

## Генетические основы селекции

УДК 633.49:631.522/.524:577.21

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.5.907rus

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТА ГЕНА *Pho1a* У ДИКОРАСТУЩИХ КЛУБНЕОБРАЗУЮЩИХ И НЕКЛУБНЕОБРАЗУЮЩИХ ВИДОВ (*Solanum* subgenus *Potatoe*) И СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ *S. tuberosum* L.\*Е.О. ШМЕЛЬКОВА<sup>1</sup>, М.А. СЛУГИНА<sup>1</sup>, А.А. МЕЛЕШИН<sup>2</sup>, Е.З. КОЧИЕВА<sup>1</sup>

В клубнях картофеля крахмал — основной метаболит, поэтому структурно-функциональный анализ генов его биосинтеза и распада и оценка их вариабельности имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. Конечное содержание крахмала в гетеротрофных органах растений (плодах, семенах, клубнях) зависит не только от скорости биосинтеза составляющих крахмала — амилозы и амилопектина, но и от работы катаболических ферментов. Ферменты биосинтеза крахмала достаточно хорошо описаны, в то время как о механизмах разрушения крахмала мало что известно. На сегодняшний день накапливается все больше данных о важной роли крахмалфосфорилаз в этом процессе. Фосфорилазы крахмала широко распространены среди представителей растительного мира. Структура и полиморфизм гена крахмалфосфорилазы слабо изучены у двудольных растений. В клубнях картофеля разрушение крахмала осуществляется за счет L-формы крахмалфосфорилазы, которую кодирует ген *Pho1a* (*STP23*). В настоящей работе у растений картофеля впервые проведен анализ участка гена *Pho1a* (экзоны II-IV), кодирующего регуляторную часть функционального гликозилтрансферазного домена, в состав которого входят глюкозо-6-фосфат-связывающий сайт, сайт связывания с пиродоксальфосфатом и активный сайт связывания с глюкозой. Для изучения аллельного полиморфизма отобрали 96 образцов картофеля, включая представителей 15 дикорастущих видов подсекций *Potatoe* и *Estolonifera*, один из которых — неклубнеобразующий (*S. etuberosum*), а также 67 сортов и 14 линий культивируемого картофеля *S. tuberosum*. Ядерную ДНК выделяли из молодых листьев калий-ацетатным методом с дополнительной очисткой смесью фенола с хлороформом. Для амплификации изучаемого фрагмента была разработана праймерная комбинация Pho2F (5'-CTGAACATGAAGCAAGCGTA-3') — Pho4R (5'-GGCTATGGACTTAGGTACA-3'). Последовательности у всех сортов и селекционных линий *S. tuberosum* имели протяженность 670 п.н. Длина полученных последовательностей *Pho1a* у видов составляла от 666 п.н. (*S. vernei*, *S. lignicaule*) до 672 п.н. (*S. pinnatisectum*). Всего в составе анализируемых последовательностей у 96 образцов картофеля выявили 59 точечных нуклеотидных замен (single nucleotide polymorphisms, SNPs), из них 15 локализовались в экзонах, что позволило выделить 11 аллельных вариантов, девять из которых обнаружили у дикорастущих видов. У образцов культивируемого картофеля *S. tuberosum* последовательности были представлены двумя аллельными вариантами. Большинство анализируемых сортов и все селекционные линии характеризовались аллельным вариантом *Pho1a*<sub>A2</sub>. Интересно, что он же был выявлен у картофеля, причем не только у видов надсерии *Rotata*, но и у эволюционно более древних видов надсерии *Stellata*. Аллельный вариант *Pho1a*<sub>A10</sub> обнаружили у девяти сортов российской и зарубежной селекции (Bintje, Red Scarlett, Ушконыр, Карасайский, Аврора, Aladin, Чернский, Пламя, Удача). Трансляция последовательности фрагмента *Pho1a* показала, что из 15 SNPs, локализованных в экзонах, три приводили к аминокислотному замещению. У сортов с аллельным вариантом *Pho1a*<sub>A10</sub> выявлено нейтральное замещение M139I. Также две нейтральные аминокислотные замены M139L и T157S обнаружены соответственно у видов *S. circaefolium* и *S. vernei*. Уникальное замещение R212S у неклубнеобразующего картофеля *S. etuberosum* является радикальным. Потенциальное влияние выявленных аминокислотных замен в таком функционально значимом районе на активность фермента крахмалфосфорилазы требует дополнительного изучения. Дальнейший поиск аллельных вариантов, ассоциированных с содержанием крахмала в клубнях картофеля может найти применение в селекционных программах.

Ключевые слова: крахмалфосфорилаза, *Pho1a*, нуклеотидная и аминокислотная вариабельность, дикорастущие виды, сорта и линии картофеля, *Solanum*, подвид *Potatoe*.

Основным резервным источником углерода и энергии в клетках растений можно считать крахмал. Конечное содержание крахмала в гетеротрофных органах (плодах, семенах, и клубнях) зависит не только от скорости биосинтеза составляющих крахмала — амилозы и амилопектина, но и от работы катаболических ферментов. Ферменты биосинтеза крахма-

\* Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 17-29-08017 и КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля».

ла достаточно хорошо описаны, в то время как разрушение крахмала — процесс мало изученный (1). Подробнее всего катаболизм описан в листьях, есть данные для эндоспермов злаковых, меньше всего сведений получено для клубней картофеля (2).

В целом ферменты, разрушающие крахмал, можно подразделить на две категории: гидролитические (амилазы ЕС 3.2.1.1, ЕС 3.2.1.2, 4- $\alpha$ -глюканотрансфераза ЕС 2.4.1.25, мальтаза ЕС 3.2.1.20, изоамилазы ЕС 3.2.1.68) и фосфоролитические ( $\alpha$ -гликанфосфорилаза ЕС 2.4.1.1, мальтозофосфорилаза ЕС 2.4.1.8,  $\alpha$ -глюкан-Н<sub>2</sub>О-дикиназа ЕС 2.7.9.4, фосфоглюкан-Н<sub>2</sub>О-дикиназа ЕС 2.7.9.5) (3-5). Их сравнительная активность может изменяться в зависимости от стадии развития растения или условий среды. Какая из групп ферментов имеет большее значение, спорный вопрос. Предполагается, что процесс инициируется за счет фосфорилирования гликанов, что делает поверхность крахмального зерна более гидрофильной и доступной для гидролитических ферментов, дополнительно создавая селективные белок-углеводные и белок-белковые взаимодействия (5-8).

Среди фосфоролитических ферментов наибольшего внимания заслуживают крахмалфосфорилазы — растительные аналоги  $\alpha$ -гликанфосфорилаз (ЕС 2.4.1.1) (9). Основополагающая роль крахмалфосфорилазы заключается в катализе распада крахмала за счет замещения углерода на фосфор в гликозидной связи с образованием глюкозо-1-монофосфата (10, 11). Однако в случае недостатка фосфата крахмалфосфорилазы могут осуществлять обратную реакцию синтеза крахмала (12).

Крахмалфосфорилазы широко распространены среди представителей растительного мира (13). Наличие множества изоформ — характерная черта крахмалфосфорилаз, которые различаются кинетическими свойствами и локализацией в клетке (13). Большинство высших растений с известными геномами и транскриптомами имеют два типа крахмалфосфорилаз — пластидную (Pho1/L-form/L-SP) и цитозольную (Pho2/H-form/г Н-SP) (14). Пластидный белок размером около 105 кДа имеет низкую аффинность к разветвленным гликанам, в то время как цитозольная форма размером около 90 кДа характеризуется высокой аффинностью к линейным и разветвленным гликанам и даже к гетерогликанам (15-17). Впервые различные формы растительных крахмалфосфорилаз были обнаружены в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и семенах гороха (*Pisum sativum* L.) (18, 19). Структура и полиморфизм генов крахмалфосфорилаз достаточно широко изучены у представителей класса Однодольные: ячменя (*Hordeum vulgare* L.) (20), риса (*Oryza* sp.) (21), кукурузы (*Zea mays* L.) (6, 22, 23). При этом аналогичных данных для двудольных крайне мало: известны полноразмерная последовательность гена батата (24) и кДНК четырех сортов картофеля (25).

В клубнях картофеля крахмал — основной метаболит, поэтому структурно-функциональный анализ генов крахмалфосфорилаз и оценка их варибельности имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку сможет пролить свет на функции этих белков, а также использоваться в селекции новых сортов с повышенным содержанием крахмала, устойчивых к холодовой осахариванию.

В клубнях картофеля разрушение крахмала осуществляется за счет L-формы крахмалфосфорилазы, которая кодируется геном *Pho1a* (*STP23*). Полноразмерная последовательность этого гена у картофеля на сегодняшний день недоступна. В GenBank NCBI размещена лишь соответствующая мРНК *S. tuberosum* (NM 001288286.1), однако известно, что ген находится на 3-й хромосоме (26), имеет длину 16.4 т.п.н. и состоит из 15 экзонов и

14 интронов (27).

В настоящей работе впервые проанализирован аллельный полиморфизм участка гена *Pho1a* со II по IV экзон на широкой выборке образцов, включающих как дикорастущие виды картофеля, так и сорта и линии *S. tuberosum*. Это позволило выявить 11 новых аллельных вариантов, которые могут быть использованы в дальнейшем в селекционных программах.

Целью представленного исследования стала оценка варибельности гена крахмалфосфорилазы *Pho1a* в области II-IV экзонов у клубнеобразующих и неклубнеобразующих видов картофеля (*Solanum*, подрод *Potatoe*), а также у отечественных и зарубежных сортов и линий культивируемого вида *S. tuberosum*.

**Методика.** Для изучения аллельного полиморфизма отобрали 96 образцов картофеля, включая 15 дикорастущих видов подсекций *Potatoe* и *Estolonifera*, один из которых — неклубнеобразующий (*S. etuberosum*), а также 67 сортов и 14 линий культивируемого картофеля *S. tuberosum*. Для дополнительной оценки полиморфизма были взяты последовательности экзонов риса *Oryza sativa* (AK063766.1), кукурузы *Zea mays* (NM 001309854.1), ячменя *Hordeum vulgare* (JQ277327.1) и батата *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (M64362.1), доступные в базе данных GenBank NCBI. Семена дикорастущих видов получали из коллекций Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург, Россия) и CGN (Centre for Genetic Resources, Вагенинген, Нидерланды). Сорта и линии предоставлены Всероссийским НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (Московская обл., Россия).

Ядерную ДНК выделяли из молодых листьев калий-ацетатным методом с дополнительной очисткой смесью фенола с хлороформом (28). Для амплификации изучаемого фрагмента была разработана праймерная комбинация Pho2F (5'-CTGAACATGAAGCAAGCGTA-3') — Pho4R (5'-GGCTATGGACTTAGGTACA-3'). Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1× буфер (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 мМ KCl, 1,5 М MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ dNTPs), по 10 мкМ соответствующего праймера, 0,25 ед. Taq ДНК-полимеразы («Диалат Лтд», Россия) и 100 нг геномной ДНК картофеля. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл — 5 мин при 95 °С; 30 с при 94 °С, 40 с при 55 °С, 1 мин при 72 °С (35 циклов); финальная элонгация — 1 мин при 72 °С. ПЦР проводили с использованием реактивов фирмы «Диалат Лтд» (Россия) в амплификаторе Bio-Rad C1000 («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

Продукты ПЦР визуализировали при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле LE 2 Agarose («Хеликон», Россия) в 1× TBE-буфере, окрашенном бромистым этидием, и документировали в системе BioDocII («Biometra GmbH», Германия). Продукты амплификации секвенировали с использованием тех же праймеров в ЦКП «Биоинженерия» на платформе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer («Applied Biosystems», США).

Выравнивание и анализ полиморфизма нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>) (29). В качестве референсной использовали последовательность мРНК *S. tuberosum* из базы данных GenBank NCBI (NM 001288286.1). Функциональный эффект аминокислотных замен считывали в программе Proveal (<http://proveal.jcvi.org/index.php>).

**Результаты.** Для анализа полиморфизма гена *Pho1a* был выбран фрагмент со II по IV экзон, кодирующий N-концевую регуляторную часть функционального гликозилтрансферазного домена (ID 10136827), в состав которого входят глюкозо-6-фосфат-связывающий сайт, сайт связывания с

пиродоксальфосфатом и активный сайт связывания с глюкозой (20). Подбор сайтов отжига праймеров основывался на возможности амплификации *Pho1a* у филогенетически отдаленных видов, а также на способности дискриминировать целевую изоформу гена от паралогов *Pho1b* и *Pho2*. Фрагмент гена был амплифицирован и секвенирован с помощью разработанной праймерной пары Pho2F-Pho4R.

У всех сортов и селекционных линий *S. tuberosum* последовательности имели одинаковую протяженность — 670 п.н. Длина полученных последовательностей *Pho1a* у видов составляла от 666 п.н. (*S. vernei*, *S. lignicaule*) до 672 п.н. (*S. pinnatisectum*). Длины последовательностей варьировали за счет наличия инсерций и делеций, локализованных исключительно в интронах.

Всего в составе исследуемых последовательностей у 96 образцов картофеля выявили 59 точечных нуклеотидных замен (SNPs), из которых 58 SNPs обнаружили в последовательностях у дикорастущих видов. Общая степень полиморфизма для всей выборки составила 8,75 %, а для набора видов клубнеобразующего и неклубнеобразующего картофеля — 8,6 %. У анализируемых сортов культивируемого картофеля *S. tuberosum* было найдено только два полиморфных сайта (0,29 %), у селекционных линий замены полностью отсутствовали (табл. 1). Подавляющее большинство замен оказались локализованы в интронных последовательностях. Вариативность исследуемых экзонных последовательностей составила 5,95 % за счет наличия 15 SNPs, 14 из которых были найдены у видов и только одна замена — у сортов *S. tuberosum*.

#### 1. Число и доля вариативных сайтов в составе исследуемых последовательностей *Pho1a* (II-IV экзоны) у дикорастущих видов, а также сортов и линий *Solanum tuberosum*

Анализируемая последовательность	Дикорастущие виды и сорт Приор	Сорта	Селекционные линии	Все образцы
Полноразмерный ген	58 (8,60 %)	2 (0,29 %)	0	59 (8,75 %)
кДНК	14 (5,55 %)	1 (0,39 %)	0	15 (5,95 %)
Белок	3 (3,57%)	1 (1,19 %)	0	3 (3,57 %)

Основываясь на наличии вышеназванных замен в экзонных последовательностях, можно выделить 11 аллельных вариантов (табл. 2, представлена online на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>). Девять из них характерны для дикорастущих видов, причем семь уникальны для исследуемой выборки. Аллельный вариант *Pho1a\_A1* был характерен только для неклубнеобразующего картофеля *S. etuberosum*, однако, несмотря на его эволюционную отдаленность от клубнеобразующих видов (30), различия касались только одной SNP. Также не было выявлено множественных SNPs, отличающих представителей видов надсерии *Rotata* от эволюционно более древних видов надсерии *Stellata* (см. табл. 2 на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>). Более того, у некоторых видов *Stellata* (*S. polyadenium*, *S. chacoense*, *S. lignicaule*) обнаружили тот же аллельный вариант *Pho1a\_A2*, что и у большинства анализируемых сортов *S. tuberosum*.

У культивируемого картофеля *S. tuberosum* анализируемые последовательности были представлены двумя аллельными вариантами. Аллельный вариант *Pho1a\_A10* обнаружили у девяти сортов российской и зарубежной селекции (Bintje, Red Scarlett, Ушконыр, Карасайский, Аврора, Алладин/Aladin, Чернский, Пламя, Удача). Сорта отличались от диких видов наличием нуклеотидной замены G150A (индекс соответствует номеру в последовательности кДНК).

Все 14 селекционных линий картофеля были мономорфными по

фрагменту *Pho1a* и имели одну общую с большинством сортов аллель *Pho1a\_A2*, которую также обнаружили у ряда дикорастущих видов (см. табл. 2). Одинаковый аллельный вариант *Pho1a\_A2* у дикорастущих видов и большинства сортов можно, скорее всего, объяснить использованием образцов дикорастущих видов в скрещиваниях. Так, сорта Чародей, Холмогорский, Сударыня, Очарование, Сиреневый туман — гибриды, полученные с участием *S. demissum*, *S. vernei*, *S. stoloniferum*.

Попытка связать присутствие определенного аллельного варианта с качественными характеристиками клубней (содержание крахмала, холодостойкость, холодовое осаживание) не увенчалось успехом.

Провести сравнительный анализ полиморфизма этого участка гена крахмалфосфорилазы у картофеля и других растений достаточно тяжело, так как последовательность *Pho1a* изучена у небольшого числа видов однодольных (6, 20–23), а для двудольных такие данные крайне ограничены (24). Ранее был изучен полиморфизм исследованного участка у дикорастущих и культивируемых видов томата (*Solanum*, секция *Lycopersicon*). Всего в составе таких последовательностей у 13 образцов 11 видов томата детектировано 24 SNPs, из них 7 в последовательностях экзонов, 17 — в последовательностях интронов, общий полиморфизм составил 3,6 % (М.А. Слугина, неопубликованные данные). Интересно, что в последовательностях интронов у трех видов дикорастущего картофеля (*S. limbanianse*, *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*) найдены инделы, общие со всеми видами томата, что еще раз указывает на филогенетическое родство томата и картофеля.

Сравнение фрагмента *Pho1a* (II-IV экзоны) у изучаемых образцов картофеля с последовательностями у других видов, взятыми из базы данных NCBI, показало достаточно консервативную структуру этого участка гена у анализируемых однодольных и двудольных видов растений. При этом гомология первичных экзонных последовательностей была достаточно высокой, а интронных — очень низкой. На исследуемом участке локализация интронов совпадала, но их длины различались. Проведенный анализ позволил выявить 87 SNPs (33, 98 %) (рис., А, размещен на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>). Наибольшая гомология (89,45 %) наблюдалась у картофеля с бататом. Самыми отдаленными оказались последовательности фрагмента *Pho1a* картофеля и кукурузы (23,05 %).

А

Фрагмент гена	Экзон II																			
№ нуклеотида на кДНК	382	383	384	385	386	387	390	391	392	393	396	399	402	405	408	411	414	420	424	426
<i>Solanum tuberosum</i>	L	G	C	A	C	A	G	A	C	G	A	C	C	C	G	C	G	C	A	G
<i>Oryza sativa</i>	A	G	A	A	C	A	G	C	G	A	C	C	C	C	G	C	G	C	A	G
<i>Zea mays</i>	-	-	A	A	C	A	G	A	A	A	A	C	G	C	G	C	A	G	C	A
<i>Ipomoea batatas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	A	C	C	G	C	A	G	C	A
<i>Hordeum vulgare</i>	-	-	-	G	G	G	G	A	A	G	A	C	C	C	G	C	G	A	G	C

Фрагмент гена	Экзон III																																											
№ нуклеотида на кДНК	432	435	438	439	441	442	443	450	451	456	459	462	465	466	468	471	474	475	477	479	480	483	489	490	492	493	495	496	498	504	507	509	510	513	516	517	522	526	527	528	529			
<i>Solanum tuberosum</i>	A	A	A	G	G	A	A	A	G	G	C	A	C	C	G	C	A	G	C	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	C	C	C	C		
<i>Oryza sativa</i>	A	A	G	C	C	A	C	C	C	A	C	A	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	C	A	G	G	A	A	A	A	C	C	C	C	C	C			
<i>Zea mays</i>	A	G	C	C	C	A	C	A	C	A	C	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	
<i>Ipomoea batatas</i>	A	A	A	G	G	A	A	A	A	G	C	A	C	A	C	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	C	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
<i>Hordeum vulgare</i>	A	A	C	A	C	T	A	C	T	A	C	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	G	C

Фрагмент гена	Экзон IV																											
№ нуклеотида на кДНК	534	541	546	549	552	558	562	567	570	571	573	576	579	585	586	588	591	595	597	603	604	606	609	612	624	633	634	636
<i>Solanum tuberosum</i>	A	G	G	A	G	A	G	C	C	C	G	C	C	G	C	G	A	C	A	C	C	C	A	G	C	A	G	C
<i>Oryza sativa</i>	G	G	C	A	C	C	G	A	C	G	A	C	C	T	G	C	A	C	A	A	C	C	A	A	A	A	A	A
<i>Zea mays</i>	A	G	C	C	C	A	C	C	C	A	C	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Ipomoea batatas</i>	G	G	C	A	A	A	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	G
<i>Hordeum vulgare</i>	A	A	C	C	C	C	C	A	A	C	A	A	C	C	C	G	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Б

№ в.о. в анализируемом фрагменте	1	2	3	20	23	31	37	38	41	42	45	48	49	53	84
<i>Solanum tuberosum</i>			M	L	V		L	D	L	R	D	S	A	A	
<i>Oryza sativa</i>			V	L	V		L	D	L	R	D	S	A	A	
<i>Zea mays</i>	M	V	V	L	V		L	D	L	R	D	S	A	A	
<i>Ipomoea batatas</i>	-	-	-	L	V		L	D	L	R	D	S	A	A	
<i>Hordeum vulgare</i>	V	V	A	L	V		L	D	L	R	D	S	A	A	

SNPs в экзонных последовательностях фрагмента гена *Pho1a* (II-IV экзоны) у видов *Solanum tuberosum* L. (NM 001288286.1), *Oryza sativa* L. (AK063766.1), *Zea mays* L. (NM 001309854.1), *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (M64362.1), *Hordeum vulgare* L. (JQ277327.1) (А) и замещения аминокислот в анализируемом участке белка (Б).

Белок Pho1 имеет размер 966 а.о. и состоит из четырех участков: N-концевого транзитного пептида, который осуществляет доставку белка в пластыды, регуляторного домена, центральной инсерции L78 (отличает эту изоформу от Pho2) и каталитического домена. Вместе регуляторный домен L78 и каталитический домен формируют функциональный гликозилтрансферазный домен, функция которого заключается в переносе фрагментов сахара с активированной молекулы донора на молекулу акцептора с последующим образованием гликозидной связи (20, 25). При выравнивании последовательностей известных крахмалфосфорилаз одно- и двудольных растений показано, что регуляторный и каталитический домены наиболее консервативны (20).

Кодирующие последовательности исследованного фрагмента (экзон II—экзон IV) гена крахмалфосфорилазы *Pho1a* картофеля были транслированы, что позволило оценить их аминокислотную вариабельность. Последовательность, доступная для анализа, составила 84 а.о. (позиции со 129-й до 212-й а.о.), входила в состав регуляторного домена и включала глюкозо-6-фосфат- и пиродоксальфосфат-связывающие сайты, а также активный сайт связывания с глюкозой (20).

Только четыре из 15 экзонных SNPs в анализируемом фрагменте приводили к заменам аминокислотных остатков. При этом A/T<sub>31</sub> и G/T<sub>33</sub> входили в состав одного кодона и приводили к замещению по одной и той же аминокислотной позиции: в положении 139 метионин был замещен на изолейцин (M139I) или на лейцин (M139L). Замещение M139I было характерно для группы сортов российской и зарубежной селекции. Среди них Ушконыр, Карасайский, Аврора, Bintje, Чернский, Red Scarlett, Aladin, Пламя, Удача. В остальных исследованных сортах и селекционных линиях аминокислотный полиморфизм не обнаружили. Интересно, что для клонированных и секвенированных ранее полноразмерных кДНК сортов картофеля Diana, Theresa, Saturna и Satina аминокислотный полиморфизм на участке со II по IV экзон не выявлен (25). То есть наличие вариантов последовательности крахмалфосфорилазы показано на более широкой выборке сортов и линий *S. tuberosum*, представленной в настоящей статье.

Значительную вариабельность фрагмента Pho1a выявили у дикорастущих видов. Было детектировано замещение M139L, характерное для дикорастущего клубнеобразующего картофеля *S. circaefolium*. Уникальную для выборки аминокислотную замену T157S обнаружили у образца *S. vernei*. Однако, согласно расчетам в программе Provean (31), обе замены носят нейтральный характер и не приводят к изменению заряда белка. Замена R212S у не клубнеобразующего картофеля *S. etuberosum*, в отличие от вышеописанных, является радикальной, что может привести к изменению структуры белка Pho1a, а значит, повлиять на его функциональность.

Выравнивание полученных аминокислотных последовательностей с транслированными последовательностями (II-IV экзоны) у риса, кукурузы, ячменя и батата выявило 14 аминокислотных замен, среди которых три были радикальными (см. рис., Б, <http://www.agrobiology.ru>).

В целом крайне низкая аминокислотная вариабельность анализируемого регуляторного домена Pho1a у дикорастущих видов и сортов картофеля согласуется с данными, полученными для крахмалфосфорилаз других видов растений (20), что свидетельствует о важной роли этого домена для связывания с субстратами и кофакторами и тем самым объясняет сохранение его консервативности в ходе эволюции. Выявленные в регуляторном домене замещения аминокислот потенциально могут влиять на активность фермента. В дальнейшем необходимо продолжить поиск ассоциаций детек-

тированных замен с содержанием крахмала в клубнях, учитывая перспективность применения таких ассоциаций в селекционных программах.

Таким образом, мы провели анализ участка гена *Pho1a* со II по IV экзон у 15 дикорастущих видов, 67 образцов культивируемого картофеля и 14 селекционных линий и описали его нуклеотидный и аминокислотный полиморфизм. Несмотря на консервативность исследуемых экзонов, было описано 59 нуклеотидных замен на указанном фрагменте, из которых 15 локализовались в экзонах, а три приводили к аминокислотному замещению. Уникальная замена SNP636, приводящая к замещению аргинина на серин R/S, обнаруженная у неклубнеобразующего картофеля *S. etuberosum* является радикальной и потенциально может вызывать изменение конформации белка. Было детектировано 11 аллельных вариантов, и дальнейший поиск их ассоциированных с содержанием крахмала в клубнях картофеля может найти применение в селекционных программах. Влияние выявленных аминокислотных замен в функционально-значимом районе и их потенциального влияния на активность фермента крахмалфосфорилазы требует дополнительного изучения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Smith A., Zeeman S., Smith S. Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2005, 56: 73-98 (doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144257).
2. Zeeman S., Kossmann J., Smith A. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2010, 61: 209-234 (doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112301).
3. Kossmann J., Lloyd J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2000, 19: 171-226 (doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112301).
4. Blennow A., Nielsen T., Baunsgaard L., Mikkelsen R., Engelsen S. Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci.*, 2002, 7(10): 445-450 (doi: 10.1016/S1360-1385(02)02332-4).
5. Fettke J., Eckermann N., Kötting O., Ritte G., Steup M. Novel starch-related enzymes and carbohydrates. *Cell. Mol. Biol.*, 2007, 52: OL883-OL904.
6. Yu Y., Mu H., Wasserman B., Carman G. Identification of the maize amyloplast stromal 112-kD protein as a plastidic starch phosphorylase. *Plant Physiol.*, 2001, 125: 351-359 (doi: 10.1104/pp.125.1.351).
7. Hejazi M., Fettke J., Haebel S., Edner C., Paris O., Froberg C., Steup M., Ritte G. Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J.*, 2008, 55(2): 323-333 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03513.x).
8. Orzechowski S. Starch metabolism in leaves. *Acta Biochim. Pol.*, 2008, 55: 435-445.
9. Breton C., Šnajdrová L., Jeanneau C., Koča J., Imbert A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2006, 16(2): 29R-37R (doi: 10.1093/glycob/cwj016).
10. Schneider E., Becker J., Volkmann D. Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods. *Planta*, 1981, 151(2): 124-134 (doi: 10.1007/BF00387813).
11. Kamrani M., Baghban Kohnehrouz B., Gholizadeh A. Effect of RNAi-mediated gene silencing of starch phosphorylase L and starch-associated R1 on cold-induced sweetening in potato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2016, 91(6): 625-633 (doi: 10.1080/14620316.2016.1208544).
12. Cuesta-Seijo J.A., Ruzanski C., Krucewicz K., Meier S., Hägglund P., Svensson B., Palcic M.M. Functional and structural characterization of plastidic starch phosphorylase during barley endosperm development. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0175488 (doi: 10.1371/journal.pone.0175488).
13. Nighojkar S., Kumar A. Starch phosphorylase: biochemical, molecular and biotechnological aspects. *Genet. Eng. Biotechnol.*, 1997, 17: 189-202.
14. Nakano K., Fukui T. The complete amino acid sequence of potato alpha-glucan phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261: 8230-8236.
15. Fettke J., Eckermann N., Poeste S., Pauly M., Steup M. The glucan substrate of the cytosolic (Pho2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage and subcellular localization. *Plant J.*, 2004, 39(6): 933-946 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02181.x).
16. Fettke J., Eckermann N., Tiessen A., Geigenberger P., Steup M. Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *Plant J.*, 2005, 43(4): 568-586 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02475.x).
17. Fettke J., Poeste S., Eckermann N., Tiessen A., Pauly M., Geigenberger P., Steup M. Analysis

- of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme. *Plant Cell Physiol.*, 2005, 46(12): 1987-2004 (doi: 10.1093/pcp/pci214).
18. Hanes C. The breakdown and synthesis of starch by an enzyme system from pea seeds. *Proc. Roy Soc. London Ser. B*, 1940, 128: 421-450.
  19. Hanes C. The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalysed by potato phosphorylase. *Proc. Roy Soc. London Ser. B*, 1940, 129: 174-208.
  20. Ma J., Jiang Q.T., Zhang X.W., Lan X.J., Pu Z.E., Wei Y.M., Liu C., Lu Z.-X. Structure and expression of barley starch phosphorylase genes. *Planta*, 2013, 238(6): 1081-1093 (doi: 10.1007/s00425-013-1953-6).
  21. Satoh H., Shibahara K., Tokunaga T., Nishi A., Tasaki M., Hwang S.-K., Okita T., Kaneko N., Fujita N., Yoshida M., Hosaka Y., Sato A., Utsumi Y., Ohdan T., Nakamura Y. Mutation of the plastidial  $\alpha$ -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1833-1849 (doi: 10.1105/tpc.107.054007).
  22. Mu H.H., Yu Y., Wasserman B.P., Carman G.M. Purification and characterization of the maize amyloplast stromal 112-kDa starch phosphorylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, 388(1): 155-164 (doi: 10.1006/abbi.2000.2267).
  23. Subasinghe R.M. *Role and regulation of starch phosphorylase and starch synthase IV in starch biosynthesis in maize endosperm amyloplasts*. PhD Thesis. The University of Guelph, Canada, 2013.
  24. Lin Y.C., Chang S.C., Juang R.H. Plastidial  $\alpha$ -glucan phosphorylase 1 complexes with disproportionating enzyme 1 in Ipomoea batatas storage roots for elevating malto-oligosaccharide metabolism. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0177115 (doi: 10.1371/journal.pone.0177115).
  25. Nader Nieto C. *Structural and functional characterization of natural alleles of potato (Solanum tuberosum L.) starch phosphorylases associated with tuber quality traits*. University of Cologne, Cologne, 2011.
  26. Chen X., Salamini F., Gebhardt C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102(2-3): 284-295 (doi: 10.1007/s001220051645).
  27. Schreiber L., Nader-Nieto A.C., Schönhals E.M., Walkemeier B., Gebhardt C. SNPs in genes functional in starch-sugar interconversion associate with natural variation of tuber starch and sugar content of potato (*Solanum tuberosum* L.). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2014, 4(10): 1797-1811 (doi: 10.1534/g3.114.012377).
  28. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(6): 1349 (doi: 10.1093/nar/19.6.1349).
  29. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, 33(7): 1870-1874 (doi: 10.1093/molbev/msw054).
  30. Hawkes J.G. *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, Oxford, 1990 (doi: 10.1086/417081).
  31. Choi Y., Sims G.E., Murphy S., Miller J.R., Chan A.P. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e46688 (doi: 10.1371/journal.pone.0046688).

*1*ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Поступила в редакцию  
119071 Россия, г. Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2, 25 июля 2018 года  
e-mail: shmelkoffa@gmail.com ✉, ekochieva@yandex.ru,  
mashinmail@mail.ru;

*2*ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного  
хозяйства им. А.Г. Лорха,  
140051 Россия, Московская обл., Люберецкий р-н, пос. Коренево-1,  
ул. Лорха, 23,  
e-mail: a-mela@mail.ru

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 5, pp. 907-915

## Pho1a GENE FRAGMENT VARIABILITY IN TUBER-BEARING AND NONTUBER-BEARING POTATO SPECIES (*Solanum* subgenus *Potatoe*) AND *S. tuberosum* L. CULTIVARS

E.O. Shmelkova<sup>1</sup>, M.A. Slugina<sup>1</sup>, A.A. Meleshin<sup>2</sup>, E.Z. Kochieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Biotechnology RAS, Federal Agency for Scientific Organizations, 33/2, Leninskii prospect, Moscow, 119071 Russia, e-mail shmelkoffa@gmail.com (✉ corresponding author), ekochieva@yandex.ru, mashinmail@mail.ru,

<sup>2</sup>Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Farming, Federal Agency for Scientific Organizations, 23, ul. Lorkha, pos. Korenevo-1, Lyubertsy Region, Moscow Province, 140051 Russia, e-mail a-mela@mail.ru  
ORCID

Shmelkova E.O. orcid.org/0000-0002-1046-7742

Meleshin A.A. orcid.org/0000-0002-6018-3676

Slugina M.A. orcid.org/0000-0003-1281-3837

Kochieva E.Z. orcid.org/0000-0002-6091-0765

The authors declare no conflict of interests



## Abstract

Starch is the main metabolite in potato tubers. Therefore structure and functional analysis of starch metabolism genes are of fundamental and applied interest. The final starch amount in sink organs (fruits, seeds and tubers) depends not only on the amylose and amylopectin synthesis, but also on the catabolic enzymes activity. Proteins that participate in starch biosynthesis are rather well studied, while the starch degradation reactions are not fully understood. To date, more data on the crucial role of starch-phosphorylases in this process have been reporting. Starch phosphorylases are widespread among plant species, but the coding genes structure and genetic diversity remain unclear. In potato tubers starch is cleaved by L-form of starch phosphorylase encoded by the *Pho1a* (*STP23*) gene. In the current work *Pho1a* gene fragment (exon II—exon IV) variability was analyzed for the first time in 15 wild and 81 cultivated potato accessions. The chosen gene fragment corresponds to the regulatory part of the glycosyltransferase domain and comprises glucose-6-P binding site, pyridoxal phosphate cofactor binding site and active site (glucose binding). The nucleotide and amino acid polymorphism is determined. A total of 96 potato accessions were used for allelic diversity analysis: 15 wild species from *Potatoe* and *Estolonifera* subsections (where *S. etuberosum* is a nontuber-bearing species), 67 cultivated potato varieties and 14 breeding lines of *S. tuberosum*. Nuclear DNA was isolated from young leaves using potassium-acetate method with phenol-chloroform additional purification. Primer combination Pho2F (5'-CTGAACATGAAGCAAGCGTA-3')—Pho4R (5'-GGCTA-TGGACTTAGGTACA-3') was designed for chosen fragment amplification. The sequences of all varieties and breeding lines of *S. tuberosum* had a length of 670 bp. The length of the obtained *Pho1a* sequences in species ranged from 666 bp (*S. vernei*, *S. lignicaule*) up to 672 bp (*S. pinnatisectum*). Totally 59 SNPs were detected, 15 of them localized in exons. It allowed us to identify 11 allelic variants, moreover 9 of them were found in wild species. Cultivated potato *S. tuberosum* has two allelic variants. The *Pho1a\_A2* allelic variant was observed in the majority of analyzed potato cultivars and all the breeding lines. Interestingly, the same variant was detected in some wild potato species, belonging not only to superseries Rotata, but also to Stellata that is considered to be more ancient. The *Pho1a\_A10* allelic variant was found in 9 cultivars (Bintje, Red Scarlett, Ushkonir, Karasaikii, Aurora, Aladin, Chernskii, Plamy, Udacha). The *Pho1a* gene fragment translation revealed that 3 out of 15 exonic SNPs led to amino acid substitutions. In potato cultivars with the *Pho1a\_A10* allelic variant neutral M139I substitution was detected. The other neutral substitutions M139L and T157S were identified in *S. circaefolium* and *S. vernei*, correspondingly. The only radical substitution R212S was detected in nontuber-bearing *S. etuberosum*. The potential role of the found amino acid substitutions in the functional protein domain requires the further investigation. Further search for the allelic variants associated with starch content in tubers can be used in potato breeding programs.

Keywords: starch phosphorylase, *Pho1a*, nucleotide and amino acid variability, wild species, potato cultivars, *Solanum* subgenus *Potatoe*.

---

### Научные собрания

#### IV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ВОДОРΟΣЛИ: ПРОБЛЕМЫ ТАКСОНОМИИ, ЭКОЛОГИИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МОНИТОРИНГЕ»

(4-28 сентября 2018 года, г. Санкт-Петербург)

Информация: <https://www.binran.ru/science/konferentsii-i-shkoly/vodorosli-problemy-taksonomii-ekologii-i-ispolzovanie-v-monitoringe/>

#### VIII МЕЖДУНАРОДНАЯ ШКОЛА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКЕ «ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ»

(19-23 ноября 2018 года, г. Звенигород, Московская область)

Информация: <http://school.img.ras.ru/#&panel1-1>

#### XXXI ЗИМНЯЯ МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»

(11-14 февраля 2019 года, г. Москва, Институт биорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН)

Информация: <http://www.ibch.ru/press/events/science/2542>