

УДК 575.174.015.3

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТА ГЕНА КИСЛОЙ ВАКУОЛЯРНОЙ ИНВЕРТАЗЫ *PAIN-1* У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

© 2014 г. М.А. Слугина^{1,2}, Е.З. Кочиева^{1,2}¹ Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва, Россия;² Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, кафедра биотехнологии, Москва, Россия, e-mail: ekochieva@yandex.ru

Поступила в редакцию 9 сентября 2014 г. Принята к публикации 1 октября 2014 г.

Фермент кислая вакуолярная инвертаза *Pain-1* определяет содержание крахмала и сахаров в клетках, а также участвует в формировании ответной реакции растения на воздействие абиотического стресса. Впервые охарактеризована переменность фрагмента (экзон V–экзон VII) гена *Pain-1* у 19 сортов картофеля российской и зарубежной селекции. Выявлено 25 полиморфных нуклеотидных позиций. Детектирован ранее не описанный SNP C₁₈₉₅ в экзоне VII. 5 из 8 SNPs, детектированных в экзонах, приводили к аминокислотным заменам, три из которых были радикальными. Также были выявлены три аминокислотные замены в последовательности консервативного C-терминального гликозилгидролазного домена.

Ключевые слова: сорта картофеля, кислая вакуолярная инвертаза, аллельная переменность, нуклеотидный и аминокислотный полиморфизм.

ВВЕДЕНИЕ

Инвертазы – группа ферментов, осуществляющих необратимый гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Инвертазы играют важную роль в метаболизме углеводов и распределении источников углерода между фотосинтезирующими тканями растений и гетеротрофными органами, такими как семена, клубни и плоды (Elliott *et al.*, 1993). Показано, что работа ферментов углеводного метаболизма, в частности растительных инвертаз, играет важную роль в формировании устойчивости к воздействию биотических и абиотических стрессовых факторов, таких как засуха, холод и засоление (Draffehn *et al.*, 2010).

Всего у растений обнаружены три типа инвертаз, кодируемых тремя небольшими генными семействами: инвертазы, связанные с клеточной стенкой и расщепляющие сахарозу в апопласте (апопластические инвертазы); растворимые кислые инвертазы, локализованные в вакуолях (вакуолярные инвертазы);

цитоплазматические растворимые нейтральные инвертазы (Ji *et al.*, 2005).

Кислая вакуолярная инвертаза, кодируемая геном *Pain-1*, участвует в регуляции накопления сахарозы в вакуоли, влияет на растяжение клеток и формирование ответа на воздействие гормонов. Принято считать, что активность кислых инвертаз в значительной степени регулируется стрессовыми факторами среды (Koch, 2004; Ruan *et al.*, 2010; Alpacete *et al.*, 2011). Так, показано, что активность кислой вакуолярной инвертазы повышается в пострадавших от насекомых листьях и гетеротрофных органах (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012). Более того, предполагается, что данный сахаролитический фермент совместно с сахарозосинтазами может иметь значение в распределении запасов углерода, что способствует сохранению роста при потере листьев (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012).

В настоящее время у представителей сем. Solanaceae гены кислой вакуолярной инвертазы идентифицированы только у картофеля *Solanum tuberosum* и двух видов томата (*S. lycopersicum* и

S. pimpinellifolium). Гены вышеперечисленных видов растений имеют протяженность более 4 т.п.н. и состоят из 7 экзонов и 6 интронов. Изучение полиморфизма генов инвертаз у картофеля и томата выявило значимую корреляцию, особенно гена *Pain-1*, с содержанием полисахаридов в плодах и клубнях, а также с общей адаптивностью растений к стрессовым условиям (Ji *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Draffehn *et al.*, 2010). С использованием сравнительного анализа последовательностей *Pain-1* у растений *S. tuberosum* с 6 гетерозиготными генотипами (3 тетраплоидных и 3 диплоидных) найдены 11 различных аллельных вариантов, в разной степени связанных с превращением и накоплением крахмала (Draffehn *et al.*, 2010). Таким образом, выявление аллельных вариантов генов у широкого круга разнообразных сортов картофеля может иметь практическое значение, заключающееся в идентификации нуклеотидных и аминокислотных замен,

ассоциированных с хозяйственно важными признаками.

Целью данной работы являются описание нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма последовательностей кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у различных сортов картофеля российской и зарубежной селекции и оценка их аллельного разнообразия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения аллельного полиморфизма генов кислой вакуолярной инвертазы был составлен набор из 19 сортов картофеля российской и зарубежной селекции, различающихся по содержанию крахмала в клубнях и устойчивости к абиотическим факторам (табл. 1).

Выделение ядерной растительной ДНК производили по методике, описанной ранее (Слугина и др., 2013). Для амплификации анализируемого фрагмента гена *Pain-1* у сортов кар-

Таблица 1

Сорта картофеля, выбранные для исследования

Сорт	Страна	Крахмалистость, %*	Засухо-устойчивость*	Холодо-устойчивость*
Ресурс	Россия	13–16	+	
Петербургский	Россия	13–16	–	
Невский	Россия	10–12	+	
Чародей	Россия	15–17	+	
Любимец	Россия	11–15		+
Брянский ранний	Россия	14–16	–	+
Голубизна	Россия	17–19	+	
Яхонт	Белоруссия	–		
Атлант	Белоруссия	17–22		
Ласунак	Белоруссия	15–22	–	
Лазурит	Белоруссия	14–16		
Явар	Белоруссия	10–13		
Бинтье	Голландия	различная		
Никита	Голландия	13,5–18		
Дезире	Голландия	13–21	–	
Гранола	Германия	низкая–средняя		
Адретта	Германия	13–18	–	
Фрегата	Польша	14–16		
Руссет Бурбанк	США	высокая		

* Данные по: Симаков и др., 2010.

тофеля была разработана пара праймеров: IV5F (5'CGGAATTGGATTGTGGAATTG3') и IVendR (5'CGGTTTCCAGGAACCCATACATT3').

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1× буфер (50 мМ Tris Cl (pH = 8,6), 50 мМ KCl, 0,1 % Tween 20 («Диалат», Москва)), 1,5 М MgCl₂, 20 мМ dNTP; 10 мкМ соответствующего праймера; 0,25 единиц Taq полимеразы и ~100 нг геномной ДНК. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: 1) первый цикл: 94 °С – 5 мин; 2) последующие 35 циклов: 94 °С – 30 с, 57,5 °С – 40 с и 72 °С – 1 мин. После окончания последнего цикла смеси дополнительно выдерживали 10 мин при 72 °С для достройки незавершенных цепей, затем 5 мин при 10 °С. Анализ полученных продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1 %-м агарозном геле. Результаты документировали в системе BioDoc II (Biometra, Германия).

Полученные фрагменты секвенировали с использованием тех же праймеров, что и для амплификации. Секвенирование проводили с использованием реагентов ABI PRISM Dye Deoxi terminator sequencing kit («Applied Biosystems», США), согласно протоколу фирмы-производителя на автоматическом секвенаторе ABI 310 capillary DNA Analyzer («Applied Biosystems», США) в Центре «Биоинженерия» РАН.

Выравнивание и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 5.0 (Kumar, 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Pain-1* (экзон V – стоп-кодон). Для анализа аллельного полиморфизма *Pain-1* выбран наиболее вариабельный фрагмент гена в интервале с V по VII экзон (Слугина. Личные данные), который включал последовательность функционального С-терминального домена и для которого ранее была показана возможная связь аллельного полиморфизма с хозяйственно ценными признаками (Draffehn *et al.*, 2010).

При использовании разработанных праймеров IV5F и IVendR у 19 сортов картофеля амплифицированы и секвенированы фрагменты гена *Pain-1*. Доступная для анализа последовательность содержала экзон V–интрон V–экзон IV–интрон IV–экзон IIIV (до стоп-кодона) (рис.).

Было показано, что идентифицированные последовательности фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы у анализируемых сортов картофеля инвариантны по длине (707 н.п.), за исключением сорта Брянский ранний (697 п.н.), у которого выявлены 11-нуклеотидная делеция (CAAGCTTATAT) и мононуклеотидная инсерция (T) в интроне VI. Общий уровень полиморфизма составил 3,53 %. Как и ожидалось, в составе исследованной последовательности полиморфизм интронов был выше полиморфизма экзонов: 6,75 и 1,91 % соответственно.

Наибольший интерес при проведении данного исследования представлял анализ вариабельности экзонов, так как именно такие замены могут потенциально привести к изменению конформации нативного белка, что может отразиться на его функции. Ранее на широкой выборке из 219 образцов картофеля, включающих тетраплоидные сорта Satina, Diana, Theresa, диплоидные и селекционные линии, было выявлено 28 единичных точковых замен (SNP) в нуклеотидной последовательности гена *Pain-1* и 11 аллельных вариантов белка кислой вакуолярной инвертазы (Draffehn *et al.*, 2010). Из 28 ранее идентифицированных нуклеотидных замен 25 SNP были детектированы в анализируемом фрагменте (экзон V–VII) гена *Pain-1*. Было показано, что определенные нуклеотидные замены в первичной последовательности *Pain-1* могут быть ассоциированы с хозяйственно ценными признаками, такими как повышенное содержание крахмала и качество клубней (Draffehn *et al.*, 2010).

Из 25 SNP, обнаруженных в анализируемых последовательностях сортов российской и зарубежной селекции, 8 замен локализовались в экзонах. При этом следует заметить, что в экзоне VII был выявлен новый SNP C₁₈₉₅: ранее по этому положению детектировались только A/G. Всего у анализируемых сортов картофеля было идентифицировано 9 аллельных вариантов *Pain-1* (табл. 2).

Как видно из табл. 2, большая часть образцов представлена двумя основными аллельными вариантами: А и В. При этом два преобладающих аллельных варианта различаются по SNP₁₈₉₅, а также гетерозиготой C/A₁₅₄₄. Как в группу А, так и в группу В входят виды как с высоким, так и с низким содержанием крахмала. Остальные

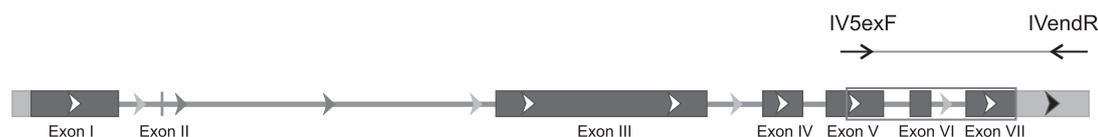


Рис. Анализируемый фрагмент гена *Pain-1*.

аллельные варианты были выделены только у некоторых сортов.

Ранее было показано, что SNP A₁₅₄₄ считается наиболее значимым, так как коррелирует с повышенным содержанием и выходом крахмала клубней (Draffehn *et al.*, 2010). Среди рассматриваемого в данной работе набора образцов аллельный вариант A₁₅₄₄ присутствовал в последовательности гена *Pain-1* сорта российской селекции Брянский ранний. Сорт раннеспелый, содержание крахмала в нем относительно высокое – 14–16 %. Отличительной чертой данного

сорта является повышенная холодоустойчивость: сорт успешно переносит переохлаждение при хранении и ранний посев (Симаков и др., 2010). Можно предположить, что столь высокие качественные характеристики данного сорта могут иметь ассоциацию с SNP A₁₅₄₄ в гене инвертазы *Pain-1*. Ряд сортов (Яхонт, Явар, Фрегата, Дезире, Руссет Бербанк, Атлант, Ласунак), большинство из которых характеризуются высоким содержанием крахмала в клубнях (Симаков и др., 2010), оказались гетерозиготами, при этом преобладающим аллелем является C₁₅₄₄, но помимо него

Таблица 2

SNP в экзонах и аминокислотные замены

Экзон	Экзон V				Экзон VI	Экзон VII			Аллельный вариант
	№ нуклеотида на кДНК	snp1574	snp1596	snp1629		snp1843	snp1895	snp1896	
Нуклеотидная замена	C/A	A/T	T/C	T/C	A/G	G/T	G/A	A/G	
Аминокислотная замена	T515K	Y525F			Q554R	A615S	R632Q		
Гранола	C	A/T	C	C	A	T	A	A	A
Адретта	C	A	C	C	A	T	A	A	
Бинтье	C	A	C	C	A	T	A	A	
Никита	C	A	C	C	A	T	A	A	
Чародей	C	A	C	C	A	T	A	A	
Любимец	C	A	C	C	A	T	A	A	
Яхонт	C/A	A	C	C	A	T	C	A	B
Атлант	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Ласунак	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Явар	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Фрегата	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Руссет Бурбанк	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Петербургский	C	A	C	C	A	T	A	G	C
Голубизна	C	T	C	C	A	G	G	A	D
Лазурит	C	A	C	C	A	G	G	A	E
Дезире	C/A	A	T	T	A	G	C	A	F
Невский	C	A	T	T	A	G	G	G	G
Брянский ранний	A	A	T	T	A	G	G	A	H
Ресурс	C	T	T	T	G	G	G	A	I

в их геноме присутствует аллель инвертазы с заменой A₁₅₄₄ (соотношение 1 : 3). Этот факт представляет интерес, так как данная группа образцов может быть использована в селекции для создания холодоустойчивых сортов с повышенным содержанием крахмала.

Анализ аминокислотной последовательности. Фермент кислая вакуолярная инвертаза относится к гликозид гидролазному семейству белков 32 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEV46297.1>). Ферменты данного семейства обладают либо гидролазной, либо гликозилтрансферазной активностью. Фрагмент пептида, включающий аминокислоты с 506 по 586, соответствует С-терминальному домену гликозилгидролаза, который формирует бета-сэндвич модуль белка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEV46297.1>).

Рассматриваемый в данной работе участок нуклеотидной последовательности был транслирован, и было показано, что данный фрагмент кислой вакуолярной инвертазы соответствует последовательности белка, включающей аминокислоты с 483 по 639, и, таким образом, содержит полную последовательность С-терминального гликозилгидролазного домена.

Подобно анализу варибельности последовательности гена *Pain-1*, проведен анализ полиморфизма аминокислотного состава. Ранее на данном фрагменте инвертазы идентифицировано 15 аминокислотных замен (Draffehn *et al.*, 2010). Пять из них встречаются у анализируемых сортов картофеля (табл. 1), при этом замены T515K, Q554R, R632Q являются радикальными и потенциально могут привести к образованию иной конформации белка. Интересно, что три аминокислотные замены (T515K, Y525F, Q554R) выявлены в пределах достаточно консервативного С-терминального гликозилгидролазного домена. Замена T515K выявлена у единственного сорта – Брянский ранний. Замена A615S есть у всех сортов аллельных групп А и В, а также у сорта Петербургский. Замена R632Q характерна для сортов группы А и сорта Петербургский.

Таким образом, в данной работе впервые описан полиморфизм нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и определены аллельные варианты наиболее варибельного участка гена кислой вакуолярной инвертазы 19 сортов картофеля российской и зарубежной

селекции. Полученные данные о нуклеотидной и аминокислотной варибельности кислой вакуолярной инвертазы могут быть в дальнейшем использованы в селекции сортов картофеля с повышенным содержанием крахмала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (ГК № 14.М04.12.0016) и программы Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА

- Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Еланский С.Н., Зейрук В.Н., Кузнецова М.А., Мальцев С.В., Пшеченков К.А., Складорова Н.П., Спиглазова С.Ю., Яшина И.М. Сорта картофеля, возделываемые в России. М.: Агроспас, 2010. 128 с.
- Слугина М.А., Снигирь Е.А., Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З. Структура и полиморфизм фрагмента локуса *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу *Solanum* // Молекуляр. биология. 2013. Т. 47. С. 243–250.
- Albacete A., Grosskinsky D.K., Roitsch T. Trick and treat: A review on the function and regulation of plant invertases in the abiotic stress response // *Phyton – Annales Rei Botanicae*. 2011. V. 50. P. 181–204.
- Castrillón-Arbeláez P.A., Martínez-Gallardo N., Arnaut H.A., Tiessen A., Délano-Frier J.P. Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory // *Plant Biol*. 2012. V. 12. P. 163–185.
- Draffehn A.M., Sebastian M., Li L., Gebhardt C. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases // *BMC Plant Biol*. 2010. V. 10. P. 271–286.
- Elliott K.J., Butler W.O., Dickinson C.D., Konno Y. *et al.* Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening // *Plant Mol. Biol*. 1993. V. 21. P. 515–524.
- Ji X., Ende van den W., Laere van A. *et al.* Structure, evolution and expression of the two invertase gene families of rice // *Mol. Evol*. 2005. V. 60. P. 615–634.
- Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2004. V. 7. P. 235–246.
- Kumar S., Tamura K., Peterson D. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol*. 2011. V. 28. No. 10. P. 2731–2739.
- Li L., Paulo M-J., Strahwald J., Lubeck J., Natural H-R. DNA variation at candidate loci is associated with potato chip color, tuber starch content, yield and starch yield // *Theor. Appl. Genet*. 2008. V. 116. P. 1167–1181.
- Ruan Y-L., Jin Y., Yang Y-J., Li G-J., Boyer J.S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat // *Mol. Plant*. 2010. V. 3. P. 942–955.

VARIABILITY OF A FRAGMENT OF THE ACID VACUOLAR INVERTASE *PAIN-1* GENE IN POTATO CULTIVARS

M.A. Slugina^{1,2}, E.Z. Kochieva^{1,2}

¹ Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

² Chair of Biotechnology, Biological Department, Lomonosov State University, Moscow, Russia,
e-mail: ekochieva@yandex.ru

Summary

Acid vacuolar invertase Pain-1 participates in the regulation of starch and sucrose contents in cells. This enzyme is also involved in plant response to abiotic stress. For the first time *Pain-1* gene fragment (exon V – exon VII) polymorphism was determined in 19 potato varieties. A total of 25 SNPs were detected. A new SNP, C₁₈₉₅, was found in exon VII. Five of eight SNPs located in exons led to amino acid substitutions. Three of them were radical. It was shown that the conservative C-terminal domain contained three variable amino acids.

Key words: potato varieties, acid vacuolar invertase, allelism, nucleotide and amino acid polymorphism.