

УДК 575.111:634.11

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОВ СИНТЕЗА ЭТИЛЕНА *Md-ACS1* И *Md-ACO1* В ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГЕНПЛАЗМЕ ЯБЛОНИ

© 2013 г. И.И. Супрун, С.В. Токмаков

Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар, Россия,
e-mail: supruni@mail.ru

Поступила в редакцию 1 марта 2013 г. Принята к публикации 1 апреля 2013 г.

В статье приведены результаты изучения аллельного разнообразия генов синтеза этилена *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в отечественной генплазме яблони с применением ДНК-маркерного анализа. Идентифицированы аллельные комбинации данных генов у 48 сортов яблони отечественной селекции. Выявлено, что уровень распространения аллельных комбинаций, обуславливающих высокую степень лежкости плодов, в отечественной генплазме соответствует частоте их встречаемости в мировом генофонде культуры. С учетом полученных данных начата программа по созданию селекционных форм яблони, несущих сочетание аллелей *Md-ACS1-2/2* + *Md-ACO1-1/1*, с применением ДНК-маркерного отбора для селекции сортов, обладающих наиболее высокой степенью лежкости плодов.

Ключевые слова: яблоня, ДНК-маркерный анализ, маркер-вспомогательная селекция, аллельное разнообразие, гены синтеза этилена *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, лежкость плодов.

ВВЕДЕНИЕ

Качество и конкурентоспособность плодовой продукции напрямую зависят от ее внешнего вида, который в значительной степени обуславливается способностью плодов к хранению, т. е. лежкостью. В связи с этим создание новых конкурентоспособных сортов с лежкими плодами является важнейшим направлением в современной селекции яблони.

В отличие от состава зерновых культур и орехов большая доля массы яблок приходится на содержащуюся в них воду, которая позволяет сохранять высокую физиологическую активность фруктов. Метаболические процессы в плодах протекают и после созревания, и после сбора урожая, и при хранении (Tucker, 1993).

Яблоки относят к скоропортящимся фруктам, созревание которых сопряжено с газообменными процессами и различным уровнем выделения этилена в плодах. По длительности хранения сорта различаются: некоторые сорта требуют немедленного помещения в камеры после сбора, так как особенно быстро теряют свои товарные

качества, в то время как другие способны к длительному хранению без особых условий.

Сбор урожая на стадиях до полного созревания, молочной спелости и хранения в контролируемых условиях позволяет продлевать сроки хранения яблок. Хотя яблоки и могут храниться в контролируемых условиях дольше других фруктов, способность к хранению у сортов различна. Так, яблоки сорта **Golden Delicious** способны храниться при 2 °С 4 месяца, а в регулируемой среде (РС) – 8 месяцев, **Granny Smith** – при 0 °С – 4, а в РС – 7 месяцев, **Jonathan** – при 4 °С – 3, а в РС – 5 месяцев (Mercantila ..., 1989). Генотипы яблони, проявляющие способность к длительному хранению, активно используются в селекционных программах для создания новых конкурентоспособных сортов. Знание генетической основы данного признака в создаваемом селекционном материале позволит получить сорта с высоким качеством плодовой продукции.

Этилен является ключевым регулирующим созревание яблок фактором, и подавление биосинтеза этилена и его действия является основным механизмом продления сроков хра-

нения в контролируемых условиях. Показано, что биосинтез этилена в плодах яблони различных сортов варьирует в больших пределах и установлено влияние этого варьирования на лежкость плодов.

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) (Dong *et al.*, 1991, 1992).

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 CO₂ (Adams, Yang, 1979; Kende, 1993). Данные ферменты кодируются серией генов *Md-ACS* и *Md-ACO*, экспрессирующихся в разных тканях и на разных этапах созревания плодов (Sunako *et al.*, 1999; Wiersma *et al.*, 2007).

Гены *Md-ACS1* и *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 (Zhu, Barritt, 2008). 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*), характерны средний и пониженный уровни 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. Например, плоды сорта яблони Fuji, несущего аллельный набор по генам *Md-ACS1-2/2* и *Md-ACO1-1/1*, сохраняют структуру и плотность без существенных изменений в течение 8 мес. хранения при температуре 2–4 °С (Fan *et al.*, 1999).

Аллельные различия гена *Md-ACS1* обусловлены инсерцией фрагмента ретротранспо-

зона длиной 166 пар оснований в промоторной области гена, приводящей к снижению уровня экспрессии гена (Sunako *et al.*, 1999). Для гена *Md-ACO1* аллельные различия обусловлены наличием InDel (Insertion/Deletion) сайта в третьем интроне с размером инсерции в 62 пары оснований, вероятно, приводящей к низкому уровню транскрипции данного гена (Costa *et al.*, 2005). На основании указанного структурного полиморфизма для генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* созданы эффективные ДНК-маркеры, позволяющие 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 задачи наших исследований входили оценка аллельного разнообразия генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* и идентификация их аллельного набора у сортов яблони отечественной селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили 48 сортов яблони отечественной селекции.

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода ЦТАБ (Murphy, Thompson, 1980). 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. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей программе: 2 мин при 94 °С; следующие 35 циклов: 45 с при 94 °С, 45 с при 58 °С для *Md-ACS1* и 65 °С для *Md-ACO1*, 2 мин синтез при 72 °С; финальный цикл синтеза 5 мин при 72 °С.

Для электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов использовали 2%-й агарозный гель на основе трис-боратного буфера.

Праймеры для амплификации целевых фрагментов гена *Md-ACS1* были взяты в соответствии с данными, представленными в работе Narada с соавт. (2000), и для гена *Md-ACO1* в соответствии с данными, представленными в

работе Costa с соавт. (2005). Размер целевых амплифицируемых фрагментов для изучаемых генов следующий: аллель *ACSI-1* – 489 пар оснований, аллель *ACSI-2* – 655 пар оснований; аллели *ACO1-1* и *ACO1-2* – 525 и 587 пар оснований соответственно.

В качестве сортов-стандартов использовали сорта яблони зарубежной селекции Fuji, GoldRush и Granny Smith, для которых идентифицирован аллельный набор по целевым генам: Fuji (*Md-ACSI-2/2*, *Md-ACO1-1/1*), GoldRush (*Md-ACSI-2/2*, *Md-ACO1-1/2*) и Granny Smith (*Md-ACSI-1/2*, *Md-ACO1-1/2*) (Zhu, Barritt, 2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование в ходе исследований сортов-стандартов, несущих различные аллельные комбинации генов *Md-ACSI* и *Md-ACO1*, дало возможность максимально четко интерпретировать полученные результаты. При этом как для сортов-стандартов, так и для изученных сортов отечественной селекции не возникало затруднений при идентификации аллельного набора искомым генов. На рис. 1, 2 продемонстрированы результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР ряда сортов отечественной селекции.

При анализе отечественных сортов яблони по локусу *Md-ACSI* были идентифицированы все три аллельных варианта: гетерозиготные образцы, а также образцы, гомозиготные как по первому, так и по второму аллелям. Так, из сортов, результаты анализа которых представлены на рис. 1, сорта Тайна, Нокторн и Талисман гете-

розиготны, в то время как сорта Зефир и Талида гомозиготны по *Md-ACSI-1*, а сорт Любава – по аллелю *Md-ACSI-2*. Всего в изученной выборке сортов было выявлено 19 образцов, гетерозиготных по данному локусу, 17 и 8 сортов гомозиготны по аллелям 1 и 2 соответственно.

В то же время анализ аллельного полиморфизма гена *Md-ACO1* выявил, что все изученные сорта несут оба аллеля данного гена, т. е. гетерозиготны по данному локусу. В табл. представлены обобщенные результаты анализа аллельного полиморфизма целевых генов у отечественных сортов яблони.

В соответствии с полученными данными все сорта, несущие аллельный вариант 2/2 по гену *Md-ACSI*, обуславливающий низкий уровень синтеза этилена, имеют зимний, осенний и позднеосенний срок созревания и обладают высокой степенью лежкости плодов при хранении. Сорта, гетерозиготные по данному локусу, относятся к различным группам по срокам созревания (летние, позднелетние, осенние, зимние). Полученная информация согласуется с мировыми научными данными об уровне синтеза этилена, степени лежкости плодов и сроках созревания сортов с различными аллельными вариантами данного гена (Harada *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2005; Zhu, Barritt, 2008).

Сопоставление результатов исследования с данными, полученными при исследовании генофонда яблони из других регионов мира, показывает их соответствие выявленному уровню распространения аллельных вариантов изученных генов. Для гена *Md-ACO1* наиболее распространенными комбинациями аллелей являются комбинации 1/2 и 2/2 с преимущест-

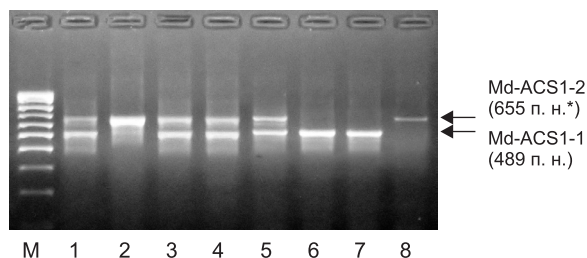


Рис. 1. ПЦР-идентификация аллелей гена *Md-ACSI*.

М – маркер молекулярной массы ДНК, 1–8 сорта яблони: 1 – Granny Smith; 2 – Fuji; 3 – Тайна; 4 – Нокторн; 5 – Талисман; 6 – Зефир; 7 – Талида; 8 – Любава.

* п.н. – пар нуклеотидов.

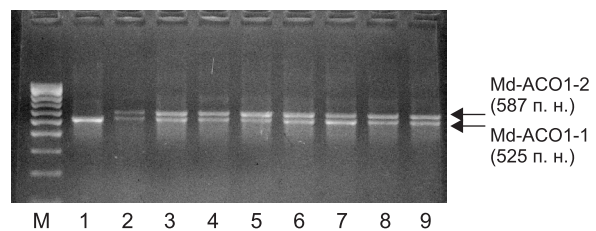


Рис. 2. ПЦР-идентификация аллелей гена *Md-ACO1*.

М – маркер молекулярной массы ДНК, 1–8 сорта яблони: 1 – Fuji; 2 – Granny Smith; 3 – Тайна; 4 – Нокторн; 5 – Талисман; 6 – Зефир; 7 – Талида; 8 – Любава; 9 – Фея.

Таблица

Аллельные комбинации генов *Md-ACSI* и *Md-ACO1* у российских сортов яблони

Сорт	<i>Md-ACSI</i>	<i>Md-ACO1</i>	Сорт	<i>Md-ACSI</i>	<i>Md-ACO1</i>
Granny Smith	1/2	1/2	Ноктюрн	1/2	1/2
Fuji	2/2	1/1	Ночка	1/2	1/2
GoldRush	2/2	1/2	Орловское полесье	1/2	1/2
12/1-21-69	1/1	1/2	Персиковое	1/2	1/2
Бархат осени	1/1	1/2	Ренет Кубани	1/2	1/2
Зефир	1/1	1/2	Ренет Симиренко	1/2	1/2
Кальвиль снежный	1/1	1/2	Союз	1/2	1/2
Курнаковское	1/1	1/2	Старт	1/2	1/2
Либерти	1/1	1/2	Тайна	1/2	1/2
Марго	1/1	1/2	Талисман	1/2	1/2
Орловский пионер	1/1	1/2	Фея	1/2	1/2
Орфей	1/1	1/2	Фламенко	1/2	1/2
Память есаулу	1/1	1/2	Флорина	1/2	1/2
Первинка	1/1	1/2	Апорт Ас	2/2	1/2
Рассвет	1/1	1/2	Болотовское	2/2	1/2
Слава победителям	1/1	1/2	Василиса	2/2	1/2
Солнышко	1/1	1/2	Екатеринодарское	2/2	1/2
Талида	1/1	1/2	Зори Кубани	2/2	1/2
Юбилей Москвы	1/1	1/2	Клео	2/2	1/2
Юбиляр	1/1	1/2	Любава	2/2	1/2
Альпинист румяный	1/2	1/2	Щит	2/2	1/2
Афродита	1/2	1/2	Веняминовское*		1/2
Визит	1/2	1/2	Родничок*		1/2
Золотая корона	1/2	1/2	Свежесть*		1/2
Золотое летнее	1/2	1/2	Строевское*		1/2
Кубанское багряное	1/2	1/2			

* Анализ был выполнен только по локусу *Md-ACO1*.

вом 1/2. Сочетание гомозиготности по аллелю 2 гена *Md-ACSI* (*Md-ACSI-2/2*) в комбинации с гомозиготностью по аллелю 1 гена *Md-ACO1* (*Md-ACO1-1/1*) является редким в мировом генофонде. Наиболее известный сорт, имеющий данный набор аллелей, – сорт японской селекции Fuji – обладает очень продолжительным периодом хранения плодов без потери потребительских качеств (Oraguzie *et al.*, 2004; Zhu, Barritt, 2008; Nybom *et al.*, 2013).

Анализ результатов, полученных нами в ходе выполнения работы, свидетельствует о том, что сочетание аллелей *Md-ACSI* 2/2 + *Md-ACO1* 1/1, обуславливающее наиболее низкий уровень синтеза этилена в созревших плодах, не встре-

чается ни у одного из изученных российских сортов яблони.

С учетом полученных данных в СКЗНИИСиВ приступили к реализации селекционной программы по созданию форм яблони, несущих сочетание аллелей *Md-ACSI* 2/2 + *Md-ACO1* 1/1 с применением ДНК-маркерного отбора. Это даст возможность в дальнейшем получить сорта, обладающие высокой степенью лежкости плодов, что позволит значительно повысить их конкурентоспособность на мировом рынке.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 12-04-31947 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

- Adams D.O., Yang S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 170–174.
- Costa F., Sara S., Van de Weg W.E. *et al.* Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) // Euphytica. 2005. V. 141. P. 181–190.
- Dong J.G., Kim W.T., Yip W.K. *et al.* Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit // Planta. 1991. V. 185. P. 38–45.
- 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. V. 98. P. 1530–1531.
- Fan X., Blankenship S.M., Mattheis J.P. 1-methylcyclopropane inhibits apple ripening // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1999. V. 124. P. 690–695.
- Harada T., Sunako T., Wakasa Y. *et al.* An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 742–746.
- Kende H. Ethylene biosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. V. 44. P. 283–307.
- Mercantila F. Guide to Food Transport: Fruit and Vegetables. Copenhagen: Mercantila Publishers, 1989. 247 p.
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 10. P. 4321–4325.
- Nybom 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 Genetics and Genomes. 2013. V. 9. P. 279–290.
- Oraguzie N.C., Iwanami H., Soejima J. *et al.* A. Inheritance of *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. P. 1526–1533.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M. *et al.* 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. V. 119. P. 1297–1304.
- Tucker G.A. Introduction // Biochemistry of Fruit Ripening / Eds G.B. Seymour, J.E. Taylor, G.A. Tucker. London: Chapman and Hall, 1993. P. 3–51.
- Wiersma P.A., Zhang H., Lu C. *et al.* Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of «Sunrise» and «Golden Delicious» apple fruit // Postharvest Biol. Technol. 2007. V. 44. No. 3. P. 204–211.
- Zhu Y., Barrit B.H. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection // Tree Genetics and Genomes. 2008. V. 4. P. 555–562.

ALLELIC DIVERSITY OF ETHYLENE BIOSYNTHESIS-RELATED *Md-ACS1* AND *Md-ACO1* GENES IN RUSSIAN APPLE GERMPLASM

I.I. Suprun, S.V. Tokmakov

North-Caucasian Zonal Research and Development Institute of Horticulture and Viticulture,
Krasnodar, Russia, e-mail: supruni@mail.ru

Summary

The allelic diversity of the *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genes, involved in ethylene biosynthesis, was studied by DNA marker analysis of 48 apple varieties bred in Russia. Different allelic combinations of these genes were identified. We found that the prevalence of the allelic combinations associated with long shelf life of apple fruit in the Russian germplasm corresponded to the occurrence of these alleles in the worldwide gene pool. With regard to these data, a marker-assisted breeding program was launched to develop forms carrying the *Md-ACS1-2/2* + *Md-ACO1-1/1* allele combination for long fruit shelf life.

Key words: apple, DNA marker analysis, marker-assisted selection, allelic diversity, ethylene biosynthesis genes, *Md-ACS1*, *Md-ACO1*, fruit storability.