119(4):1297-304. DOI 10.1104/pp.119.4.1297.
- Zhu Y., Barritt B.H. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genet. Genomes*. 2008;4:555-562. DOI 10.1007/s11295-007-0131-z.

ORCID ID

I.I. Suprun orcid.org/0000-0003-0355-8395
S.V. Tokmakov orcid.org/0000-0002-2092-7757
E.V. Lobodina orcid.org/0000-0002-3580-2316

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России «Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий» по соглашению № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.06.2022. После доработки 30.08.2022. Принята к публикации 01.09.2022.