

УДК 634.1:574.164:577.17

UDC 634.1:574.164:577.17

**ДОСТИЖЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
КОНТРОЛЯ БИОСИНТЕЗА
ЭТИЛЕНА У ЯБЛОНИ
(*MALUS DOMESTICA* BORKH.)**

**ADVANCES IN THE STUDY
OF MOLECULAR AND GENETIC
CONTROL OF THE APPLE-TREE
ETHYLENE BIOSYNTHESIS
(*MALUS DOMESTICA* BORKH.)**

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
науч. сотрудник лаборатории
генетики и микробиологии

Tokmakov Sergey
Cand. Biol. Sci.
Research Associate of Laboratory
of Genetics and Microbiology

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
зав. лабораторией генетики
и микробиологии

Suprun Ivan
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Genetics
and Microbiology

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук
зав. лабораторией сортоизучения
и селекции винограда

Ilitskaya Elena
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Variety's
Study and Breeding of Grapes

*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Северо-Кавказский
зональный научно-исследовательский
институт садоводства и
виноградарства», Краснодар, Россия*

*Federal State Budget Scientific
Organization "North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

В статье обобщены современные данные, касающиеся актуальной проблемы – молекулярно-генетического контроля биосинтеза этилена у яблони, непосредственно влияющего на качество плодовой продукции и способность к хранению. Решение данной проблемы невозможно без точного представления механизмов синтеза этилена, рецепции и передачи этиленового сигнала, биохимических путей контроля уровня его синтеза. Поиск актуальной и комплексной информации осложняется наличием большого количества статей в зарубежных изданиях, рассматривающих лишь отдельные ступени регуляции уровня биосинтеза этилена. Понятно, что вклад в такой признак, как структура плода и способность его к хранению, оказывает множество генов, таким образом, целью данной работы явилось обобщение имеющейся на сегодняшний день информации о биосинтезе этилена

The article summarizes the current data as regards the actual problem – molecular-genetic control of ethylene biosynthesis in apple, directly affects the fruit quality and storability. Solution of this problem is not possible without an exact understanding of the ethylene synthesis mechanisms, reception and transmission of ethylene signal, biochemical pathways controlling the level of ethylene synthesis. Searching for actual and complex information complicated by the large number of foreign articles, considering only partial steps, regulating the level of ethylene biosynthesis. It is clear that the multiple genes has contribution to such traits, as fruit structure and storability, so the aim of this work was generalization of currently available information on ethylene biosynthesis and control. The article reviews the ethylene reception inhibitors

и его контроля. В статье обобщаются ингибиторы рецепции этилена (1-МЦП и AVG), рассмотрены пути биосинтеза этилена (система 1 и 2), ключевые ферменты в биосинтезе этилена (АЦК-синтаза и АЦК-оксидаза), гены, кодирующие эти ферменты – *Md-ACS1*, *Md-ACS2*, *Md-ACS3*, *Md-ACS5A* и *MdACS5B* – для АЦК-синтазы и *Md-ACO1*, *Md-ACO2*, *Md-ACO3* и *Md-ACO4* – для АЦК-оксидазы. Рассмотрены каскадные механизмы передачи этиленового сигнала, включающие в себя рецепторы ETR, ERS, RAN, CTR, EIN, EIN, EILs и ERF, и их молекулярно-генетический контроль. Помимо этого, в статье приведена информация о генах, влияющих на структуру плода, но не связанных с этиленом – *Md-Cel1*, *Md-PG1*, *Md-PG2* и *Md-Exp7*. Освещены вопросы картирования QTL, контролирующих качество плодов, а именно связанные с биосинтезом этилена.

Ключевые слова: ЭТИЛЕН, БИОСИНТЕЗ, ХРАНЕНИЕ ЯБЛОК, АЦК-СИНТАЗА, АЦК-ОКСИДАЗА, КАЧЕСТВО ПЛОДОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР

(1-MCP and AVG), the ethylene biosynthesis pathways are considered (system 1 and 2) and the key enzymes in the ethylene biosynthesis (ACC synthase and ACS oxidase), and genes encoding these enzymes – *Md-ACS1*, *Md-ACS2*, *Md-ACS3*, *Md-ACS5A* and *MdACS5B* – for ACC-synthase and *Md-ACO1*, *Md-ACO2*, *Md-ACO3* and *Md-ACO4* – for ACC-oxidase. Ethylene signal cascading the transmission mechanisms, which include the receptors of ETR, ERS, RAN, CTR, EIN, EIN, EILs and ERF, and their molecular genetic control are reviewed. In addition, the article provides the information about genes of fruit structure, unrelated with ethylene – *Md-Cel1*, *Md-PG1*, *Md-PG2* and *Md-Exp7*. The problems of QTL mapping, controlling fruit quality, namely related to ethylene biosynthesis are presented.

Keywords: ETHYLENE BIOSYNTHESIS, STORAGE, OF APPLES, ACC-SYNTHASE, ACS-OXIDASE, FRUIT QUALITY, MOLECULAR MARKER

Обсуждение. Качество и конкурентоспособность плодовой продукции напрямую зависит от её внешнего вида, который, в свою очередь, обусловливается способностью плодов к длительному хранению, то есть лёжкостью. В отличие от зерновых культур и орехов, большой процент массы яблок приходится на содержащуюся в них воду, которая позволяет сохранять высокую физиологическую активность фруктов. Таким образом, метаболические процессы в плодах протекают и после созревания, и после сбора урожая, и при хранении [1].

Все фрукты можно разделить на две большие группы – климактерические и неклимактерические – в зависимости от того, усиливается ли респирация в процессе созревания. У климактерических фруктов, таких как

яблоки, бананы, киви, груши, персики, манго, помидоры и дыни, наблюдается усиление респирации с последующим резким усилением выделения этилена в начале созревания. В неклимактерических фруктах, таких как цитрусы, виноград, ананасы и земляника, респирация и выделение этилена остаётся постоянным в процессе созревания [2].

Усиление респирации, наблюдаемое у яблок в конце созревания, было названо «климактерическим» усилением [3]. Хотя, изначально, словом «климактерический» описывали только усиление респирации, сейчас к этому термину привязывают и внезапное усиление продукции этилена в фазе созревания. Скорость, с которой этилен влияет на созревание, была продемонстрирована на шарантской дыне (*Cucumis melo* cv. *reticulatus* F1 Alpha), которая из незрелой стадии переходила в перезрелую в течении 24-48 часов [4]. Обработка климактерических фруктов, даже на стадии молочной зрелости, экзогенным этиленом может вызвать очень быстрое усиление автокаталитической продукции этилена, и тем самым ускорить процесс созревания. С другой стороны, обработка фруктов ингибиторами этилена, например 1-метилциклопропеном (1-МЦП) или аминоэтоксивинилиглицином (AVG), может подавить вызванные этиленом реакции, уменьшить респирацию и замедлить созревание [5]. Результаты этих опытов доказывают основную роль этилена в регуляции созревания климактерических фруктов и то, что вся система регулируется положительным механизмом обратной связи. Тем не менее, изменение окраски на красную, накопление сахаров и уменьшение кислотности являются этилен-независимыми факторами созревания, что показывает вовлечённость как этилен-зависимых, так и независимых механизмов в созревание климактерических фруктов.

Подавление биосинтеза этилена и его действия – это один из основных механизмов, благодаря которому продлеваются сроки хранения плодов в камерах для хранения. Газообразный ингибитор рецепции этилена 1-МЦП играет важнейшую роль в продлении сроков хранения сельскохозяй-

ственной продукции [6]. Под названием «EthylBloc» 1-МЦП был зарегистрирован для использования на декоративных растениях и цветах, а для использования на пищевых продуктах, в основном фруктах, – «SmartFresh» (AgroFresh, Spring House, Пенсильвания, США), причём именно яблоки стали первыми фруктами, к которым применилась технология SmartFresh. Сейчас SmartFresh разрешён к применению для большинства фруктов во многих странах мира, причём разрешённые концентрации 1-МЦП в разных странах варьируют – например, в США 1000 млрд^{-1} , а в Великобритании – 625 млрд^{-1} . Концентрации также могут зависеть от сорта яблони и от других факторов, например сроков сбора урожая, транспортировки, одновременном хранении в камерах искусственного климата и обработкой 1-МЦП и предполагаемых периодов хранения [7].

Технология SmartFresh может применяться только после сбора урожая, т. к. 1-МЦП является газом. В то время как 1-МЦП является ингибитором рецепции этилена, известны ингибиторы синтеза этилена. Среди них аминоэтоксивинилглицин (AVG), ингибитор АЦК-синтазы, разрешён к применению на пищевых продуктах и который применяется до сбора урожая. Он известен под торговым названием «ReTain» (Valent BioSciences Corporation, Иллинойс, США) и используется для уменьшения опадения незрелых плодов и продления сроков созревания [8].

Биологический синтез эндогенного этилена. Основываясь на уровне продукции этилена в процессе развития плодов, McMurchie с соавторами (1972) предложили концепцию системы-1 и системы-2 синтеза этилена [9]. Принято считать, что система-1, автоингибируемая этиленом, функционирует в процессе нормальной вегетации и отвечает за базовый уровень продукции этилена. Система-2 функционирует только при старении цветков и усилении выделения этилена в процессе созревания климактерических фруктов и является автостимулируемой самим этиленом и у

некоторых фруктов индуцируется предварительной обработкой холодом [10]. Активация системы-2 является критическим шагом для перехода в стадию зрелости плодов.

Важнейшим соединением для биосинтеза растительного гормона этилена (C_2H_4) является аминокислота метионин, которая при взаимодействии с АТФ образует S-аденозилметионин, который далее превращается АЦК-синтазой в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК), являющуюся предшественником этилена. Затем АЦК в присутствии кислорода разлагается АЦК-оксидазой с образованием этилена, аммиака, муравьиной кислоты и CO_2 [11] (рис. 1).

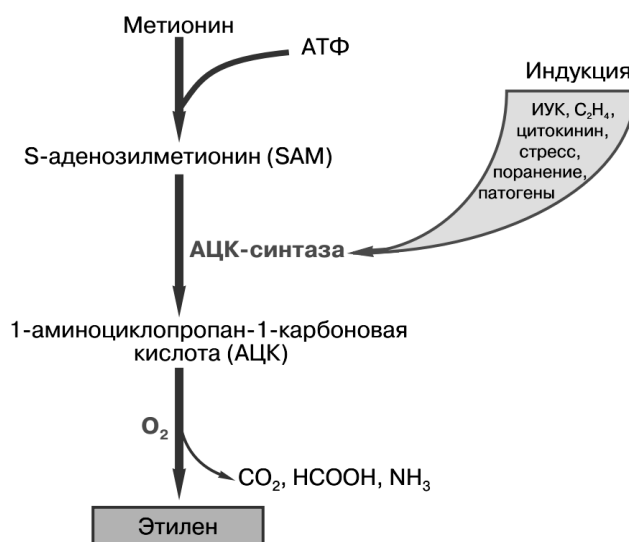


Рис. 1. Схема биосинтеза этилена в растениях. Указаны индукторы АЦК-синтазы и кислородозависимость последнего этапа биосинтеза этилена (по Кулаевой, 1998)

Ключевыми ферментами в биосинтезе этилена являются индуцибельные АЦК-синтаза и АЦК-оксидаза. Пироксидал фосфат выступает в роли кофактора АЦК-синтазы, в то время как АЦК-оксидаза является негемовым ферментом, с Fe^{2+} и CO_2 в качестве кофакторов и аскорбиновой кислотой в качестве косубстрата в реакции протекающей в присутствии O_2 [12]. В геноме растений существует большое семейство генов АЦК-синтазы, различающиеся по своей регуляции – одни включаются на разных стадиях нормального развития растения, другие – при поранении, третьи –

при действии патогена и т. д. [13]. Изучение этих генов начато достаточно давно и тесно сопряжено с развитием соответствующих методик молекулярно-генетического анализа. Тем не менее, полностью понять все механизмы созревания и старения плодов до сих пор не удалось.

Во многих опубликованных научных трудах, авторы сходятся во мнении, что АЦК-синтаза является лимитирующим фактором в биосинтезе этилена и, глубоко изученная у многих видов растений, АЦК-синтаза кодируется большим семейством генов – например у арабидопсиса, было идентифицировано 12 генов. В отличие от синтазы, АЦК-оксидаза охарактеризована как фермент, кодирующийся меньшей группой дифференциально экспрессирующихся генов многих видов растений, включая томат, персик, дыню и клевер белый. Считается, что гены АЦК-синтазы-1 яблони (*Md-ACS1*) и АЦК-оксидазы-1 (*Md-ACO1*) начинают активно экспрессироваться при включении системы-2 синтеза этилена.

Гены, кодирующие синтез АЦК-синтазы. На сегодняшний день у яблони выделено и охарактеризовано пять генов АЦК-синтазы семейства *ACS* – *Md-ACS1*, *Md-ACS2*, *Md-ACS3*, *Md-ACS5A* и *MdACS5B* [14].

Неполную кДНК АЦК-синтазы, с продуктом идентичным АЦК-синтазе, выделенной из созревающих яблок, удалось выделить ещё в 1991 году Dong с соавторами [15]. В 1995 году удалось получить полноразмерную кДНК, а через два года – её геномную последовательность [16]. Затем из геномной библиотеки сорта Голден Делишес был выделен аллель гена АЦК-синтазы *Md-ACS1* (*Malus domestica* ACC synthase). Затем в этом аллеле была обнаружена замена семи нуклеотидов (новый аллель – *ACS1-2*) и локализована на предположительно кодирующем участке *Md-ACS1* – аллеле *ACS1-1*. Эта нуклеотидная замена приводит к замене одной аминокислоты. В 5'-фланкирующем регионе *ACS1-2* также были найдены существенные отличия его от *ACS1-1*. Последовательность из 13 пар оснований

ACS1-1 (в позиции 594-607) tandemно повторялась в *ACS1-2*. Более того, последовательность из 24 пар оснований (в позиции 1308-1331 на *ACS1-1*) отсутствовала у *ACS1-2*, но присутствовала вставка 162 пар оснований в этом сайте у *ACS1-2*. Эта вставка размером 162 п. о. является коротким перемежающимся повторяющимся элементом – ретротранспозоном (SINEs - Short INterspersed Elements). Было выявлено, что гомологи SINEs-Md1 встречается только в геноме *Pyrus* и *Malus* [17].

Изучая очень лёжкий сорт яблони Фуджи, который несёт гомозиготу по гену *Md-ACS1* (*ACS1-2/ACS1-2*) и выделяет очень мало этилена, было показано, что уровень транскрипции *ACS1-2* во время созревания очень низок и все другие изученные сорта яблони, имеющие гомозиготы *ACS1-2*, имели очень лёжкие плоды и/или выделяющие очень мало этилена, как и сорт Фуджи. Три аллельные комбинации – *ACS1-1/1*, *1-1/2* и *1-2/2* – обуславливают, в основном, высокий, средний и низкий уровень синтеза этилена, соответственно [18]. Более того, экспрессия различных аллельных форм *Md-ACS1* у различных сортов влияет на степень опадения незрелых плодов яблони [19].

Используя праймеры, гомологичные двум высоко консервативным последовательностям ДНК, расположенным с обоих концов кодирующего участка гена АЦК-синтазы, из мРНК сорта Макинтош была выделена последовательность кДНК второй АЦК-синтазы *Malus domestica*. Затем провели сиквенирование ДНК последовательности *Md-ACS2*. Гуанин в позиции 132, приводящий к образованию терминаторного кодона (UAG – амбер кодон) приняли за ошибку ПЦР и заменили в сиквенсе на цитозин (как и в других последовательностях АЦК-синтаз) для кодирования строго консервативного тирозина [20].

Обратно-комплементарная (антисмысловая) последовательность ДНК гена *Md-ACS2* была встроена в геном яблони, с целью снизить синтез этилена и уменьшить активность гидролаз клеточной стенки для увеличе-

ния лёжкости яблок [20]. Антисмысловая последовательность ДНК целевого гена связывается с мРНК целевого гена и инактивирует ее. Связанная мРНК не может транслироваться и подвергается деградации.

В 2004 году Galli с соавторами успешно трансформировали геном *Md-ACS2* в антисмысловой ориентации подвой М26 и сорт Роял Гала. Более чем 150 трансгенных плодоносящих деревьев были изучены в Корнельском университете США. Этот эксперимент был первым полевым опытом, направленным на подавление синтеза этилена в фруктах методами генной инженерии. Большой разброс в уровне выделения этилена наблюдался у трансгенных деревьев. Большинство линий не имели значительных отличий от контрольных образцов, а у некоторых выделение этилена было даже выше. У 2-3% трансгенных линий наблюдалось значительное подавление синтеза этилена – этилен начинал синтезироваться с задержкой в 1-4 недели, после задержки в любом случае начинался автокатализированный синтез, но уровень этилена оставался достаточно низким. При хранении в холодильниках, лучшие трансгенные линии начинали выделять этилен после задержки в 3-4 месяца [21].

Полноразмерная последовательность кДНК *Md-ACS3* гена третьей АЦК-синтазы яблони была получена при скрининге *Md-ACS2* вставкой библиотеки вектора *lambda Zap II*, полученной из мРНК зреющих плодов сорта Макинтош. Была определена нуклеотидная последовательность этого гена. Анализ новых последовательностей ДНК и сравнение их с другими АЦК-синтазами показало, что *Md-ACS2* более всего напоминает АЦК-синтазу перца стручкового (*Capsicum annuum*) (78%), и на 56,2% гомологична *Md-ACS1*. Гомология *ACS2* с *ACS3* составила 57,9% [20].

При построении филогенетического дерева на основе аминокислотных последовательностей 46 АЦК-синтаз, было показано, что АЦК-синтазы разделяются, как минимум, на два больших класса. Более того, все виды растений, в которых обнаружено более одной последовательности

АЦК-синтазы (*Arabidopsis thaliana*, *Cucurbita maxima*, *Lycopersicum esculentum*, *Malus domestica*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum* и *Vigna radiata*) имеют одну или больше последовательностей в каждом из двух обнаруженных классов АЦК-синтаз [20].

Класс А включает в себя Md-ACS1 и Md-ACS3, АЦК-синтазы многих других двудольных, таких как LE-3 томата и большинства однодольных. Только две синтазы *Oryza sativa* (однодольное растение) относились к классу В, остальные присутствующие в этом классе были синтазы двудольных растений, среди них Md-ACS2, LE-2 и LE-4 томата [20]. Видимо, появление мультигенного семейства АЦК-синтаз предшествовало разделению дву- и однодольных, так что классифицировать эти ферменты возможно только на уровне промоторов их генов и этиленовых рецепторов [22]. В семействе генов *Md-ACS3* было выделено три гена – *Md-ACS3a*, *Md-ACS3b* и *Md-ACS3c*. Методом ПЦР + ПДРФ (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) было показано, что это не аллель одного гена, а независимые гены. Два из них, *Md-ACS3b* и *Md-ACS3c*, содержат в своём 5'-фланкирующем участке вставку 333 пары оснований – транспозон, который препятствует транскрипции этих генов в процессе созревания [23].

Эта последовательность фланкирована терминальным инвертированным повтором из 8 пар оснований, что позволило характеризовать её всю как миниатюрный инвертировано-повторяющийся транспозон (miniature inverted-repeat transposable element – MITE) [24]. В геноме яблони он был назван Mahk (обнаруженный в *Malus* исследователем Hisayuki Kudo). Вся последовательность характеризовалась обилием А-Т (220/330), что может служить потенциалом для формирования шпилек в структуре ДНК, и это ещё раз указывает на то, что вставка является транспозоном [25]. Для определения распределения MITE элемента в геноме *Malus* воспользовались методом саузерн-блот гибридизации. Было выявлено, что большое количество копий Mahk присутствует во всех видах рода *Malus*. Похожие

результаты были получены и для айвы (*Chaenomeles*), но в геноме остальных изученных представителей родов семейства розовых *Malus* либо отсутствовал (*Spiraea*), либо выявлялся в очень незначительных количествах (*Pyrus* и *Sorbus*). Данные результаты показывают, что накопление *Malus* в геноме *Malus* стало происходить после отделения от *Pyrus* [23].

Также был описан новый аллель гена *Md-ACS3a* – *Md-ACS3a-ACS3a-G289V*. Полиморфизм одного нуклеотида в кодирующем регионе *ACS3a-G289V* приводит к замене одной аминокислоты (глицин-289/валин) в активном сайте белка, что инактивирует фермент [23]. Более того, эта нуклеотидная замена не свойственна другим ранее изученным растениям [26].

Секвенирование кДНК позволило выявить ещё один нуль аллель гена *Md-ACS3a*, *Mdacs3a*, транскрипции которого не происходит. Различия между *Md-ACS3a* и *Mdacs3a* до сих пор не ясны, промоторные области аллелей идентичны, таким образом различия необходимо искать намного дальше от промоторного региона. Так, Matarasso с соавторами (2005) показал, что Cys-протеаза регулирует у томатов экспрессию *LeACS2*, ассоциированного с синтезом этилена, связываясь с цис-регуляторным элементом (ТААААААТ мотив), а Cys-протеаза индуцируется созреванием плодов. Анализ последовательностей аллелей *Md-ACS3a* показал, что они тоже содержат ТААААТ мотив [27]. Необходимо также учитывать и другие факторы, регулирующие экспрессию генов, например, метелирование ДНК.

Таким образом, *Md-ACS3a* неактивен в сортах, несущих комбинации *ACS3a-G289V/ACS3a-G289V* и *acs2a/ACS3a-G289V*. Сорта, несущие гетерозиготу *ACS3a/ACS3a-G289V*, выделяют среднее количество этилена, а сорта с комбинацией *ACS3a/acs3a* – совсем мало. Большое количество этилена выделяется сортами с аллельной комбинацией *ACS3a/ACS3a* [23].

Из семейства генов *Md-ACS* у яблони идентифицированы индуцирующиеся созреванием [16], ауксином [28], постоянно экспрессирующиеся [20, 17] и экспрессирующиеся в ответ на поранение [12] гены этого семей-

ства. Гены *Md-ACS5A* и *Md-ACS5B* экспрессируются в ответ на поранение. Они были идентифицированы с использованием вырожденных олигонуклеотидных праймеров к консервативному участку *ACS* из фракции мРНК пораненных листьев яблони. Анализ этих двух последовательностей показал, что они гомологичны между собой на 85,9%. Сравнение с другими генами АЦК-синтазы выявило следующую гомологию: 55%, 75% и 58% с *Md-ACS1*, *ACS2* и *ACS3*, соответственно [12].

Дополнительные молекулярные механизмы регуляции должны объясняться наличием других генов, вовлечённых в синтез этилена в плодах яблони, таких как *Md-ACO*, *Md-ETR1* и множество других.

Генетический контроль синтеза АЦК-оксидазы. Изучение экспрессии гена АЦК-оксидазы яблони и его роли в созревании плодов давно вызывало бурный научный интерес. Были изучены промотор гена, фенотип растений, модифицированных антисмысловым геном *Md-ACO*, активность очищенного фермента, рекомбинантные протеины. Первый обнаруженный ген АЦК-оксидазы был назван *Md-ACO1* [клон рАР4, [29] и клон рАЕ12 [30]]. В дальнейшем, были идентифицированы три других *Md-ACO* гена – *Md-ACO2*, *Md-ACO3* и *Md-ACO4* [31, 18].

Сравнение нуклеотидных последовательностей *Md-ACO* генов показало, что кодирующая последовательность *ACO1* и *ACO2* идентичны на 93,3%, в то время как *ACO1* и *ACO3* идентичны на 78,5%, а *ACO2* и *ACO3* – на 77,8%. Сравнение 3'-некодирующего региона показало, что последовательности этих генов ещё больше отличаются друг от друга [32].

Методом саузерн блоттинга было выявлено, что *Md-ACO1* присутствует в виде двух копий в геноме – клон *Md-ACO1* рАР4а на 5 хромосоме, клон рАР4b – на 10, а *Md-ACO2* представлен в виде одной копии [32].

Анализ экспрессии *Md-ACO1* показал, что ген экспрессируется в зрелых плодах, его продукт практически не встречается в молодых плодах и

совсем не экспрессируется в листьях. *Md-ACO2*, *Md-ACO3* и *Md-CO4* экспрессируются в тканях и молодых и старых листьях, в то время как *Md-ACO3* – больше в тканях молодых листьев, *Md-ACO2* (обычно вместе с *Md-ACO1*) – преимущественно в зрелых плодах.

Экспрессия *Md-ACO4* и *Md-ACO3* в 10 раз выше в листьях, чем в зреющих плодах, и экспрессия первого остаётся неизменной в процессе созревания, в то время как *Md-ACO3* уменьшается в 10 раз [31]. Не один из *Md-ACO* генов не связан с генами старения SAG (senescence associated gene), но *Md-ACO3* и *Md-ACO2* могут быть связаны с генами фотосинтеза PAG (photosynthetic associated gene) [33].

Рецепция и передача этиленового сигнала. После синтеза, этилен воспринимается семейством мембранных рецепторов (ETR1). При связывании с этиленом, эти рецепторы подвергаются конформационным изменениям и затем взаимодействуют с негативным регулятором передачи этиленового сигнала CTR1. Затем сигнал передаётся по изученным в общих чертах биохимическим путям, которые, в конечном счете, и осуществляют всё то множество важнейших функций, которые выполняет этилен [13].

Большой вклад в понимание механизмов передачи этиленового сигнала и ответа был сделан при изучении резуховидки таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh). Понимание линейного каскада передачи этиленового сигнала, включающего в себя ETR1 (Ethylene Response1 – этиленовый ответ) и другие этиленовые рецепторы, RAN1 (Responsive-to-antagonist1 – ответ на антагониста), CTR1 (Constitutive Triple Response1 – конструктивный тройной ответ), EIN2 (Ethylene Insensitive2 – этилен нечувствительность), EIN3 и EILs (EIN3-подобный) и ERF1 (Ethylene response factor1 – фактор этиленового ответа) сильно усложнилось, так как последние исследования показывают вовлечённость в передачу этиленового сигнала и ответ на него регуляторов из других путей биосинтеза, таких как, механизмы обратной связи и элементы системы обмена белков [34] (рис. 2).

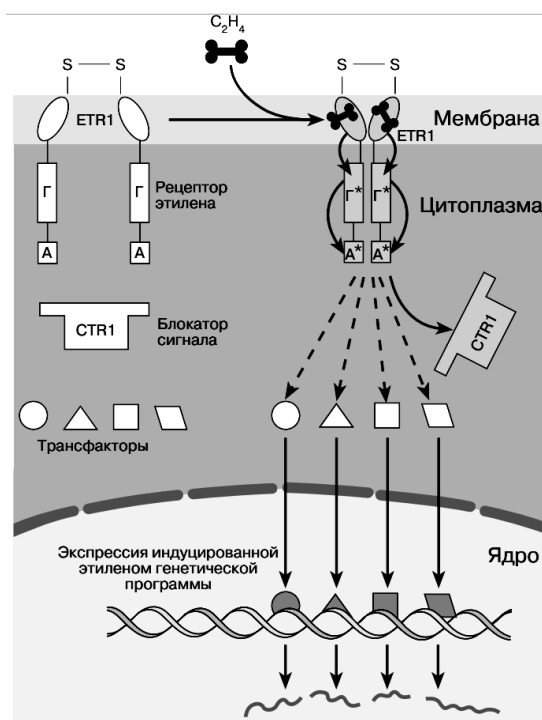


Рис. 2. Гипотетическая схема передачи этиленового сигнала у растений.

ETR1 – димерный белок рецептора этилена; CTR – блокатор этиленовой программы, который инактивируется сигналом с ETR1. Пунктиром показана предполагаемая передача сигнала на трансфакторы, которые в результате этого приобретают способность взаимодействовать с регуляторными элементами этилен-зависимых генов и вследствие этого включать их активность (по Кулаевой, 1998)

Следует отметить очень важное исследование, связанное с открытием белка RTE1 – Reversion-to-Ethylene Sensitivity1 (Реверсия чувствительности к этилену) – который является высоко консервативным мембранным протеином растений и специфически взаимодействует с ETR1, регулируя передачу этиленового сигнала у *Arabidopsis* [35]. Более того, GR (Green Ripe – зелёный спелый), ортолог RTE1, напрямую вовлечён в передачу этиленового сигнала и созревание у томата в первичной ткани плода [36].

У яблони на сегодняшний день обнаружены и изучены гены, вовлечённые в созревание и опадение молодых незрелых яблок – шесть генов рецепторов этилена *Md-ETR1a*, *Md-ETR1b*, *Md-ETR2*, *Md-ETR5*, *Md-ERS1*, *Md-ERS2* и один ген негативного регулятора передачи этиленового сигнала – *Md-CTR1*. Изучение этиленовых рецепторов сконцентрировано на пони-

мании их влияния на срок годности яблок, измеряя количество мРНК этих генов и/или кодируемого ими белка [23, 31]. Также изучался уровень транскрипции *Md-ETR1* и *Md-ERS1* в исследованиях по изучению рецепции этилена при опадении незрелых яблок [14].

По аналогии с другими растениями, негативный регулятор CTR1 скорее всего кодируется в геноме яблони несколькими генами, но на сегодняшний день обнаружен только один *Md-CTR1*. Уровень экспрессии *Md-CTR1* не сильно варьируется у различных сортов яблок [14, 31].

Попытки изучения *Md-EIN2* ограничены тем, что на сегодняшний день не удалось получить полноразмерную кДНК гена. Тем не менее, два гена, *Md-EIN2a* и *Md-EIN2b*, были обнаружены при скрининге геномной библиотеки [31]. Уровень транскрипции этих генов в различных сортах на различных стадиях развития примерно одинаков.

Три EIN3-подобных гена, *Md-EIL1*, *Md-EIL2* и *Md-EIL3* были описаны у яблони [37]. Экспрессия *Md-EIL1* и *Md-EIL3* оставалась на одинаковом уровне в процессе созревания плодов, но уровень мРНК *Md-EIL2* прогрессивно увеличивался в процессе развития плода и достигал пика к моменту зрелости [37]. Это позволяет сделать вывод, что *Md-EIL2* может влиять на чувствительность к этилену в процессе созревания плодов больше, чем другие EIN3-подобные гены.

Несмотря на то, что биосинтез этилена изучается достаточно давно, по-прежнему мало известно о механизме передачи сигнала от рецепторов этилена. Экспрессия генов, связанных с созреванием плодов и кодирующих ферменты, модифицирующие клеточные стенки, индуцируется посредством передачи этиленового сигнала от рецепторов соответствующим транскрипционным факторам. Этиленотверженные факторы – ERF (Ethylene response factor) – это белки, выступающие в роли транс-факторов на последнем этапе передачи этиленового сигнала в ядре клетки и имеющие ДНК-связывающий домен. Из зрелых плодов яблони были выделены два

гена этиленотвественных факторов – *Md-ERF1* и *Md-ERF2*. Первый экспрессируется преимущественно в зреющих плодах, в то время как второй – только в зреющих плодах. Прослеживается явная тенденция, при которой экспрессия генов *Md-ERF* значительно ниже у сортов в низком уровне выделения этилена и выше у сортов с высоким уровнем выделения этилена соответственно.

Последовательности ортолога RTE1 или GR яблони, *Md-RTE1a* и очень близкий к нему паралог *Md-RTE1b*, были найдены в 2010 году Velasco с соавторами. Скринируя библиотеку кДНК сорта Голден Делишес последовательностью *Md-RTE1a* не привело к обнаружению ETR1-подобного рецептора этилена. Вместо этого были обнаружены два предполагаемых члена большого семейства генов-факторов транскрипции NAC (NAM/ATAF1, 2/CUC2), названные *Md-NAC1* и *Md-NAC2*, которые взаимодействовали с *Md-RTE1a* и *Md-RTE1b*. NAC белки – большое семейство факторов транскрипции, регулирующих различные биологические процессы, включая ответ на стресс, рост, развитие и передачу сигналов основных гормонов у растений.

Было показано, что экспрессия *Md-RTE1b* и *Md-NAC2* регулируется этиленом, а уровень транскрипции *Md-RTE1a* и *Md-NAC1* остаётся низким на любой стадии созревания, что говорит об их непричастности к передаче этиленового сигнала [38].

Несвязанные с синтезом этилена гены, влияющие на лёжкость плодов. Наряду с генами, непосредственно связанными с синтезом этилена и передачей этиленового сигнала, необходимо учитывать активность и других генов, влияющих на старение и лёжкость плодов. Известно влияние генов, кодирующих гидролазы. Так, например, ген *Md-Cell1* кодирует фермент б-1,4-глюканазу (целлюлаза или EG), ответственную за деградацию клеточных стенок зрелых плодов. Гены *Md-PG1* и *Md-PG2* кодируют фер-

мент полигалактуроназу (PG). Под воздействием PG происходит разрушение полимерных молекул пектина клеточных стенок путем гидролиза. Гидролиз молекул пектина приводит к изменению структуры клеточных стенок и ухудшению реологических свойств плодов. Также PG играет важную роль в опадении плодов [39].

Размягчение плодов происходит также в результате деполимеризации различных классов полисахаридов. Основным ферментом, участвующим в этом процессе, являются экспансины. На сегодняшний день у яблони известно 7 экспансиновых генов, и именно ген *Md-Exp7* связан с размягчением плодов. В 2007 году Costa с соавторами [40] разработали функциональный маркер этого гена, основанный на микросателлитном повторе, позволяющий различать аллельные наборы, соответствующие различному уровню синтеза экспансина 7 и, соответственно, плотности плодов яблони.

QTL, ассоциированные с признаками качества плодов. Появление новых подходов к генетическому анализу признаков, например основанных на картировании локусов количественных признаков (QTL), открывает большие перспективы для улучшения качества плодовой продукции. Несомненно, что большинство качественных признаков плодов имеют мультигенный контроль и картирование QTL позволяет локализовать на генетической карте локусы, отвечающие, по крайней мере, частично, за фенотипические вариации и позволяет определить количество возможных вариаций.

При изучении сегрегирующих популяций яблони, были выявлены QTL плотности и структуры плодов в группах сцепления LG01, LG08, LG10, LG15 и LG16 (26). Локус *Md-ACO1* был картирован в группе сцепления LG10, локус *Md-ACS1* – в группе сцепления LG15 [18].

Разделение всех плодов на климактерические и неклимактерические позволяет охарактеризовать темпы созревания и способность к хранению.

Изучение наследования признака «климактерический» возможно благодаря наличию генетически совместимых типов климактерической (Шарантская дыня (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* cv. *Ve´drantais*) и неклимактерической дыни Songwhan Charmi PI 161375 (*Cucumis melo* var. *chinensis*). Было обнаружено, что признак «климактерический» контролируется двумя дублирующимися и независимыми локусами *Al-3* и *Al-4* и интенсивность выделения этилена контролируется как минимум четырьмя QTL, расположенными в других областях генома [41]. Генам передачи этиленового сигнала или биосинтеза этилена не соответствует ни один QTL.

В другом исследовании сообщается, что некоторые гибридные линии двух неклимактерических дынь ‘Piel de Sapo’ (var. *inodorus*) x ‘Songwhan Charmi’ PI 161375 (var. *chinensis*) проявляют климактерические признаки. QTL, связанный с синтезом этилена и уровнем респирации в этой работе не был картирован в позиции локуса *Al*, описанного Perin с соавторами (2002) [42]. В общем, эти данные говорят о том, что признак «климактерический» имеет сложный и комплексный генетический контроль.

Среди климактерических фруктов имеются генетические различия в способности индуцировать процесс созревания. Наиболее ярким примером могут служить плоды, требующие после сбора обработки холодом для созревания. Некоторым видам зимних груш требуется низкая температура для индукции автокаталитической продукции этилена. Более того, потребность в низкой температуре для созревания – наследуемый признак. Потребность в холоде, скорее всего, связана с возможностью индуцирования генов биосинтеза этилена.

У сорта груши Passe Crassane, трёх месячное охлаждение до 0°С сильно стимулирует активность АЦК-оксидазы и, в меньшей степени, АЦК-синтазы [10]. Также было показано, что наличие некоторых ACS аллелей коррелирует с потребностью в низких температурах для созревания и с индуцированием автокаталитической индукции этилена [43].

Улучшение качества плодов происходило в некоторых случаях случайно, как в случае с сортом Голден Делишес. Этот сорт скрещивали со стародавними сортами яблони с хорошими органолептическими качествами с целью получить плоды с высокими органолептическими и товарными качествами. Таким же образом плохо сохраняющий свои качества сорт Делишес был улучшен скрещиванием с лёжким сортом Раллс Дженет, что дало начало новой группе сортов Фуджи. Позднее созревание плодов растений, несущих данный генотип, вызывается различными аллелотипами генов синтеза этилена или этиленового ответа.

Количество выделяемого этилена плодами яблони сорта Фуджи находится в чётком соответствии с уровнем транскрипции гена *Md-ACS1* [17]. Уровень транскрипции аллеля *Md-ACS1-2*, из-за вставки ретротранспозона, значительно ниже транскрипции *Md-ACS1-1*.

Сорта, имеющие гомозиготу *Md-ACS1-2*, выделяют значительно меньше этилена и способны храниться дольше [17]. Более того, два гена белка этиленового ответа (ERF) – *Md-ERF1* и *Md-ERF2*, первый из которых экспрессируется преимущественно в зреющих плодах, а второй – только в них, экспрессируются значительно меньше в плодах с низким уровнем выделения этилена [38]. Была выявлена корреляция между уровнем выделения этилена и уровнем экспрессии представителей большого семейства генов АКЦ-синтазы и АЦК-оксидазы яблони.

Аллельные различия большинства генов, связанных с синтезом этилена, его рецепцией и передачей этиленового сигнала известны. Существуют молекулярные маркеры функциональных и нуль-аллелей данных генов, позволяющие их идентифицировать в геноме яблони.

Заключение. Таким образом, становится возможным вести маркерную селекцию яблони направленную на создание конкурентоспособных сортов с хорошей лёжкостью плодов. В Северо-Кавказском зональном

НИИ садоводства и виноградарства проводятся широкомасштабные исследования, направленные на изучение аллельного разнообразия генов, определяющих синтез этилена в отечественном генофонде культуры. На основании полученных данных реализуется селекционная программа по созданию сортов яблони, несущих сочетание аллелей *Md-ACS1* 2/2 + *Md-ACO1* 1/1, обуславливающее высокую степень лежкости плодов, с учётом аллельного набора по генам *Md-PG1* и *Md-Exp7*, детерминирующим структуру и плотность мякоти плода.

Литература

1. Tucker, G.A. Introduction. In: Biochemistry of fruit ripening / G.B. Seymour, J.E. Taylor, G.A. Tucker (eds.). Chapman & Hall, London, 1993. – P. 3–51.
2. Bouzayen, M. Mechanism of Fruit Ripening. In: Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives, Volume 1 / E. C. Pua, M. R Davey. (eds.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2010. – P. 319–334.
3. Kidd, F. Changes in the respiratory activity of apples during their senescence at different temperatures. In: Physiology of fruit / F. Kidd, C. West. I. Proc. R. Soc. Lond. B., 1930. – V. 106. – P. 93–109.
4. Rose, J.K.C. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit / J. K. C. Rose, K. A. Hadfield, J. M. Labavitch, A.B. Bennett // Plant Physiol. – 1998. – V. 117. – P. 345–361.
5. Blankenship, S.M. 1-Methylcyclopropene: a review / S. M. Blankenship, J. M. Dole // Postharv. Biol. Technol. – 2003. – V. 28. – P. 1–25.
6. Sisler, E.C. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments / E.C. Sisler, M. Serek // Physiologia Plant. – 1997. – V. 100. – P. 577–582.
7. Watkins, C.B. Effects of Delay between Harvest and 1-Methylcyclopropene Treatment, and Temperature during Treatment, on Ripening of Air-stored and Controlled-atmosphere-stored Apples / C.B. Watkins, J.F. Nock // HortScience. – 2005. – V. 40(7). – P. 2096–2101.
8. Pech, J.-C. Ethylene and fruit ripening / J.-C. Pech, E. Purgatto, M. Bouzayen [et al.] // Annual Plant Reviews Volume 44 – The Plant Hormone Ethylene. Blackwell Publishing Ltd., 2012. – P. 275–296.
9. McMurchie, E. J. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene / E. J. McMurchie, W. B. McGlasson, I. L. Eaks // Nature. – 1972. – V. 287. – P. 235–236.
10. Lelievre, J.M. Ethylene and fruit ripening / J.M. Lelievre, A. Latche, B. Jones, [et al.] // Physiol. Plant. – 1997. – V. 101. – P. 727–739.
11. Adams, D.O., Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene / D.O. Adams, S.F. Yang // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1979. – V. 76. – P. 170–174.
12. Dong, J.G. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit / J.G. Dong, J.C. Fernandez-Maculet, S.F. Yang // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – V. 89. – P. 9789–9793.

13. Кулаева, О.Н. Этилен в жизни растений / О.Н. Кулаева // Соровский образовательный журнал. – 1998. – № 11. – С. 78-84.
14. Dal Cin, V. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borkh) / V. Dal Cin, M. Danesin, A. Boschetti [et al.] // J. Expt. Bot. – 2005. – V. 56. – P. 2995–3005.
15. 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 [et al.] // Planta. – 1991. – V. 185. – P. 38–45.
16. Lay-Yee, M. A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple (accession no. L31347) / M. Lay-Yee, M. L. Knighton // Plant Physiol. – 1995. – V. 107. – P. 1017–1018.
17. 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 [et al.] // Plant Physiol. – 1999. – V. 119. – P. 1297–1304.
18. 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 [et al.] // Euphytica. – 2005. – V. 141. – P. 181-190.
19. Sato, T. Allelotype of a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene defines the rate of fruit drop in apple / T. Sato, Y. Wakasa, T. Kudo [et al.] // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2004. – V. 129. – P. 32–36.
20. Rosenfield, C.-L. MdACS-2 (Accession No. U73815) and MdACS-3 (Accession No. U73816): Two New 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthases in Ripening Apple Fruit (PGR96-122) / C.-L. Rosenfield, E. Kiss, G. Hrazdina // Plant Physiol. – 1996. – V. 112. – P. 1735.
21. Galli, Z. Inhibition of ethylene biosynthesis in apple and taxonomical comparison of different *Festuca* species using molecular methods: Ph. D. thesis. – Corvinus University of Budapest, Gödöllő, 2004.
22. Theologis, A. Ethylene sensors: How perceptive! / A. Theologis // Science. – 1995. – V. 270. – P. 1774.
23. Wang, A. Null Mutation of the MdACS3 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. [et al.] // Plant Physiology, 2009. – V. 151. – P. 391–399.
24. Bureau, T.E. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes / T.E. Bureau, P.C. Ronald, S.R. Wessler // Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. – V. 93. – P. 8524–8529.
25. Wessler, S. R. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes / S. R. Wessler, T. E. Bureau, S. E. White // Curr. Opin. Genet. Dev., 1995. – V. 5. – P. 814–821.
26. Itai, A. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) / A. Itai, K. Kawata, K. Tanabe. [et al.] // Mol. Gen. Genet., 1999. – V. 261. – P. 42–49.
27. Matarasso, N. A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression / N. A. Matarasso, S. Schuster, A. Avni // Plant Cell, 2005. – V. 17. – P. 1205–1216.
28. Kim, W.T. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots / W. T. Kim, A. Silverstone, W. K. Yip. [et al.] // Plant Physiol., 1992. – V. 98. – P. 465-471.

29. Sunako, T. MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), Two Wound-Responsive Genes Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Apple. (PGR00-030) / T. Sunako, R. Ishikawa, M. Senda. [et al.] // Plant Physiol., 2000. – V. 122. – P. 620.
30. Ross, G.S. An ethylene-related cDNA from ripening apples / G.S. Ross, M.L. Knighton, M. Lay-Yee // Plant Molecular Biology, 1992. – V. 19. – P. 231–238.
31. 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. Lu. [et al.] // Postharvest Biology and Technology, 2007. – V. 44(3). – P. 204–211.
32. Binnie, J.E. Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh / J. E. Binnie, M. T. McManus // Phytochemistry, 2009. – V. 70(3). – P. 348–360.
33. Binnie, J.E. Characterization of ACC Oxidase from the Leaves of *Malus domestica* Borkh. (Apple). A Ph.D thesis. Institute of Molecular BioSciences, New Zealand, 2007.
34. Stepanova, A. N. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet / A. N. Stepanova, J. M. Alonso // Current Opinion in Plant Biology, 2009. – V. 12(5). – P. 548–555.
35. Rivarola, M. ETR1-Specific Mutations Distinguish ETR1 from Other Arabidopsis Ethylene Receptors as Revealed by Genetic Interaction with RTE1 / M. Rivarola, C. A. McClellan, J. S. Resnick. [et al.] // Plant Physiology, 2009. – V. 150(2). – P. 547–551.
36. Barry, C. S. Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling / C. S. Barry, J. J. Giovannoni // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. – V. 103(20). – P. 7923–7928.
37. Tacken, E. The Role of Ethylene and Cold Temperature in the Regulation of the Apple POLYGALACTURONASE1 Gene and Fruit Softening / E. Tacken, H. Ireland, K. Gunaseelan. [et al.] // Plant Physiology, 2010. – V. 153(1). – P. 294–305.
38. Wang, A. Characterization of Two Orthologs of REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1 in Apple / A. Wang, K. Xu // Journal of Molecular Biology Research, 2012. – V. 2(1). – P. 24–41.
39. Wakasa, Y. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential / Y. Wakasa, H. Kudo, R. Ishikawa. [et al.] // Postharvest Biol. Technol., 2006. – V. 39. – P. 193–198.
40. Costa, F. 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*) / F. Costa, W. E. Van de Weg, S. Stella, L. Dondini. [et al.] // Tree Genetics & Genomes, 2008. – V. 4. – P. 575–586.
41. Seymour, G.B. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture / G.B. Seymour, K. Manning, E.M. Eriksson. [et al.] // J Ex Bot, 2002. – V. 53. – P. 2065–2071.
42. Perin, C. Molecular and genetic characterisation of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit / C. Perin, M.C. Gomez-Jimenez, L. Hagen. [et al.] // Plant Physiol., 2002. – V. 129. – P. 300–209.
43. Blankenship, S.M. Development of ethylene biosynthesis and ethylene-induced ripening in D'Anjou pears during the cold requirement for ripening / S. M. Blankenship, D.R. Richardson // J. Am. Soc. Hort. Sci., 1985. – V. 107. – P. 807–812.