

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИБРИДНЫХ СЕЯНЦЕВ ЯБЛОНИ ПО ГЕНАМ *Md-ACSI* И *Md-ACO1* БИОСИНТЕЗА ЭТИЛЕНА

Лыжин А.С., канд. с.-х. наук, Савельева Н.Н., д-р. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина»  
(Мичуринск)

**Реферат.** Представлены результаты анализа аллельного полиморфизма гибридных сеянцев яблони по генам *Md-ACSI* и *Md-ACO1*, контролирующим интенсивность биосинтеза этилена в плодах. Идентифицированы носители аллелей, ассоциированных со сниженным уровнем биосинтеза этилена: сеянцы 3-10-1, 3-10-12, 3-10-18, 3-10-21, 3-10-27, 3-10-28, 3-11-41 (Валюта × Успенское), 7-12-2, 7-12-7, 7-12-18, 7-12-29 и др. (Валюта × Белорусское сладкое) – аллель *Md-ACSI-2*; сеянцы 31-11-3, 31-11-8, 31-11-17 (Кандиль орловский × Былина) – аллель *Md-ACO1-1*.

**Ключевые слова:** яблоня, гибридные сеянцы, молекулярные маркеры, биосинтез этилена, гены *Md-ACSI* и *Md-ACO1*

**Summary.** The results of allelic polymorphism analysis of apple hybrid seedlings for *Md-ACSI* and *Md-ACO1* genes, controlling the intensity of ethylene biosynthesis in the apple fruits, were presented. It is identified the alleles carriers associated with reduced level of ethylene biosynthesis: hybrid seedlings of 3-10-1, 3-10-12, 3-10-18, 3-10-21, 3-10-27, 3-10-28, 3-11-41 (Valyuta × Uspenskoye), 7-12-2, 7-12-7, 7-12-18, 7-12-29 and etc. (Valyuta × Belorusskoye Sladkoye) having the allele of *Md-ACSI-2*; the seedlings of 31-11-3, 31-11-8, 31-11-17 (Kandil Orlovskiy × Bylina) having the allele of *Md-ACO1-1*.

**Key words:** apple-tree, hybrid seedlings, molecular markers, ethylene biosynthesis, *Md-ACSI* and *Md-ACO1* genes

**Введение.** Необходимым условием коммерческой ценности сорта являются высокие товарно-потребительские качества плодов, одним из которых является продолжительность их хранения [1]. Важным фактором, влияющим на продолжительность хранения плодов яблони, является интенсивность биосинтеза этилена. Ингибирование эндогенного и экзогенного этилена способствует повышению сроков хранения и качества плодов [2]. Ключевыми ферментами в процессе биосинтеза этилена являются 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтаза (АЦК-синтаза), преобразующая S-аденозил-L-метионин в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК) и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидаза (АЦК-оксидаза), окисляющая АЦК до этилена, аммиака, муравьиной кислоты и углекислого газа [3, 4]. Интенсивность работы ферментов АЦК-синтаза и АЦК-оксидаза кодируется генами семейств ACS и ACO [5].

Главными генетическими детерминантами биосинтеза этилена в плодах яблони во время созревания и при хранении являются гены *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, расположенные на 15 и 10 хромосоме, соответственно. Интенсивность биосинтеза этилена определяется аллельным состоянием указанных генов. Мутации аллеля 2 (вставка ретротранспозона в промотерной зоне) гена *Md-ACS1* (*Md-ACS1-2*) и аллеля 1 (InDel в третьем интроне) гена *Md-ACO1* (*Md-ACO1-1*) обуславливают снижение уровня биосинтеза эндогенного этилена, причём аллель *Md-ACO1-1* усиливает действие аллеля *Md-ACS1-2*.

Минимальный уровень биосинтеза этилена наблюдается при сочетании в гомозиготном состоянии в генотипе аллелей *Md-ACS1-2* и *Md-ACO1-1* [6, 7]. Другие гены семейств ACS и ACO (*Md-ACS2*, *Md-ACS3*, *Md-ACS5*, *Md-ACO2*, *Md-ACO3*, *Md-ACO4*) оказывают второстепенное влияние на интенсивность биосинтеза этилена в плодах [5, 8].

Целью настоящих исследований являлось молекулярно-генетическое тестирование гибридных семян яблони для идентификации носителей целевых аллелей генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, а также уточнение характера их наследования в гибридном потомстве.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проведены в 2019-2020 гг. В качестве биологических объектов использованы семена яблони гибридного фонда академика РАН, доктора с.-х. наук Н.И. Савельева. Для идентификации аллельного состояния гена *Md-ACS1* использовали маркер Md-ACS1 [9], гена *Md-ACO1* – маркер Md-ACO1 [6].

Целевыми продуктами маркера Md-ACS1 являются фрагменты размером 489 и 655 п.н. Аллелю *Md-ACS1-1* (нормальный уровень биосинтеза этилена) на электрофореграмме соответствует фрагмент размером 489 п.н., аллелю *Md-ACS1-2* (сниженный уровень биосинтеза этилена) – 655 п.н. Наличие двух фрагментов свидетельствует о гетерозиготном состоянии гена *Md-ACS1* [10]. Аллели гена *Md-ACO1* детектируются по наличию на электрофореграмме фрагментов размером 525 п.н (*Md-ACO1-1*) и 587 п.н. (*Md-ACO1-2*) [6].

Использованные в работе праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва) и имеют следующую нуклеотидную последовательность:

Md-ACS1 For 5'-AGAGAGATGCCATTTTTGTTTCGTAC-3'

Md-ACS1 Rev 5'-CTACAAACTTGCGTGGGGATTATAAGTGT-3'

Md-ACO1 For 5'-TCCCCCAATGCACCACTCCA-3'

Md-ACO1 Rev 5'-GATTCCTTGGCCTTCATAGCTTC-3'

Экстракция геномной ДНК была проведена из молодых листьев согласно протоколу Diversity Arrays Technology P/L [11] с модификациями, позволяющими согласно проведённым ранее исследованиям [12, 13] получать экстракт геномной ДНК дикорастущих видов, сортов и гибридных семян яблони, необходимой для постановки ПЦР концентрации и чистоты.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2,5 мМ 10x Taq-буфера (+ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, -KCL). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific. Амплификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы «BIO-RAD» по следующей программе: денатурация 94 °С – 2 мин, 35 циклов: 65 °С – 45 с, 72 °С – 2 мин, 94 °С – 45 с; финальная элонгация 72 °С – 10 мин.

Разделение целевых продуктов маркеров осуществляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле. В качестве буферной системы использовался 1x TBE (трис-боратный буфер). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовался маркер молекулярной массы GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

**Обсуждение результатов.** В комбинации скрещивания Валюта × Успенское исходные формы характеризуются гетерозиготным состоянием по гену *Md-ACS1* и гомозиготным состоянием аллеля 2 гена *Md-ACO1*. В гибридном потомстве идентифицировано 3 аллельных варианта гена *Md-ACS1* (рис. 1).

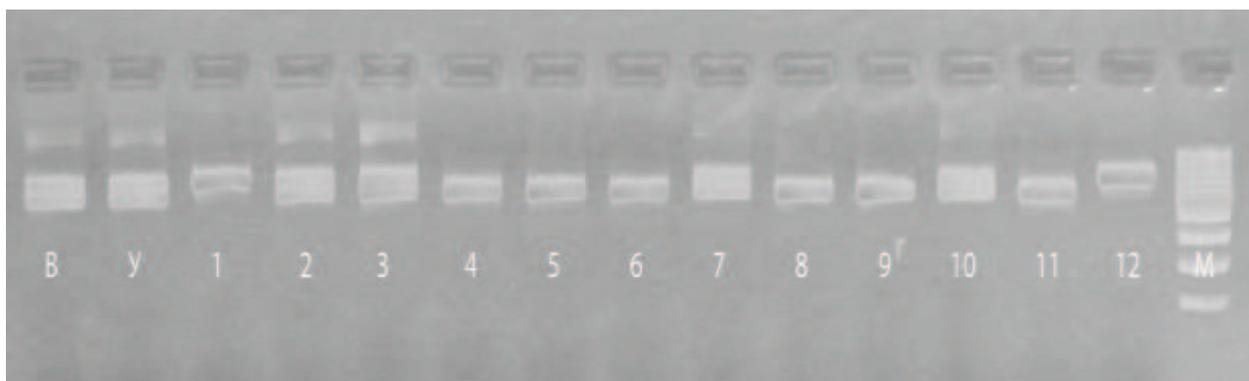


Рис. 1. Электрофоретический спектр маркера *Md-ACS1* сеянцев яблони гибридной семьи Валюта × Успенское  
В – Валюта, У – Успенское, 1-12 – гибридные сеянцы, М – маркер молекулярного веса

Аллель *Md-ACS1-1* в гомозиготном состоянии выявлен у 34,5 % сеянцев яблони, гомозиготное состояние аллеля *Md-ACS1-2* – у 20,7 % сеянцев. Гетерозиготным сочетанием аллелей характеризуется 44,8 % генотипов. Сеянцы с гомозиготным генотипом по аллелю *Md-ACS1-2* (№3-10-1, 3-10-12, 3-10-18, 3-10-21, 3-10-27, 3-10-28, 3-11-41) являются перспективным исходным материалом в селекции яблони на лёжкость плодов, так как при скрещивании передают дефектный аллель 100 % гибридного потомства. Статистический анализ результатов амплификации подтвердил соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому 1:2:1. Полученное значение  $\chi^2$  составило 1,413, что значительно меньше критического (5,99) при уровне значимости 0,05 (табл. 1).

Так как родительские формы Валюта и Успенское гомозиготны по аллелю 2 гена *Md-ACO1*, то и в гибридном потомстве расщепления по аллелям не отмечено (табл. 2).

Таблица 1 – Результаты ПЦР-анализа наследования маркера *Md-ACS1* в гибридном потомстве яблони

Комбинация скрещивания	Количество семянцев, %			$\chi^2$
	генотип <i>Md-ACS1-1/1</i>	генотип <i>Md-ACS1-1/2</i>	генотип <i>Md-ACS1-2/2</i>	
Кандиль орловский × Былина	100	0	0	-
Валюта × Успенское	34,5	44,8	20,7	1:2:1, 1,413
Валюта × Белорусское сладкое	42,8	57,2	0	1:1, 0,572

Таблица 2 – Результаты ПЦР-анализа наследования маркера *Md-ACO1* в гибридном потомстве яблони

Комбинация скрещивания	Количество семянцев, %			$\chi^2$
	генотип <i>Md-ACO1-1/1</i>	генотип <i>Md-ACO1-1/2</i>	генотип <i>Md-ACO1-2/2</i>	
Кандиль орловский × Былина	0	60,7	39,3	1:1 1,284
Валюта × Успенское	0	0	100	-
Валюта × Белорусское сладкое	0	0	100	-

В комбинации скрещивания Валюта × Белорусское сладкое донором дефектного аллеля *Md-ACS1-2* является сорт Валюта. Сорт Белорусское сладкое характеризуется гомозиготным состоянием аллеля *Md-ACS1-1*. Соответственно в гибридном потомстве идентифицированы гетерозиготные (7-12-2, 7-12-7, 7-12-18, 7-12-29 и др.) и гомозиготные (7-12-3, 7-12-13, 7-12-28 и др.) генотипы. Статистический анализ подтвердил соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому 1:1 (см. табл. 1). По гену *Md-ACO1* сорта Валюта и Белорусское сладкое гомозиготны по аллелю 2 гена *Md-ACO1*, в гибридном потомстве расщепления по аллелям не отмечено (см. табл. 2).

В комбинации скрещивания Кандиль орловский × Былина обе родительские формы характеризуются гомозиготным состоянием аллеля *Md-ACS1-1* (генотип *Md-ACS1-1/1*), поэтому гибридные сеянцы также имеют гомозиготный генотип по аллелю *Md-ACS1-1* (см. табл. 1). По гену *Md-ACO1* в данной комбинации донором дефектного аллеля *Md-ACO1-1* является сорт Кандиль орловский (генотип *Md-ACO1-1/2*). Сорт Былина имеет гомозиготный генотип по аллелю 2 (*Md-ACO1-2/2*). Соответственно в гибридном потомстве идентифицированы как ге-

терозиготные (*Md-ACO1-1/2*) – сеянцы №31-11-3, 31-11-8, 31-11-17 и др., так и гомозиготные (*Md-ACO1-2/2*) генотипы (рис. 2).



Рис. 2. Электрофоретический спектр маркера *Md-ACO1* сеянцев яблони гибридной семьи Кандиль орловский × Былина  
К – Кандиль орловский, Б – Былина, 1-18 – гибридные сеянцы,  
М – маркер молекулярного веса

Оценка частоты наследования аллелей гена *Md-ACO1* по критерию  $\chi^2$  подтвердила соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому 1:1. Полученное значение  $\chi^2$  составило 1,284 при критическом 3,84 для уровня значимости 0,05 (см. табл. 2).

В сортах яблони отечественной селекции сочетание аллелей, ответственных за наиболее низкий уровень синтеза этилена в плодах, не выявлено [14-16]. Поэтому целесообразным является проведение дальнейшей селекционной работы по созданию сортов яблони, сочетающих в своем генотипе аллели *Md-ACO1-1* и *Md-ACS1-2* в гомозиготном состоянии. Результаты проведенного анализа позволили идентифицировать носителей аллельных форм генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1*, которые возможно использовать в скрещиваниях при создании сортов яблони с длительным сроком хранения.

**Выводы.** Таким образом, в результате проведенных исследований проанализировано аллельное состояние генов, контролирующих интенсивность биосинтеза эндогенного этилена в плодах изучаемых гибридных сеянцев яблони.

Идентифицированы носители аллелей, ассоциированных со сниженным уровнем биосинтеза этилена: сеянцы 3-10-1, 3-10-12, 3-10-18, 3-10-21, 3-10-27, 3-10-28, 3-11-41 (Валюта × Успенское), 7-12-2, 7-12-7, 7-12-18, 7-12-29 и др. (Валюта × Белорусское сладкое) – аллель *Md-ACS1-2*; сеянцы 31-11-3, 31-11-8, 31-11-17 (Кандиль орловский × Былина) – аллель *Md-ACO1-1*.

#### Литература

1. Седов, Е.Н., Серова З.М. Сорта яблони с длительной лежкостью плодов для совершенствования сортимента // Садоводство и виноградарство. 2016. Т. 2. С. 16-21. DOI: 10.18454/VSTISP.2016.2.1090
2. Knee, M. Benefits of ethylene removal during apple storage / M. Knee, S.G.S. Hatfield // Ann. appl. Biol. – 1981. – V. 98. – P. 157-165.

3. Dong, J.G. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit / J.G. Dong, W.T. Kim, W.K. Yip, G.A. Thompson, L. Li, A.B. Bennett, S.F. Yang // *Planta*. – 1991. – V. 185. – P. 38-45.
4. Dong, J.G. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit / J.G. Dong, D. Olson, A. Silverstone, S.F. Yang // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 98. – P. 1530-1531.
5. Wiersma, P.A. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of ‘Sunrise’ and ‘Golden Delicious’ apple fruit / P.A. Wiersma, H. Zhang, C. Lua, A. Quail, P.M.A. Toivonen // *Postharvest Biology and Technology*. – 2007. – V. 44. – P. 204-211. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2006.12.016.
6. Costa, F. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) / F. Costa, S. Stella, W.E. Van de Weg, W. Guerra, M. Cecchinel, J. Dallavia, B. Koller, S. Sansavini // *Euphytica*. – 2005. – V. 141. – P. 181-190. DOI: DOI: 10.1007/s10681-005-6805-4.
7. Zhu, Y. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection / Y. Zhu, B.H. Barrit // *Tree Genetics and Genomes*. – 2008. – V. 4. – P. 555-562. DOI 10.1007/s11295-007-0131-z.
8. Wang, A. Null mutation of the *Md-ACS3* gene, coding for a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, leads to long shelf life in apple fruit / A. Wang, J. Yamakake, H. Kudo, Y. Wakasa, Y. Hatsuyama, M. Igarashi, At. Kasai, T. Li, T. Harada // *Plant Physiology*. – 2009. – V. 151. – P. 391-399. DOI: 10.1104/pp.109.135822.
9. Harada, T. An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars / T. Harada, T. Sunako, Y. Wakasa, J. Soejima, T. Satoh, M. Niizeki // *Theor Appl Genet*. – 2000. – V. 101. – P. 742-746.
10. Sunako, T. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life / T. Sunako, W. Sakuraba, M. Senda, S. Akada, R. Ishikawa, M. Niizeki, T. Harada // *Plant Physiology*. – 1999. – V. 119. – P. 1297-1303.
11. DArT, 2014 URL: [http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/ArT\\_DNA\\_isolation.pdf](http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/ArT_DNA_isolation.pdf) (дата обращения: 10.07.2018).
12. Савельев Н.И., Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Отбор перспективных генотипов яблони на колонновидность и устойчивость к парше с помощью диагностических ДНК-маркеров // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016. Т. 20. № 3. С. 329-332. DOI: 10.18699/VJ16.122.
13. Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Идентификация генов устойчивости к парше у сортов и гибридных форм яблони с использованием молекулярных маркеров [Электронный ресурс] // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2018. № 53(5). С. 1-14. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/18/05/01.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-5-53-1-14.
14. Супрун И.И., Токмаков С.В. Изучение аллельного разнообразия генов синтеза этилена *Md-ACS1*- и *Md-ACO1* в отечественной генплазме яблони // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 23. С. 298-302.
15. Савельев Н.И., Шамшин И.Н., Кудрявцев А.М. Генетический полиморфизм исходных форм яблони по аллелям генов длительной лежкости и качества плодов // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2014. № 3. С. 17-20.
16. Shamshin, I.N. Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources / I.N. Shamshin, A.V. Shlyavas, A.A. Trifonova, K.V. Boris, A.M. Kudryavtsev // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2018. – Т. 22. – № 6. – С. 660-666. DOI: 10.18699/VJ18.408.