ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 577.212.3:575.113.12

ИНГИБИТОР АМИЛАЗ SbAI ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ: ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ И ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ

© 2021 г. Е. А. Дьяченко^{1, *}, А. В. Кулакова¹, А. А. Мелешин², А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, Московская область, Люберецкий район, п. Красково, 140051 Россия

> *e-mail: dyachenko-el@yandex.ru Поступила в редакцию 20.02.2020 г. После доработки 27.04.2020 г. Принята к публикации 08.07.2020 г.

Деградация крахмала в растениях опосредуется амилазами, активность которых посттрансляционно регулируется ингибиторами. Предполагается, что работа гена ингибитора амилаз SbAI связана с устойчивостью картофеля к холодовому стрессу. Изучение возможных корреляций вариабельности гена SbAI с холодостойкостью видов картофеля позволит повысить степень понимания регуляции метаболизма крахмала в процессе развития растения и его реакции на стресс. В настоящем исследовании идентифицированы полногеномные последовательности гомологов гена SbAI v 12 видов картофеля секции Petota. Выявлено 36 аллельных вариантов гена и 31 вариант белка. Сопоставление с данными по сортам Solanum tuberosum показало, что сортовой полиморфизм в 1.4–1.7 раза превышает межвидовой, однако видам соответствует большее число аллельных вариантов. Филогенетический анализ показал, что аллельные варианты SbAI видов S. demissum, S. acaule и S. stoloniferum paзнесены по разным кладам. Профиль экспрессии гена SbAI определен в различных органах видов S. tuberosum (сорт Надежда), S. rybinii, S. chacoense и S. kurtzianum. В листе S. chacoense уровень экспрессии гена в 13, 50 и 250 раз выше, чем у S. tuberosum, S. kurtzianum и S. rybinii соответственно. Различный уровень экспрессии SbAI в листьях видов может быть следствием разного исходного содержания в листьях как синтезируемого крахмала, так и редуцирующих сахаров. В клубне S. tuberosum уровень выше в 5.2, 8.6 и 430 раз, чем у S. kurtzianum, S. chacoense и S. rybinii. В корне S. rybinii уровень SbAI в 2.4 раза выше, чем у S. chacoense, и в 42.3 раза выше, чем у S. kurtzianum и S. tuberosum. Показано отсутствие корреляции уровня экспрессии SbAI с холодостойкостью видов. Полученные данные профиля экспрессии позволяют предположить, что разные виды и сорта картофеля могут поразному регулировать содержание крахмала в клубнях.

Ключевые слова: дикорастущие клубнеобразующие виды картофеля, ингибитор амилаз SbAI, холодоустойчивость, филогения, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0016675821010045

Низкие температуры являются одним из наиболее распространенных факторов, запускающих механизмы адаптации или толерантности растений и определяющих географическое распределение и расхождение видов. В процессе холодовой акклиматизации в растении значительно изменяются транскриптомные данные и включается биосинтез и накопление различных криопротекторов с одновременным преобразованием состава клеточных мембран [1, 2]. Одна из его самых первых значительных метаболических реакций на холод - накопление растворимых сахаров за счет деградации крахмала [3]. Сначала происходит фосфорилирование амилопектиновых полимеров на поверхности крахмальных гранул, что повышает их гидрофильность и доступность для гидролитических ферментов – α-амилаз (АМҮ, ЕС 3.2.1.1), β-амилаз (ВАМ, ЕС 3.2.1.2) и изоамилаз (ЕС 3.2.1.68) [3].

Такая важная сельскохозяйственная культура как картофель (*Solanum tuberosum*) является чувствительным к холоду растением: температура ниже нуля может привести к повреждению надземной биомассы и задержке развития. Между метаболизмом крахмала в гетеротрофных клубнях и фотосинтезирующих листьях картофеля есть глубокие различия. В клубнях крахмал накапливается по мере развития и хранится в течение длительного времени, поддерживая энергетические потребности, а после пробуждения клубня активно разлагается, подпитывая рост побегов [4]. В листьях же крахмал синтезируется днем и разлагается ночью, поддерживая энергоснабжение биологических процессов [4]. В клубнях деградация крахмала опосредуется амилазами: StBAM9 связывается с крахмальным зерном и высвобождает растворимые глюканы, которые гидролизуются в амилопластах с помощью StBAM1 и затем в цитозоле при участии StAmy23 [5–7]. В листьях, в ночной деградации транзитного крахмала активное участие принадлежит β-амилазам и изоамилазам [8]. Несмотря на различия, в регуляции метаболизма крахмала в клубнях и листьях существует много параллелей [4].

Активность амилаз регулируется белковыми ингибиторами на посттрансляционном уровне. Известно, как минимум, шесть классов растительных ингибиторов α -амилаз белковой природы с разной третичной структурой, которые способны связываться с каталитическим центром α -амилазы с помощью водородных связей, блокируя его или изменяя конформацию фермента [9].

Один из классов ингибиторов амилаз - семейство AAI LTSS (Alpha-Amylase Inhibitors, Lipid Transfer and Seed Storage), играющее важную роль в защите растений от насекомых и патогенов, в транспорте липидов между внутриклеточными мембранами и хранении питательных веществ. Представителем семейства является белок Атуlase Inhibitor Solanum berthaultii (SbAI, другое название classical arabinogalatan protein (AGP) 4-like) [6]. пространственная структура которого (с характерными восемью остатками цистеина, образующими четыре дисульфидных мостика) консервативна для различных видов растений [10] (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=352835). В базе данных NCBI имеется множество гомологов SbAI. однако информация об их функции крайне ограничена. Для двух отдаленных гомологов показана связь с устойчивостью к тле (PERK10, XP 009766757.1 [11]) и с формированием семян (JAGGER, AGP4, NP 196605.1 [12]). Несмотря на низкий уровень гомологии между SbAI и описанными гомологами, становится понятна важность роли SbAI в развитии растения.

Впервые ген *SbAI*, как следует из его названия, клонирован и охарактеризован у клубнеобразующего вида картофеля *S. berthaultii* [6]. Интересной особенностью белка SbAI оказалась его способность подавлять активность не только α -амилаз, но и β -амилаз: было подтверждено экспериментально, что SbAI взаимодействует с амилазами StAmy23, StBAM1 и StBAM9 [6]. Кроме того, удалось обнаружить положительную корреляцию уровня экспрессии гена *SbAI* в клубнях картофеля с устойчивостью клубней к холодовому осахариванию (cold-induced sweetening, CIS) [6]. Интересно, что имеется также обратная корреляция между уровнем экспрессии *SbAI* и генов амилаз *StAmy23, StBAM1* и *StBAM9*, несмотря на то что взаимодействие ингибитора с амилазами происходит на белковом уровне [6].

Повышение содержания редуцирующих сахаров является сигналом к росту активности SbAI и подавлению активности амилаз. Ответ SbAI на сахара, а также на низкие температуры в значительной степени зависит от генотипа картофеля. Кроме *S. berthauiltii*, имеется огромное разнообразие видов и сортов картофеля, различающихся по степени холодо- и CIS-устойчивости и особенностям метаболизма крахмала. Однако информации об ортологах SbAI крайне мало.

Поэтому целью данной работы стала оценка вариабельности ингибитора амилаз SbAI у клубнеобразующих видов картофеля (род Solanum, секция Petota) и поиск возможных корреляций полиморфизма и профиля экспрессии гена с характеристиками вида. Для этого были впервые идентифицированы полногеномные последовательности гомологов гена SbAI дикорастущих и примитивных культурных видов картофеля, охарактеризованы их структура, филогения, аллельная вариабельность и аминокислотный полиморфизм кодируемых белков, определены профили экспрессии гена в различных органах анализируемых образцов картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Образцы 12 дикорастущих клубнеобразующих видов картофеля секции Petota и сорта Надежда *S. tuberosum* (табл. 1) выращивали в 2019 г. при нормальных температурных условиях (23/25°С, 16/8 ч – день/ночь, теплица). Из молодых листьев выделяли геномную ДНК калий-ацетатным методом [13] для идентификации полногеномных последовательностей гомологов гена *SbAI*. В сентябре 2019 г. были собраны ткани (лист, стебель, бутон, цветок, столон, корень, клубень) для выделения РНК и анализа профиля экспрессии идентифицированных гомологов гена *SbAI*.

Идентификация гомологов гена SbAI. Геномную ДНК растений использовали для амплификации полногеномных последовательностей гомологов гена SbAI с помощью ПЦР с праймерами SbaI_F/SbaI_R (табл. 2; [14]). Фрагменты ожидаемой длины (около 2 тыс. пн) вырезали из геля (Zymoclean[™] Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research, США), клонировали (Quick-TA Kit; Евроген, РФ) и секвенировали (по 3–5 клонов каждого вида) с дополнительными праймерами (табл. 2; [14]) на автоматическом секвенаторе ABI 310 Сарillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, США; ЦКП "Биоинженерия" РАН).

Структура и филогения гомологов гена SbAI и кодируемых ими белков. Структуру, вариабельность и филогению полученных последователь-

	К атапочисий помен/	Плоилность.		Аптети –	Гац	лнк	Бепои	Замещения/индели, а.о.	
Вид	NCBIID	W/C*, **	CR*	ген/белок	HI	HII	a.o.	СПИСОК	количество
Solanum acaule	ВИР 9784/	4X/6X; W	+++++	1/1	1817	630	209	S94P ; A133T; A136P; E163A; A205V	5/0
Bitter	MT074624-MT074626	(clades 4, 3)		2/2	1868	618	205	V15G; P130S; E163V; F192L/T135_P138del	4/1
			-	3/3	1868	618	205	<u>V15G;</u> G67A; E163V; F192L/T135_P138del	4/1
	31-2012/ MT074627-MT074629		-	4/4	1868	618	205	<u>V15G; R631;</u> E163V; F192L/T135_P138del	4/1
			-	5/5	1818	630	209	A133T; A136P; E163A; N172S; A205V	5/0
			-	9/9	1867	618	205	M149V; E163V; F192L/T135_P138del	3/1
Solanum rybinii	9342/	4X; C	+	L/L	1763	618	205	S78T; E163V/T135_P138del	2/1
Juz & Bukasov (=Solanum	M10/4630-M10/4632	(4 cultivated)	-	8/8	1763	618	205	S78T; E163V; A196V/T135_P138del	3/1
tuberosum subsp. andigenum)			-	6/6	1807	630	209	A136P; E163V	2/0
Solanum	BMP 24267/	2X; W	I	10/10	1803	627	208	A136P; E163V/S137del	2/1
<i>berthaultu</i> Hawkes	M10/4633-M110/4636	(4 south; 4B)	-	11/11	1811	630	209	T123R; A136P; E163V	3/0
				12/12	1801	627	208	<u>V15G</u> ; A136P; E163V/S137del	3/1
			-	13/13	1802	630	209	A136P; E163V; M207I	3/0
Solanum chacoense	3678/ MT074637-MT074638	2X; W (4 south)	+	14/14	1781	621	206	A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I/G202_1204del	7/1
Bitter				15/15	1781	621	206	P86A ; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I/G202_1204del	8/1
Solanum	15176/34/	6X; W	+	16/16	1822	630	209	A133T; A136P; E163A; A205V	4/0
demissum Lindi.	M10/4639-M10/4640	(4 south, 3)		17/17	1858	609	202	<u>V15G;</u> E163V/T135_P138del; G202_1204del	2/2

Таблица 1. Характеристики гомологов SbAI у видов картофеля и томата

46

ДЬЯЧЕНКО и др.

ГЕНЕТИКА том 57 № 1 2021

Вил	Каталожный номер/	Плоидность;	CR*	Аллели –	Ген,	кДНК,	Белок,	Замещения/индели, а.о.	
DNJ	NCBI ID	W/C*, **	CN	ген/белок	НШ	НП	a.o.	список	количество
Solanum gourlay (= Solanum	GB 18038/ MT074641 MT074642	2X/4X; W	+	18/9	1796	630	209	Al36P; E163V	2/0
brevicaule Bitter)	7+0+/011A1+0+/011A1	(11106 +)		19/18	1869	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0
Solanum jamesii Torr.	ВИР 15203/ МТ074643-МТ074644	2X; W(1+2)	I	20/19	1808	618	205	A17V; T53A; E163V; P179S; T1811/T135_P138del	5/1
				21/19	1813	618	205	A17V; T53A; E163V; P179S; T1811/T135_P138del	5/1
Solanum	BUP 11969/ MT0746.45 MT074646	2X; W	+	22/18	1788	630	209	Al36P; E163V; P179S	3/0
Bitter & Wittm.		(1mnos +)		23/20	1788	630	209	T64A; A136P; E163V; P179S; G189S	5/0
	BUP 12483/ MT074647 MT074648			24/21	1795	630	209	Al36P; E163V; P179S; F201V	4/0
			-	25/18	1795	630	209	Al36P; E163V; P179S	3/0
Solanum stoloniferum Solutedi &	ВИР 21618/ МТ074649-МТ074651	4X; W (1 + 2, 3, 4	I	26/22	1857	642	213	T53A; E124K; T135S; E163V; P179S/P138_S139insTSAP	5/1
Bouchet		(imnos		27/23	1805	630	209	A136P; E163V	2/0
				28/24	1858	642	213	T53A; T135S; E163V; P179S/P138_S139insTSAP	4/1
Solanum sucrense Howbee	ВИР 23598/ МТ074652-МТ074653	4X; W (4 B)	I	29/25	1797	621	206	L35Q; Al36P; Al52T; El63V; Pl79S; Al96V; Fl97L; M207I/G202_l204del	8/1
				30/26	1797	621	206	A2D; Q84H; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M2071/G202_1204del	9/1

ИНГИБИТОР АМИЛАЗ SbAI ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Таблица 1. Продолжение

ГЕНЕТИКА том 57 № 1 2021

47

	количество	7/1	10/1	6/1	3/0	5/0	3/0		1/61	16/1	ия приведены
Замещения/индели, а.о.	список	A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_1204del	H4R; S46T; <u>C74W</u> ; T92A; A136P; A152T; E163V; P179S; N180Y; M2071/G202_1204del	S46T; G57D; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M2071/G202_1204del	A136P; E163V; F201L	T27A; A136P; E163V; A185T; F201L	A136P; E163V; F201L	1	T53A; S78T; M93L; T112S; P113V; S132P; A133S; T135S; A136P; A145P; A152T; E163V; F192L; 1198S; F201V; A205V; F206V; M207L; L208V/Y209del	T53A; S78T; M93L; T112S; P113A; S132P; T135S; A136P; A145P; A152T; E163V; F192L; A205V; F206V; M207L; L208V/Y209del	растущие, С – культивируемые. Замещен рным шрифтом и подчеркнуты.
Белок,	a.o.	206	206	206	209	209	209	209	208	208	. W – дикс Ны полужи
кДНК,	НШ	621	621	621	630	630	630	630	627	627	йчивость) ия выделеі
Ген,	HII	1779	1781	1777	1805	1805	1805	1848	1670	1706	колодоусто е замещен
Аллели –	ген/белок	31/27	32/28	33/29	34/30	35/31	36/30	I	I	1	ld resistance (x . Радикальные
*a_	N)	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	ł	ł	+	!	!	Нет данных	Нет данных	Нет данных	I. CR – co -3 516 R44
Плоидность; W/C*, **		2X; W (4 south; 4B)			2X; W	(4 souun; 4B)		cv. DM 1-3 516 R44	cv. Heinz 1706	LA0716	GenBank NCB Prosum cv. DM 1-
Каталожный номер/ NCBI ID		BHP 20332/ MT074654-MT074656			BUP 24467/	6C04/011VI-/C04/011VI		GeneID: 102591697 NW_006239139.1 (302246304341)***	Gene ID: 101255064 NC_015440.3 (122217124105)***	Gene ID: 107012074 NC_028639.1 (120187122094)***	7]; ** [23–25]; *** согласн мологом SbAl <i>Solanum tub</i> e
Вид		Solanum vernei Bitter & Wittm.			Solanum	verrucosum Schltdl.		Solanum tuberosum	Solanum Iycopersicum	Solanum pennellii	Примечание. * [1 в сравнении с гом

48

Таблица 1. Окончание

ДЬЯЧЕНКО и др.

ГЕНЕТИКА том 57 № 1 2021

Название	Последовательность (5' \rightarrow 3')	Назначение
SbAIrtF	TTGTAACATGGCTCGCGTTC	РВ-ПЦР (<i>SbAI</i>) [18]
SbAIrtR	TGTTGGTGAAGCACTTGGAG	
ef1αF	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	РВ-ПЦР (<i>ef1</i> α) [19]
ef1αR	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	
sec3F	GCTTGCACACGCCATATCAAT	РВ-ПЦР (<i>sec3</i>) [20]
sec3R	TGGATTTTACCACCTTCCGCA	
SbaI_F	ACTATGGCTTTTCATTACTCTA	Амплификация полногеномной последовательности
SbaI_R	TTACATCAAAGAATAGTTGTATAAC	гомологов <i>SbAI</i> ; секвенирование [14]
SbaI_in1R	TCGTGAGAATAGTCTCTTGC	Секвенирование гомологов SbAI [14]
SbaI_ex1F	GTAACATGGCTCGCGTTC	
SbaI_ex3F	AACAGAGGCTCCAAGTGC	
SbaI_in3R	GGATAGTTTGAGCAACATAACTT	

Таблица 2. Список праймеров, использованных в работе

ностей анализировали с помощью пакета программ MEGA 7.0 [15]. Возможное влияние замещений аминокислотных остатков на структуру гомологов SbAI оценивали с использованием программы PROVEAN (http://provean.jcvi.org/index.php) [16]. Пространственную структуру белков-гомологов SbAI предсказывали с помощью Phyre2 [17].

Профили экспрессии гомологов SbAI. Препараты суммарной PHK выделяли (RNeasy Plant Mini Kit; Qiagen, Германия) из листа, стебля, бутона, цветка, столона, корня и клубня образцов четырех видов картофеля (включая сорт Надежда S. tuberosum) и использовали для синтеза кДНК (GoScript; Promega, США). Анализ профиля экспрессии гомологов SbAI проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) в трех технических повторах. Для этого применяли ранее разработанные праймеры SbAIrtF/SbAIrtR (табл. 2; [18]), набор "Реакционная смесь для проведения PB-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX" (ЗАО Синтол, Россия) и следующие условия: 95°С − 5 мин; 40 циклов (95°С − 15 с, 60°С − 50 с). Для нормализации экспрессии использовали референсные гены *EF1*α и *SEC3* и праймеры к ним (табл. 2; [19, 20]). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPadPrism v. 7.02 (https://www.graphpad.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и структурный анализ геновгомологов SbAI у видов картофеля

Были идентифицированы (амплифицированы, клонированы, секвенированы) полногеномные последовательности гомологов гена *SbAI* у образцов 12 видов картофеля (табл. 1). Гомологи имели характерную для *SbAI* четырехэкзонную

ГЕНЕТИКА том 57 № 1 2021

структуру, однако различались по общей длине (от 1763 пн у *S. tuberosum* ssp. *andigenum* до 1869 пн у *S. gourlay*) и по размеру кДНК (от 609 пн у *S. demissum* до 642 пн у *S. stoloniferum*) (табл. 1). По сравнению со *SbAI S. tuberosum* сv. DM 1–3 516 R44 (Gene ID: 102591697; далее использовался как референс при сравнениях) вариабельность полногеномных последовательностей идентифицированных гомологов составила 19.3% (381 SNPs), а кДНК–12.6% (82 SNPs) (табл. 1).

Кодируемые белки SbAI характеризовались наличием консервативных для AAI LTSS-семейства доменов LTP 2 (в позиции 16-102 a.o. - у всех) и PRK14971 superfamily (в позиции 77-189 a.o. по SbAI S. tuberosum cv.DM 1-3 516 R44; 77-196 a.o. по выравниванию). Около 13-14% последовательности каждого белка составляли остатки пролина, что подтверждает принадлежность гомологов к AGP-семейству Рго-обогащенных белков. Также это свидетельствует о высокой способности SbAI взаимодействовать с другими белками, как это было показано ранее для Рго-обогащенных мотивов [21]. Также все исследуемые гомологи содержали консенсусные для ААІ LTSS-белков восемь остатков цистеина, формирующих дисульфидные мостики, в позициях 30, 41, 58, 59, 72, 74, 99 и 108 (соответствует домену LTP 2).

Третичные структуры всех анализируемых гомологов SbAI были предсказаны с помощью Phyre2 на основе известных матриц (PDB ID c2rknA_ "x-ray structure of the self-defense and signaling protein DIR1 from *Arabidopsis thaliana*" и c2ljoA "3d solution structure of lipid transfer protein lc-ltp2"). С достоверностью >90% были моделированы 38– 40% аминокислотных остатков (~30–107 а.о., что соответствует домену LTP_2), остальные – *ab initio*. Около 60% последовательности, куда полностью входит домен PRK14971, имеет неупорядоченную структуру, вследствие чего достоверные предсказания вторичной структуры данной области отсутствуют. Домен LTP_2 укладывается в пучок из четырех—пяти спиралей, стабилизированных четырьмя дисульфидными мостиками. Сравнение анализируемых белков с известной структурой мембранных белков (PDBID c6ithA_, "membrane protein, syndecan-2") позволило предсказать наличие на С-конце всех гомологов SbAI трансмембранной спирали (~189–207 а.о.), важной для передачи сигнала через клеточную мембрану. Показанное структурное соответствие анализируемых гомологов SbAI указывает на высокую вероятность сходства их функций у разных видов картофеля.

Гомологи SbAI 12 анализируемых видов картофеля содержали 41 замещение аминокислотных остатков (а.о.; 19.25% от выравненной длины 213 а.о.), одну нейтральную вставку (P138_S139insTSAP) и три нейтральные делеции (T135 P138del, S137del и G202 I204del) (табл. 1). Радикальных замещений а.о. было найдено всего семь, и все они (а также вставка и первые две делеции) локализовались в консервативных доменах. Больше всего замещений (включая радикальные) содержали гомологи SbAI образцов видов S. acaule, S. sucrense, S. vernei и S. chacoense. По одному радикальному замещению имели также некоторые варианты SbAI S. berthaultii и S. demissum. Интересно, что гомологи SbAI видов томата имели в 2-10 раз больше замещений а.о. в сравнении с S. tuberosum, однако все они носили нейтральный характер (табл. 1).

Всего было выявлено 36 аллельных вариантов гена и 31 вариант белка (табл. 1). Наибольшее число аллельных вариантов соответствовало видам *S. acaule*, *S. berthaultii* и *S. kurtzianum*. Какаялибо корреляция количества вариантов с плоидностью анализируемых видов отсутствовала. Так, у гексаплоида *S. demissum* вариантов оказалось меньше, чем у диплоида *S. berthaultii* (табл. 1).

Мы сравнили полученные результаты с данными по ранее идентифицированным и охарактеризованным последовательностям гомологов гена *SbAI* у отечественных и зарубежных сортов и линий картофеля *S. tuberosum* [14]. Оказалось, что общий и экзонный полиморфизм сортовых последовательностей (27.0 и 21.3% соответственно) [14] в 1.4—1.7 раза превышает выявленную в настоящем исследовании межвидовую вариабельность. Однако для видов было идентифицировано большее число (~1.5 раза) аллельных вариантов, чем для сортов (36 сортам соответствовали 70 аллельных вариантов гена и 69 — белка [14]).

Дикорастущий картофель достаточно давно используется в селекционных программах, и в родословных большинства сортов можно найти, как минимум, один из шести видов (S. demissum, S. acaule, S. chacoense, S. stoloniferum, S. vernei и S. spegazzinii), которые являются донорами признаков устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам; прочие виды картофеля (*S. verrucosum* и другие) в сортах встречаются реже [22]. Большая вариабельность *SbAI* у сортов, чем у видов, может быть связана с тем, что родословная сорта включает больше одного, а часто и несколько видов картофеля.

Филогения полногеномных последовательностей гомологов SbAI видов картофеля

Чтобы оценить степень родства видов и сортов картофеля, был проведен филогенетический анализ полногеномных последовательностей соответствующих гомологов *SbAI*; в качестве внешней группы использовали *SbAI* видов томата *S. lycopersicum* и *S. pennellii* (рис. 1).

На дендрограмме произошло разделение сортов и видов картофеля на несколько клад. Выделилась группа из четырех аллельных вариантов S. acaule и одного S. demissum, тогда как оставшиеся аллельные варианты данных видов объединились в другую группу внутри соседнего большого кластера (рис. 1). Кроме этой группы кластер содержит клады, состоящие: 1) из трех подкластеров, объединяющих аллели нескольких сортов/линий (Голубизна, Браво, Горняк, Старт, Ирбитский, Фаворит, Арлекин, Крепыш и 3-43-6) и видов (S. berthaultii, S. gourlay, S. tuberosum subsp. andigenum, S. stoloniferum и S. verrucosum); 2) из аллелей одних только видов (S. sucrense, S. vernei, S. tuberosum и S. chacoense); 3) из четырех аллелей S. kurtzianum; 4) из двух аллелей subsp. and igenum и аллеля сорта Фиолетовый; 5) из аллелей трех видов (S. gourlay, S. jamesii и S. stoloniferum) и сортов/линий (3-43-6, Крепыш, Фиолетовый и Кузнечанка) (рис. 1).

Таким образом, выявленные аллельные варианты пяти видов (*S. acaule, S. demissum*, subsp. *andigenum*, *S. gourlay* и *S. stoloniferum*), а также аллели одной линии (3-43-6) и двух сортов (Фиолетовый и Крепыш) оказались разнесены по разным кладам. Варианты *SbAI* семи из 11 взятых в анализ сортов составляют единый подкластер, тогда как остальные сорта попадают в кластеры, образованные аллельными вариантами видов.

Ранее было показано, что филогенетически виды картофеля делятся на три клады ("clade 1 + 2", "clade 3" и "clade 4"), где "clade 4" делится на подклады "4 south", "4 north" и "4 cultivated", или же на "4А" и "4В" [23–25]. При этом аллельные варианты одного вида могут попадать в разные клады [23]. Обнаруженный в нашем исследовании разброс аллельных вариантов *S. acaule* и *S. demissum* по разным кладам подтверждает показанный ранее сложный состав аллелей этих двух видов. Считается, что аллели *S. acaule* и *S. demissum* в основном принадлежат кладе 4, однако оба вида



Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма видов и сортов картофеля, основанная на полногеномной последовательности гомологов гена *SbAI*. Построена в MEGA 7.0, с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), модели Tamura 3 и 1000 бутстрэп-реплик. Гомологи *SbAI Solanum lycopersicum* и *Solanum pennellii* использованы в качестве внешней группы. Использованы аллельные варианты 10 сортов *S. tuberosum* (Голубизна, Крепыш, Браво, Фиолетовый, Ирбитский, Фаворит, Старт, Горняк, Арлекин и Кузнечанка; на дендрограмме названия даны в латинской транслитерации) и линия 3-43-6. "А" после названия вида/сорта обозначает аллельный вариант. Значения бутстрэп указаны в узлах.

имеют хотя бы по одному аллелю клады 3 [23]. В нашем же случае два аллельных варианта S. demissum распределились поровну между кладами 3 и 4, а вот из шести аллелей S. acaule четыре попали в кладу 3 и только два в кладу 4 (рис. 1). У еще одного вида со сложным составом аллелей – S. stolon*iferum* один из трех аллелей *SbAI* оказался в кладе 4, а два других объединились в одну группу с аллелями S. jamesii (рис. 1), который принадлежит кладе 1 + 2. Это подтверждает выявленное ранее присутствие у S. stoloniferum аллелей клады 1 + 2 [23]. Показанное распределение аллельных вариантов линии 3-43-6 и сортов Фиолетовый и Крепыш по отдаленным кластерам дендрограммы может отражать комплексную родословную образцов, связанную со сложными межвиловыми скрешиваниями.

Вариабельность профиля экспрессии гомологов гена SbAI видов картофеля

Для сравнительного анализа экспрессии гена *SbAI* были выбраны образцы клубнеобразующих видов секции Petota – *S. tuberosum* (сорт Надежда в качестве контроля), *S. rybinii* (=*S. tuberosum* subsp. *andigenum*, клада 4B) и двух дикорастущих видов *S. chacoense* и *S. kurtzianum* (клада 4 south) [22].

Предварительно профиль экспрессии гена *SbAI* был определен в ряде органов *S. tuberosum*. В не запасающих вегетативных органах (стебле, листе, бутоне, цветке и корне) наблюдался низкий уровень транскрипции гена, тогда как в клубне транскрипция резко усиливалась (рис. 2). Значительный рост экспрессии гена в запасающих органах в сравнении с другими вегетативными тканями свидетельствует об участии SbAI в предохранении резервного крахмала клубня от гидролиза.

С учетом полученных результатов экспрессию *SbAI* у трех выбранных видов *S. rybinii*, *S. chacoense* и *S. kurtzianum* определяли в листе (фотосинтезирующий орган), корне и столоне (подземные не запасающие органы), а также в клубне (подземный запасающий орган). Транскрипты гена были выявлены во всех анализируемых органах всех образцов с относительным уровнем транскрипции в интервале 0.00025–0.3 (рис. 2), что соответствовало ранее определенному профилю экспрессии *SbAI* у двух сортов картофеля [5].

Транскрипция *SbAI S. kurtzianum* повторяла профиль *SbAI S. tuberosum*, за исключением менее выраженного роста уровня транскрипции *SbAI* в клубнях, в то время как *S. rybinii* и *S. chacoense* имели другие профили экспрессии гена (рис. 2).

Согласно суточной динамике метаболизма крахмала в листьях, днем (когда собирали листья образцов на анализ) должен происходить интенсивный синтез и накопление крахмала [26], и в данной ткани ожидался повышенный уровень экспрессии SbAI. Однако в листьях анализируемых образцов транскрипция носила следовый характер, за исключением S. chacoense, где уровень экспрессии гена был выше в 13, 50 и 250 раз, чем у S. tuberosum, S. kurtzianum и S. rybinii соответственно (рис. 2). Известно, что виды S. rybinii, S. chacoense, S. kurtzianum, а также сорт Надежда (взятый как представитель S. tuberosum) обладают хорошей устойчивостью к низким температурам [22]. Поэтому корреляции уровня экспрессии SbAI в листе с холодостойкостью образцов не отмечено.

В этой связи интересны данные о разной реакции двух сортов картофеля на холодовой стресс: в листьях Desiree экспрессия генов деградации крахмала росла с одновременным накоплением редуцирующих сахаров, в то время как у Russet-Burbank данные характеристики почти не менялись [3]. Это позволило заключить, что активация гидролиза крахмала зависит не только от понижения температуры, но и от содержания редуцирующих сахаров при нормальных условиях: в листьях Russet Burbank моносахаридов исходно было достаточно, чтобы, не повышая их концентрации, перенести охлаждение [3]. Более того, на примере пяти видов картофеля была показана корреляция между исходным количеством крахмала и степенью роста экспрессии SbAI в листе в ответ на холодовой стресс [18].

Поэтому различный уровень экспрессии гена ингибитора амилаз *SbAI* в листьях анализируемых видов может быть следствием разного исходного содержания в листьях как синтезируемого крахмала, так и редуцирующих сахаров.

Интересно, что при нормальных условиях уровень экспрессии *SbAI* в листьях никак не коррелирует со степенью устойчивости клубней к холодовому осахариванию. Так, ранее было показано, что в листьях чувствительного и устойчивого к CIS сортов картофеля ген ингибитора амилаз экспрессируется на одинаковом уровне [5]. Однако в клубнях *SbAI* транскрибируется высоко у CIS-чувствительного сорта и низко у CIS-устойчивого [5].

В настоящей работе самая высокая экспрессия *SbAI* в клубне была у *S. tuberosum* — выше в 5.2, 8.6 и 430 раз, чем у *S. kurtzianum*, *S. chacoense* и *S. ry-binii* соответственно (рис. 2). Это может свидетельствовать о меньшей подверженности клубней образцов *S. tuberosum* и *S. kurtzianum* холодовому осахариванию.

В случае корня и столона ситуация различалась. Так, *S. rybinii* с минимальной экспрессией *SbAI* в клубне показал самый высокий уровень транскрипции в корне – в 2.4 раза выше, чем у *S. chacoense*, и в целых 42.3 раза выше, чем у *S. kurtzianum* и *S. tuberosum* (рис. 2).

Полученные данные профиля экспрессии "корень-столон-клубень" позволяют предположить, что разные виды и сорта картофеля могут



Рис. 2. Профиль экспрессии гена ингибитора амилаз *SbAI* в различных органах (стебель – St, лист – L, бутон – B, цветок – F, корень – R, столон – S, клубень – T) образцов четырех видов картофеля: *Solanum tuberosum* (сорт Надежда), *Solanum kurtzianum, Solanum chacoense, Solanum rybinii.* Буквами над столбиками указаны достоверные различия (P < 0.01) в уровне экспрессии *SbAI* между отдельными органами внутри одного вида. Каждому органу присвоено свое буквенное обозначение (a–g). Например, для *S. tuberosum* экспрессия в цветке (e) достоверно отличается от экспрессии в листе (a), корне (b), клубне (d) и стебле (g), соответственно над столбиком abdg.

по-разному регулировать содержание крахмала в клубнях: одни предупреждают его распад, ингибируя активность амилаз уже в корнях и столонах; другие — останавливают деградацию крахмала непосредственно в запасающих органах.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что говорить о корреляции непосредственно между уровнем экспрессии гена ингибитора амилаз и холодоустойчивостью или CIS-устойчивостью растения картофеля пока преждевременно. Для корректных заключений необходимо учитывать исходные (предстрессовые) транскриптомные, протеомные и биохимические данные каждого конкретного генотипа в нормальных условиях развития.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 17-29-08017) и ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017–2025 гг. (подпрограмма

ГЕНЕТИКА том 57 № 1 2021

"Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации"). Растения выращивали с использованием экспериментальной установки искусственного климата ЭУИК (Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dametto A., Sperotto R.A., Adamski J.M. et al. Cold tolerance in rice germinating seeds revealed by deep RNAseq analysis of contrasting indica genotypes // Plant Sci. 2015. V. 238. P. 1–12. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.009
- Leuendorf J.E., Frank M., Schmülling T. Acclimation, priming and memory in the response of Arabidopsis thaliana seedlings to cold stress // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. Article 689. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56797-x

- Sitnicka D., Orzechowski S. Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultivar differences in the gene expression and activity of key enzymes // Biol. Plantarum. 2014. V. 58. № 4. P. 659–666. https://doi.org/10.1007/s10535-014-0453-2
- Van Harsselaar J.K., Lorenz J., Senning M. et al. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (Solanum tuberosum L.) // BMC Genomics. 2017. V. 18. № 1. Article 37. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3381-z
- Zhang H., Hou J., Liu J. et al. Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting // Potato Res. 2014. V. 57. P. 47–58. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124991
- 6. *Zhang H., Liu J., Hou J. et al.* The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity // Plant Biotech. J. 2014. V. 12. № 7. P. 984–993. https://doi.org/10.1111/pbi.12221
- Hou J., Zhang H., Liu J. et al. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. № 9. P. 2317–2331. https://doi.org/10.1093/jxb/erx076
- Møller M.S., Svensson B. Structural biology of starchdegrading enzymes and their regulation // Curr. Opin. Struct. Biol. 2016. V. 40. P. 33–42. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.006
- Wang Z., Chen M., Zhang Y. et al. A cupin domain is involved in α-amylase inhibitory activity // Plant Sci. 2018. V. 277. P. 285–295. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.001
- Lay F., Anderson M. Defensins-components of the innate immune system in plants // Curr. Protein Pept. Sci. 2005. V. 6. P. 85–101. https://doi.org/10.2174/1389203053027575
- 11. *Liang D., Chen M., Qi X. et al.* QTL mapping by SLAFseq and expression analysis of candidate genes for aphid resistance in cucumber // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Article 1000.

https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01000

 Pereira A.M., Nobre M.S., Pinto S.C. et al. "Love is strong, and you're so sweet": JAGGER is essential for persistent synergiddegeneration and polytubeyblock in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. 2016. V. 9. № 4. P. 601–614.

https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.002

- Дьяченко Е.А., Слугина М.А. Внутривидовой полиморфизм гена сахарозосинтазы Sus1 у образцов Pisum sativum L. // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 108–114. https://doi.org/10.18699/VJ18.338
- 14. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Мелешин А.А., Кочиева Е.З. Аллельная вариабельность гена ингибитора амилаз AI у сортов и линий картофеля // С.-х. биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 970–977. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.970rus
- 15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger

datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870– 1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

- Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. Article e46688. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // Nat. Prot. 2015. V. 10. P. 845–858. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053
- 18. Слугина М.А., Филюшин М.А., Мелешин А.А. и др. Различия в экспрессии гена ингибитора амилаз SbAI при длительном низкотемпературном хранении клубней и кратковременном холодовом стрессе у картофеля // Генетика. 2020. Т. 56. № 3. С. 361–365.

https://doi.org/10.1134/S1022795420030163

- Lopez-Pardo R., de Galarreta J.I.R., Ritter E. Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress // Mol. Breed. 2013. V. 31. № 1. P. 39–45. https://doi.org/10.1007/s11032-012-9766-z
- Tang X., Zhang N., Si H., Calderón-Urrea A. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress // Plant Methods. 2017. V. 13. Article 85. https://doi.org/10.1186/s13007-017-0238-7
- Williamson M.P. The structure and function of prolinerich regions in proteins // Biochem. J. 1994. V. 297. P. 249–260. https://doi.org/10.1042/bj2970249
- 22. *Machida-Hirano R*. Diversity of potato genetic resources // Breed Sci. 2015. V. 65. № 1. P. 26–40. https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.26
- Cai D., Rodríguez F., Teng Y. et al. Single copy nuclear gene analysis of polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section Petota) // BMC Evol. Biol. 2012. V. 12. Article 70. https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-70
- 24. *Huang B., Ruess H., Liang Q. et al.* Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section Petota // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. Article 4454. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40790-5
- 25. *Rodríguez F., Ghislain M., Clausen A.M. et al.* Hybrid origins of cultivated potatoes // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. № 6. P. 1187–1198. https://doi.org/10.1007/s00122-010-1422-6
- 26. Zeeman S.C., Smith M.C., Smith A.M. The diurnal metabolism of leaf starch // Biochem. J. 2007. V. 401. P. 13–28. https://doi.org/10.1042/BJ20061393

ГЕНЕТИКА том 57 № 1 2021

Amylase Inhibitor SbAI in Potato Species: Variability of Structure and Expression Pattern

E. A. Dyachenko^{a, *}, A. V. Kulakova^a, A. A. Meleshin^b, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^aInstitute of Bioengineering, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia ^bLorch Potato Research Institute, Moscow region, pos. Kraskovo, 140051 Russia *e-mail: dvachenko-el@vandex.ru

Starch degradation in plants is mediated by amylases, the activity of which is post-translationally regulated by inhibitors. It is assumed that the SbAI amylase inhibitor activity is associated with potato cold stress resistance. The study of possible correlations of the SbAI variability with the potato species cold resistance will improve the understanding of the starch metabolism regulation during plant development and stress response. In the present study, the genome sequences of SbAI homologs were identified in 12 potato species of section Petota. In total, 36 allelic variants of the gene and 31 variants of the protein were revealed. Comparison with data on *S. tuberosum* cultivars showed that cultivar SbAI polymorphism is 1.4–1.7 times higher than interspecific, but the species possess a larger number of allelic variants. Phylogenetic analysis revealed that for S. demissum, S. acaule and S. stoloniferum, each species SbAI allelic variants did not get into one clade. The SbAI gene expression pattern has been determined in various organs of the species S. tuberosum (cultivar Nadezhda), S. rybinii, S. chacoense and S. kurtzianum. In leaves, S. chacoense SbAI expression was 13, 50, and 250 times higher than in S. tuberosum, S. kurtzianum, and S. rybinii, respectively. Varied levels of SbAI expression in the species may be due to different initial contents of both synthesized starch and reducing sugars in the leaves. In tubers, S. tuberosum SbAI expression was 5.2, 8.6 and 430 times higher than in S. kurtzianum, S. chacoense and S. rybinii. In roots, S. rybinii SbAI expression was 2.4 times higher than in S. chacoense, and 42.3 times higher than in S. kurtzianum and S. tuberosum. The absence of correlation between the SbAI expression level and thespecies cold resistance was shown. The obtained expression data suggest that different potato species and cultivarsmay differently regulate tuber starch content.

Keywords: wild tuber-bearing potato species, amylase inhibitor SbAI, cold resistance, phylogeny, gene expression.