

УДК [634.11+634.13]:575.2

ПОЛИМОРФИЗМ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ РОДА *MALUS* MILL. ПО ГЕНУ (*MD-Exp-7*) БИОСИНТЕЗА ЭКСПАНСИНА

© 2014 г. Н.И. Савельев¹, И.Н. Шамшин², Н.Н. Савельева¹, А.С. Лыжин¹

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина, Мичуринск, Россия,
e-mail: cglm@ Rambler.ru;

² Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия,
e-mail: Ivan_Shamshin@mail.ru

Поступила в редакцию 23 октября 2014 г. Принята к публикации 7 октября 2014 г.

На основании молекулярно-генетического анализа среди диких видов рода *Malus* выявлен полиморфизм гена *MD-Exp7*, контролирующего биосинтез экспансина. Всего идентифицировано 8 аллельных форм гена, 4 из которых являются уникальными. Отмечены закономерности распределения аллелей у 37 генотипов согласно их систематическому положению. Выявлено значительное разнообразие данного признака как между секциями рода, так и между представителями внутри одной секции. Идентифицированы различные варианты гена среди представителей одного вида.

Ключевые слова: дикие виды яблони, ПЦР-анализ, аллельное разнообразие, ген *MD-Exp7*, лежкость плодов.

ВВЕДЕНИЕ

Род яблони *Malus* Mill. является наиболее важным для народного хозяйства. Яблоня имеет широкое распространение в различных эколого-географических условиях. При этом ее дикорастущие формы и виды обладают многими ценными хозяйственно-биологическими признаками, прежде всего меньшей требовательностью к условиям произрастания и более высокой адаптивностью по сравнению с другими плодовыми культурами. Однако они недостаточно широко используются в селекции ввиду их слабой генетической изученности (Пономаренко, 2013). Развитие методов современной генетики требует постоянного переосмысления применяемых подходов и совершенствования технологий анализа биологического материала. Поэтому одной из наиболее важных и перспективных задач в области селекции яблони является изучение молекулярно-генетических компонентов, ответственных за ключевые факторы отбора и позволяющих понять механизм функциони-

рования целевых генов и их распространение внутри рода.

Одним из таких факторов является срок хранения плодов яблони. Данный механизм имеет сложную генетическую структуру, которая контролируется комплексом генов, ответственных за различные биохимические реакции. К ним относится и биосинтез экспансина – белка, регулирующего твердость мякоти плодов. Экспансин участвует в нарушении нековалентных связей между матрицей гемицеллюлозы и целлюлозы микрофибрилл. Тем самым он способствует воздействию ферментов на клеточную стенку и подвергает ее разрушению (Шарова, 2007). Для гена *MD-Exp7*, вовлеченного в биосинтез экспансина у яблони, был разработан микросателлитный маркер *MD-Exp7^{SSR}*, который позволяет идентифицировать его аллельные состояния (Costa *et al.*, 2008).

Целью данной работы было изучение генетического полиморфизма дикорастущих видов и разновидностей рода *Malus* по аллелям гена биосинтеза экспансина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологических объектов исследования использованы видовые формы и разновидности яблони из коллекции ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина. Цифровым индексом обозначены образцы одного вида, взятые из различных регионов распространения. Номер соответствует каталожному номеру ВНИИР им. Н.И. Вавилова.

Экстракция ДНК была проведена из части листовой пластинки каждого растения. Для выделения использовали метод, предложенный Д. Пучоа и адаптированный для работы с растениями с высоким содержанием полифенольных соединений (Puchoa, 2004).

Аmplификацию проводили в приборе T1000 производства фирмы BIO-RAD. Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2,5 мМ 10× стандартного ПЦР-буфера. Все компоненты производства компании Fermentas. Для идентификации использовали следующую последовательность праймерных пар: MD-Exp7^{SSR} For 5'catagaaggtggcatgagca3', MD-Exp7^{SSR} Rev 5'tttctctcacaccsaacc3', синтезированных ЗАО «Синтол» (Москва).

ПЦР-реакция была проведена по следующей программе: 94 °С – 120 с, 35 циклов: 52 °С – 45 с, 72 °С – 120 с, 94 °С – 30 с; 1 цикл 52 °С – 45 с, 72 °С – 10 мин (Costa *et al.*, 2008).

Разделение продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 6 %-м секвенирующем полиакриламидном геле (ПААГ) в камере для вертикального электрофореза Sequi-gen GT system (BIO-RAD). Электрофорез проводили в 1× TBE-буфере при следующих условиях: 500 В, 1100 мА, 110 Вт, 50–55 °С. Время проведения – 2 ч. Проявляли гель, используя метод окрашивания нитратом серебра (Benbouza *et al.*, 2006). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 10bp DNA ladder (Invitrogen) (0,05 г/л).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного молекулярного анализа были получены электрофоретические

спектры для 37 видов и разновидностей дикорастущих видов яблони (рис.).

Анализируемые генотипы содержат различные комбинации аллелей гена MD-Exp7. Для удобства работы аллели обозначали латинскими буквами с цифровым индексом. У диких видов яблони идентифицированы аллельные варианты гена, размер которых: A1 (198 п.н.), B1 (201 п.н.), C1 (202 п.н.), D1 (204 п.н.), E1 (210 п.н.), F1 (214 п.н.), G1 (220 п.н.), H1 (226 п.н.), I1 (230 п.н.) (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген MD-Exp7, контролирующий биосинтез экспансина, расположен на первой хромосоме яблони. Ряд исследований подтверждают его роль в процессе хранения плодов (McQueen-Mason, Cosgrove, 1994; Шарова, 2007). Кроме того, авторы в своих работах находят зависимость твердости плода от аллельного варианта гена (Costa *et al.*, 2008, Nybom *et al.*, 2012). Однако все исследования ранее были сконцентрированы только на сортах. В проведенной нами работе рассмотрен полиморфизм данного гена у дикорастущих видов яблони, что позволяет оценить их потенциал для использования в маркер-опосредованной селекции.

Изучаемые виды, согласно классификации, предложенной Лангенфельдом (1991),

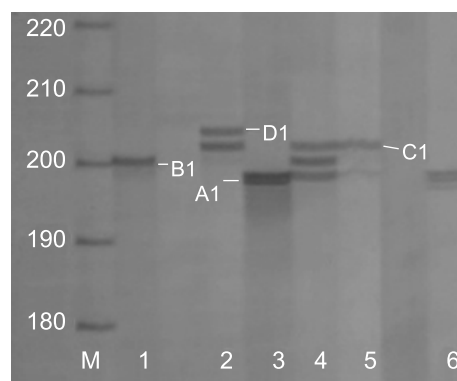


Рис. Аллельное разнообразие гена MD-Exp7 среди дикорастущих видов яблони.

M – маркер молекулярного веса; 1 – *Malus hupehensis*; 2 – *M. turkmenorum* (K 13283); 3 – *M. sieboldi*; 4 – *M. loensis*; 5 – *M. niedzwetskiana* (K29422); 6 – *M. spectabilis* var. *Rubra plena*; 7 – *M. caspiensis* (K 14942); 8 – *M. orientalis* (K 29476); 9 – *M. cerasifera* (K 29494). A1–D1 – аллельные варианты.

Таблица

 Аллельное разнообразие по гену *MD-Exp7*
 у дикорастущих видов и разновидностей рода *Malus*

| № | Виды и разновидности яблони | Аллельные варианты (размер п.н.)* |
|---------------------------------|---|-----------------------------------|
| Секция <i>Sorbomalus</i> Zabel | | |
| 1 | <i>M. zumi</i> (Matsum.) Rehd. | <i>CI</i> (202) |
| 2 | <i>M. sargentii</i> Rehd. | <i>DI</i> (204) |
| 3 | <i>M. sieboldi</i> (Regel) Rehd. | <i>DI</i> (204) |
| Секция <i>Chloromeles</i> Rehd. | | |
| 4 | <i>M. coronaria</i> (L.) Mill (K14986) | <i>AI</i> (198), <i>EI</i> (210) |
| 5 | <i>M. coronaria</i> | <i>CI</i> (202), <i>DI</i> (204) |
| 6 | <i>M. ioensis</i> (Wood) Britt | <i>DI</i> (204) |
| Секция <i>Gimnomeles</i> Koehne | | |
| 7 | <i>M. baccata</i> (L.) Borkh (K 2317) | <i>CI</i> (202), <i>II</i> (230) |
| 8 | <i>M. baccata</i> (K 2324) | <i>BI</i> (201), <i>GI</i> (220) |
| 9 | <i>M. baccata</i> var. <i>cochrulescens</i> | <i>CI</i> (202), <i>EI</i> (210) |
| 10 | <i>M. cerasifera</i> Spach (K 29494) | <i>CI</i> (202), <i>EI</i> (210) |
| 11 | <i>M. cerasifera</i> var. <i>adarata</i> | <i>DI</i> (204), <i>EI</i> (210) |
| 12 | <i>M. cerasifera</i> var. <i>hiemalis</i> | <i>CI</i> (202), <i>EI</i> (210) |
| 13 | <i>M. cerasifera</i> var. <i>auramica</i> | <i>DI</i> (204) |
| 14 | <i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehd. | <i>DI</i> (204) |
| 15 | <i>M. pallasiana</i> Juz. | <i>EI</i> (210) |
| 16 | <i>M. robusta</i> (Carr) Rehd (K 43199) | <i>GI</i> (220) |
| 17 | <i>M. robusta</i> var. <i>persicifoliae</i> | <i>FI</i> (214) |
| Секция <i>Malus</i> Langenf. | | |
| 18 | <i>M. niedzwetskiana</i> Dieck. (K 29429) | <i>CI</i> (202) |
| 19 | <i>M. niedzwetskiana</i> (K 29422) | <i>AI</i> (198) |
| 20 | <i>M. niedzwetskiana</i> (K 13279) | <i>DI</i> (204) |
| 21 | <i>M. turkmenorum</i> Juz. et Pop. M. (K 29421) | <i>AI</i> (198), <i>CI</i> (202) |
| 22 | <i>M. turkmenorum</i> (K 13283) | <i>AI</i> (198) |
| 23 | <i>M. orientalis</i> Uglitzk. (K 41623) | <i>DI</i> (204) |
| 24 | <i>M. orientalis</i> (K 29476) | <i>AI</i> (198) |
| 25 | <i>M. orientalis</i> (K 49478) | <i>DI</i> (204) |
| 26 | <i>M. pumila</i> Mill | <i>CI</i> (202) |
| 27 | <i>M. purpurea</i> (Barbier) Rehd. (K 2392) | <i>DI</i> (204) |
| 28 | <i>M. purpurea</i> <i>Hienamensis</i> | <i>CI</i> (202) |
| 29 | <i>M. purpurea</i> var. <i>eleyi</i> | <i>AI</i> (198), <i>CI</i> (202) |
| 30 | <i>M. silvestris</i> (L.) Mill | <i>AI</i> (198) |
| 31 | <i>M. asiatica</i> Nakai (K 2343) | <i>AI</i> (198) |
| 32 | <i>M. caspiensis</i> Langenf. | <i>CI</i> (202), <i>GI</i> (220) |
| 33 | <i>M. caspiensis</i> (K 14943) | <i>DI</i> (204), <i>HI</i> (226) |
| 34 | <i>M. caspiensis</i> (K 14942) | <i>AI</i> (198) |
| 35 | <i>SR 0523</i> | <i>CI</i> (202), <i>DI</i> (204) |
| 36 | <i>NR12740-7A</i> | <i>DI</i> (204) |
| 37 | <i>M. spectabilis</i> var. <i>rubra plena</i> (Ait) Borkh | <i>CI</i> (202) |

* Размер фрагментов рассчитан относительно близлежащих фрагментов маркера молекулярного веса, разница между которыми 10 п.н.

относятся к четырем секциям. Максимальным количеством видов представлена секция *Malus* (20 генотипов), к которой относятся молодые в эволюционном плане представители рода. Наиболее древними из анализируемых образцов являются растения секции *Sorbomalus*, куда вошли всего три вида.

Анализ генетического полиморфизма по гену *MD-Exp7* представителей различных секций рода *Malus* показал, что аллель *A1* размером 198 п.н. идентифицирован у следующих видов: *M. purpurea* var. *eleyi*, *M. silvestris*, *M. turkmenorum* (K29421), *M. asiatica* (K2343), *M. orientalis* (K29476), *M. caspiensis* (K14942), *M. niedzwetskiana* (K29422), *M. turkmenorum* (K13283). При этом большинство носителей аллеля являются представителями секции *Malus*. Кроме того, 5 видов из данной секции являются гомозиготными по данному аллелю. Как отмечают некоторые авторы, плоды этих видов имеют поздние сроки созревания, а для всех разновидностей *M. orientalis* отмечены такие качества, как плотная кожица плода и жесткая горькая мякоть. Они также обладают длительным периодом хранения (Барсукова, 2007). Аллель *A1* отмечен у представителя секции *Chloromeles* – вида *M. coronaria* (K14986). Вероятно, этому есть объяснение с точки зрения схожих условий произрастания, при которых данный вариант гена имеет важное значение для растения. При этом у еще одной разновидности *M. coronaria* данный аллель отсутствует.

У наибольшего количества диких видов яблони (15 образцов) присутствует аллель *C1* размером 202 п.н. Стоит отметить, что данная форма гена характерна для большинства генотипов не только исследуемых образцов, но и для культурных сортов яблони (Costa *et al.*, 2008; Шамшин и др., 2012; Урбанович и др., 2013). Возможно, что этот аллель является наиболее древним в сравнении с другими вариантами гена. Сочетание в генотипе аллелей *A1* и *C1* выявлено у видов *M. purpurea* var. *eleyi* и *M. turkmenorum* (K29421) из секции *Malus*. Аллель *F1* отмечен лишь у одной разновидности вида *M. robusta* var. *persicifoliae*.

Кроме описанных ранее аллелей гена *MD-Exp7*, у исследуемых видов обнаружены и другие аллельные варианты. Так, у 15 видов выявлен аллель *D1* размером 204 п.н. Отмечены

также аллели размером 210, 220, 226, 230 п.н., которые можно считать уникальными, так как они обнаружены у незначительного количества анализируемых образцов и в предыдущих работах не выявлены. Значение данных форм гена для растения неопределенно и требует дальнейшего изучения.

Полиморфизм изучаемого гена выявлен среди разновидностей одного вида. Так, например, у образцов вида *M. baccata* (*M. baccata* (K2317), *M. baccata* (K2324)), а также *M. baccata* var. *coarulescens* выявлены аллели *I1*, *G1*, *E1* размером 230, 220 и 210 п.н. соответственно. Кроме того, необходимо отметить факт отсутствия аллеля *E1* у представителей секции *Malus*. Такое разнообразие, скорее всего, связано с различными условиями произрастания представителей этого вида, в результате чего возникают несколько вариантов данного гена.

Данные о разнообразии генов биосинтеза экспансина среди диких видов рода *Malus* свидетельствуют о том, что они могут быть перспективными для использования их в маркер-опосредованной селекции. Знания о генетической структуре отдельных видов или секций рода в целом позволяют более обоснованно планировать подбор родительских пар для скрещивания. При этом появляется возможность конкретной работы с определенными группами видов, обладающих наибольшим полиморфизмом данного признака.

ВЫВОДЫ

Проведенный молекулярный анализ дикорастущих видов яблони по гену биосинтеза экспансина *MD-Exp7* позволил выявить значительную полиморфность данного гена. Отмечено разнообразие как между секциями рода, так и между представителями внутри одной секции. Кроме того, у ряда представителей отмечены уникальные аллели гена, не идентифицированные ранее, имеющие размер 210, 220, 226, 230 п.н.

ЛИТЕРАТУРА

- Барсукова О.Н. Виды, разновидности и формы рода *Malus* Mill. Иммунологическая характеристика // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб., 2007. Вып. 781. 26 с.

- Лангенфельд В.Т. Яблоня: Морфологическая эволюция, филогения, география, систематика. Рига: Зинатие, 1991. 234 с.
- Пономаренко В.В., Пономаренко К.В. Генофонд видов рода *Malus* Mill. Яблоня / В.В. Пономаренко, К.В. Пономаренко. СПб.: Общество памяти игумении Таисии, 2013. 222 с.
- Урбанович О.Ю., Кузмицкая П.В., Козловская З.А. и др. Аллельный состав генов *MD-ACS1*, *MD-ACO1* и *MD-EXP7* сортов яблони (*Malus × domestica* Borkh.) с различным сроком хранения плодов // Вестн. Национальной академии наук Беларуси (Сер. «биол. науки»). 2013. № 3. С. 47–55.
- Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Аллельное разнообразие гена *MD-EXP 7* у сортов яблони и груши // Вестн. Мичуринск. гос. аграр. ун-та. 2012. № 4. Ч. 1. С. 23–26.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений / Е.И. Шарова // Физиол. растений. 2007. Т. 54. С. 805–819.
- Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P. *et al.* Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2006. V. 10. No. 2. P. 77–81.
- Costa F., Van de Weg W.E., Stella 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. V. 4. P. 575–586.
- McQueen-Mason S., Cosgrove D.J. Disruption of hydrogen bonding between Wall polymers by proteins that induce plant wall extension / S. McQueen-Mason, D.J. Cosgrove // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 6574–6578.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J., Maarten 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, H. Maarten // Tree Genet. Genomes. 2012. V. 9. No. 1. P. 279–290.
- Puchooa D.A. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* - Sonn.) / D.A. Puchooa // Afr. J. Biotechnol. 2004. V. 3. No. 4. P. 253–255.

POLYMORPHISM FOR THE MD-EXP-7 GENE FOR EXPANSIN BIOSYNTHESIS IN WILD SPECIES OF THE GENUS *MALUS* MILL

N.I. Savel'ev¹, I.N. Shamshin², N.N. Savel'eva¹, A.S. Lyzhin¹

¹ Michurin All-Russia Research Institute of Fruit Crop Genetics and Breeding, Michurinsk, Russia, e-mail: cglm@rambler.ru;

² Michurin State Agrarian University, Michurinsk, Russia, e-mail: Ivan_Shamshin@mail.ru

Summary

Molecular analysis revealed polymorphism for the *MD-Exp7* gene, controlling expansin biosynthesis, in wild *Malus* species. Eight allelic forms of the gene were identified, and four of them were unique. The regularities in the allele distribution in 37 genotypes were found to be in accordance with their systematic positions. The trait was found to be broadly diverse both among the sections of the genus and within a particular section. Variants of the gene were identified in representatives of one species.

Key words: wild apple species, PCR test, allelic diversity, *MD-Exp7* gene, fruit storability.