УДК 635.21:631.521.32

ПОЛИМОРФИЗМ САХАРОЗОСИНТАЗНОГО ДОМЕНА ГЕНОВ *SUS4* СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ РОССИЙСКОЙ, БЕЛОРУССКОЙ И КАЗАХСТАНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Слугина М.А. [1, 2, 3] *– аспирант кафедры биотехнологии*
Запекина Т.И. [4] *– м.н.с. лаборатории биоинженерии*
Мелешин А.А. [4] *– кандидат с.-х. наук, заведующий отделом генетики*

[1] *Кафедра биотехнологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова*
119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

[2] *Федеральный исследовательский центр*
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук
119071, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33

[3] *Аграрно-технологический институт Российского университета дружбы народов*
117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, к. 2
E-mail: mashinmail@mail.ru

[4] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение*
«Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха»
140051, Россия, Московская обл., Люберецкий р-н, п. Красково 1, ул. Лорха, д. 23
E-mail: aleksej-meleshin@yandex.ru, tatianazap@bk.ru

Картофель является одной из основных стратегических сельскохозяйственных культур в Российской Федерации, Республике Беларусь и Республике Казахстан. В настоящее время достигнуты значительные успехи в понимании процессов углеводного метаболизма и взаимного превращения «сахароза - крахмал» в клубнях картофеля. Показано, что одними из ключевых генов, определяющих качество картофельной продукции, являются гены метаболизма сахарозы. Сахарозосинтаза (Sus) один из основных ферментов распада сахарозы. Сахарозосинтаза (Sus) осуществляет обратимый гидролиз сахарозы до УДФ-глюкозы и фруктозы. Идентификация новых генов, кодирующих растительные сахарозосинтазы, и анализ их нуклеотидных последовательностей – важный шаг к пониманию физиологической роли и метаболических механизмов, связанных с обменом углеводов в клубнях картофеля. В данной работе приведен анализ нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма сахарозосинтазного домена гена Sus4. Изучена последовательность фрагмента гена Sus4 с интрона III по экзон VI у 9 сортов картофеля российской, казахской и белорусской селекции. Длина полученных фрагментов варьировала от 977 п.н. (у сортов Фаворит, Карасайский, Мирас) до 1013 п.н. (у сортов Зорочка, Манифест, Елизавета, Башкирский). Полученные последовательности содержали как единичные мутации, так и инсерции и делеции. Общий уровень полиморфизма изученных последовательностей составил 5.82%. Всего в исследованном фрагменте найдено 58 SNPs и 4 индели. Наиболее вариабельные интроны - IV (12,4%) и V (9,18%). Наиболее вариабельный экзон - IV. Показано наличие 7 аллельных вариантов и 6 вариантов аминокислотных последовательностей.

Ключевые слова: картофель, сорта, сахаросинтаза Sus4, полиморфизм.

Введение

Картофель является одной из основных стратегических сельскохозяйственных культур в Российской Федерации, Республике Беларусь и Республике Казахстан. В большинстве стран мира широко развита система промышленной переработки картофеля на различные продукты, и для успешного получения некоторых из них: чипсы, фри, печёный картофель, – важным является содержание сухого вещества, в том числе содержание крахмала и редуцирующих сахаров.

За последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в понимании процессов углеводного метаболизма и взаимного превращения «сахароза - крахмал» в клубнях картофеля. Показано, что одними из ключевых генов, определяющих качество картофельной продукции, являются гены метаболизма сахарозы.

Одним из важнейших ферментов углеводного метаболизма растений является сахарозосинтаза (*Sus*). Сахарозосинтаза (*Sus4*) расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы, обеспечивая растение энергией для флоэмного транспорта и поставляя субстрат для дыхания. При этом сахарозосинтаза создает субстрат для синтеза крахмала, тем самым обеспечивая растение запасом питательных веществ. Кроме того, было показано, что сахарозосинтаза играет роль в формировании ответной реакции растений на воздействие биотических и абиотических стрессовых факторов (Liu et al., 2013).

Анализ структуры и вариабельности генов *Sus4* имеет большое значение как для понимания молекулярных процессов контроля углеводного обмена у растений, так и для разработки маркеров, применимых в селекции новых сортов картофеля.

Целью данной работы является описание нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма последовательностей фрагмента сахарозосинтазного домена гена сахарозосинтазы *Sus4* у различных сортов картофеля российской, белорусской и казахстанской селекции и оценка их аллельного разнообразия.

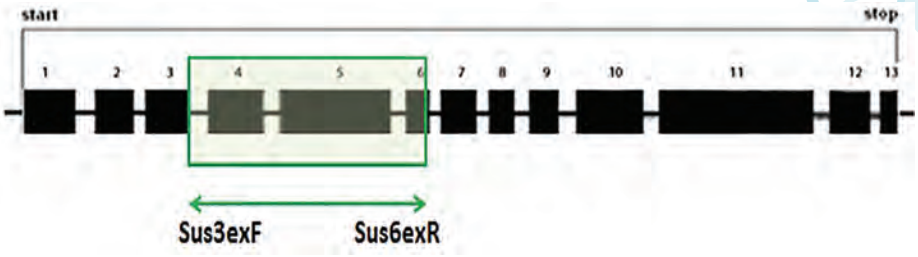

Рис. 1. Графическое изображение анализируемого фрагмента гена Sus4.

Материалы и методы

Для изучения полиморфизма генов-гомологов *Sus4* у сортов отечественной и зарубежной селекции был составлен набор из 9 сортов картофеля, которые включали сорта российской (Фаворит, Елизавета, Башкирский), белорусской (Лилея, Зорачка, Манифест) и казахстанской селекции (Карасайский, Аксор, Мирас). Отобранные для анализа образцы клубней были предоставлены Всероссийкийм научно-исследовательским институтом картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ВНИИКХ), Биотехнологическим Центром Казахстана и Белорусским НИИ картофелеводства.

ДНК из растений выделяли калий-ацетатным методом с двойной очисткой смесью фенол-хлоформ (Edwards, 1991).

Ранее был изучен полиморфизм нуклеотидных последовательностей гена *Sus4*, кодирующих сахарозосинтазный и глюкозилтрансферазный домены белка (Борис и др., 2011, Слугина и др., 2014). Показано, что сахарозосинтазный домен является полиморфным, что достаточно редко для функциональных доменов, и поэтому именно он выбран в данной работе для оценки аллельной вариабельности сортов картофеля. Для амплификации последовательностей сахарозосинтазного домена разработана система из праймеров, приводящая к амплификации фрагмента гена *Sus4* с экзона III по экзон VI (рис.1).

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1Х буфер (50мМ TrisCl (pH 8.6), 50мМ KCl 0,1% Tween 20 («Диалат», Москва)), 1,5 М MgCl2, 20мМ 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 сек, 57°С – 35 сек и 72°С –1 мин.

Анализ полученных продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле.

Полученные фрагменты секвенировали с использованием тех же праймеров, что и для амплификации. Секвенирование проводили с использованием реагентов ABI PRISM DyeDeoxiterminatorsequencingkit («AppliedBiosystems», США) согласно протоколу фирмы-производителя на автоматическом секвенаторе ABI 310 capillary DNA Analyzer («AppliedBiosystems», США) в ФИЦ «Биотехнология» РАН.

Выравнивание и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA6.0 (Tamura et al, 2013).

Результаты и обсуждение

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Sus4* (экзон III – экзон VI).

Протяженность кодирующей последовательности гена *Sus4* картофеля (*Solanum tuberosum*) составляет 2415 п.н. и включает 14 экзонов. Для последовательности *Sus4* картофеля характерно наличие двух доменов, определяющих основные функции белка: сахарозосинтазного (I–XI экзон) и глюкозилтрансферазного (XII экзон) (Fu et al., 1995; Baud et al., 2004). Ранее было показано, что у видов и сортов *Solanum* наиболее вариабельным является фрагмент сахарозосинтазного домена гена, включающий последовательность с III по VI экзон (Борис и др., 2011, Слугина и др., 2014).

У анализируемых сортов картофеля фрагмент гена с интрона III по экзон VI был амплифицирован с использованием разработанных праймеров и определена его первичная последовательность. Общая протяженность исследуемого фрагмента сахарозосинтазного домена составила от 977 п.н. (у сортов Фаворит, Карасайский, Мирас) до 1013 п.н. (у сортов Зорочка, Манифест, Елизавета, Башкирский). Это является следствием наличия четырех инделей, две из которых находятся в интроне IV, две другие – в интроне V. Так у сортов Карасайский и Фаворит была выявлена шестинуклеотидная делеция в интроне IV и тридцатинуклеотидная – в интроне V гена *Sus4* сортов Фаворит, Карасайский, Мирас (рис.2). Как было показано ранее, аналогичные индели были характерны для ряда дикорасту-

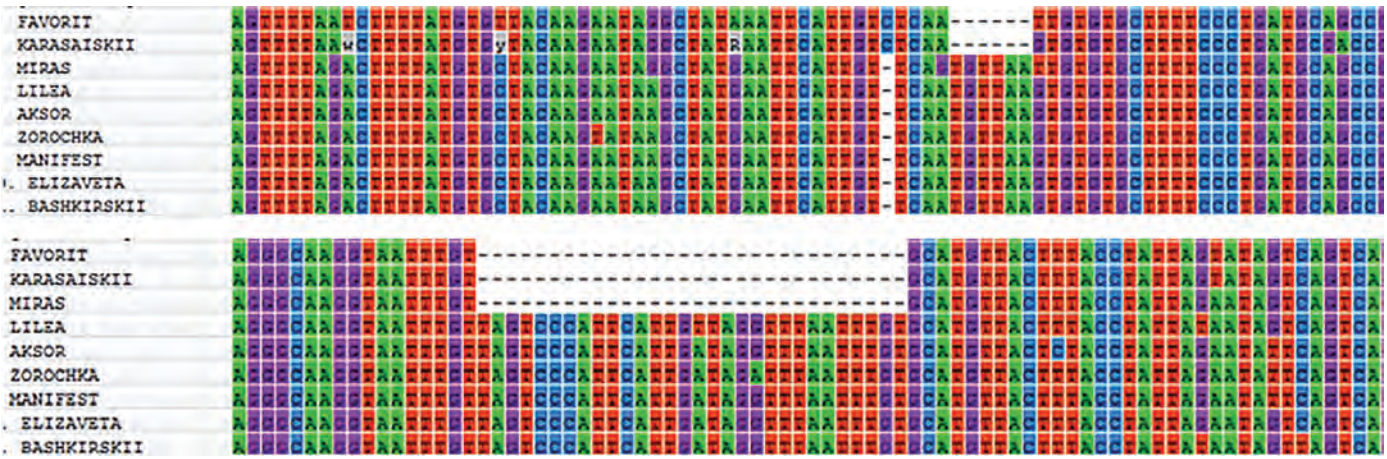

Рис. 2. Индели в интронных последовательностях анализируемого фрагмента сахарозосинтазы.

Участок гена *Sus4*	Последовательность, пн	Вариабельные сайты, (%)	Информативные сайты, (%)	Количество инделей.
Интрон III	83	4 (4,81)	2 (2,40)	0
Экзон IV	156	5 (3,20)	4 (2,56)	0
Интрон IV	77-84	10 (12,4)	3 (3,72)	2
Экзон V	190	8 (4,21)	1 (0,52)	0
Интрон V	235-266	23 (9,18)	11 (4,39)	2
Экзон VI	235	8 (3,40)	4 (1,70)	0
Всего	**977-1013**	**58 (5,82)**	**25 (2,51)**	**4**

Рис. 3. Полиморфизм исследуемых последовательностей фрагмента гена Sus4.

щих видов картофеля (подсекции *c*) (К.В. Борис, личные данные). Для селекции современных сортов картофеля активно используются межвидовая гибридизация, таким образом, данные индели могли закрепиться в их геноме.

Анализ исследуемых нуклеотидных последовательностей гена сахарозосинтазы сортов показал, что уровень полиморфизма был высок, принимая во внимание, что анализируемые последовательности представляют собой фрагмент функционального домена гена *Sus4* и составил 5,82% (58 полиморфных сайтов) (рис. 3). При этом почти половина (43,12%) от общего числа полиморфных сайтов являются информативными и дают возможность выделения определенных сортовых групп.

Анализ вариабельности отдельных экзонов и интронов показал, что, как и ожидалось, более полиморфными были интронные последовательности, наибольший уровень вариабельности выявлен в последовательностях интрона IV (12,4%) и интрона V (9,18%). Среди экзонов наиболее вариабельным является экзон IV (рис. 3). Ранее при исследовании аналогичного участка гена сахарозосинтазы у набора сортов казахстанской селекции также было показано, что данные интроны наиболее вариабельны (Слугина и др., 2014).

По наличию инделей в последовательностях интронов IV и V исследуемые сорта делятся на 4 группы (рис. 4), которые могут указывать на общность их происхождения. Группа 1, представленная сортами Зорочка, Башкирский, Манифест и Елизавета, характеризуется присутствием шестинуклеотидной индели в интроне IV, а также тридцати- и однонуклеотидных инделей в интроне V. Сорта Аскор и Лилея, Фаворит и Карасайский соответственно также составляют пары по наличию общих инделей. Казахстанский сорт Мирас характеризуется наличием только шестинуклеотидной индели в интроне IV (рис.4).

Анализ аллельных вариантов

Несмотря на то, что общий уровень полиморфизма экзонов гораздо ниже, чем интронов, именно экзонные последовательности представляют наибольший интерес, так как именно нуклеотидные замены в экзонах могут привести к аминокислотным заменам, в конечном счете что может отразиться на функции кодируемого фермента.

Исходя из наличия в составе последовательностей экзонов отдельных полиморфных нуклеотидов, можно предположить наличие как минимум 7 аллельных вариантов последовательностей, кодирующих сахарозосинтазный домен. Экзонные последовательности сортов картофеля Зорочка, Башкирский и Манифест полностью идентичны и представляют собой один аллельный вариант (А). Последовательности экзонов сахарозосинтазного домена сортов Аскор, Елизавета, Лилея, Фаворит, Карасайский, Мирас имеют сортоспецифичные SNPs, и соответственно различные аллельные варианты (рис.5).

Сорт		Аллель
Зорочка	G C A T T A T C G G T C C C C G A A A A G	A
Башкирский	G C A T T A T C G G T C C C C G A A A A G	
Манифест	G C A T T A T C G G T C C C C G A A A A G	
Аксор	G C A T T A T C G G T G C C C G A A A A G	B
Елизавета	G C A T C A T C G G T C C T C G A A A T T	C
Лилея	G C G T C A T T G G T C C C G G A A G A G	D
Фаворит	G T A C C A T C G G C C C C C A T G G A G	E
Карасайский	G T A C C A G C A A C C A C C A T G G A G	F
Мирас	T C G T C T T C G G C C C C C G A A A A G	G

Рис. 5. Аллельные варианты генов сахарозосинтазы сортов российской, белорусской и казахстанской селекции.

Анализ аминокислотной последовательности

Белок *Sus4* состоит из 805 а.о. и имеет молекулярную массу около 92

		Интрон IV	Интрон V	
Зорочка	-	T G T T A A	T A G T C C C A T T C A T T G A T A G A T T T A A T T T G T T	Группа 1
Башкирский	-	T G T T A A	T A G T C C C A T T C A T T G A T A G G T T T A A T T T G T T	
Манифест	-	T G T T A A	T A G T C C C A T T C A T T G A T A G G T T T A A T T T G T T	
Елизавета	-	T G T T A A	T A G T C C C A T T C A T T G A T A G G T T T A A T T T G T T	
Аксор	-	T G T T A A	T A G T C C C A T T C A T T G A T A G G T T T A A T T T G T -	Группа 2
Лилея	-	T G T T A A	T A G T C C C A T T C A T T G T T A G G T T T A A T T T G T -	
Мирас	-	T G T T A A	- -	Группа 3
Фаворит	C	- - - - - -	- -	Группа 4
Карасайский	C	- - - - - -	- -	

Рис. 4. Выявленные индели в интронах IV и V у анализируемых сортов картофеля.

Манифест	W	N	D	E	F	E	D	A	Группа 1
Башкирский	W	N	D	E	F	E	D	A	
Зорачка	W	N	D	E	F	E	D	A	
Лилея	W	N	D	E	F	E	D	A	
Фаворит	W	N	D	E	F	D	D	A	Группа 2
Елизавета	W	N	D	E	F	E	V	S	Группа 3
Аксор	W	N	D	E	L	E	D	A	Группа 4
Карасайский	W	K	N	K	F	D	D	A	Группа 5
Мирас	C	N	D	E	F	E	D	A	Группа 6

Рис. 6. Замещения аминокислот в исследуемом фрагменте полипептида Sus4.

кДа (Fu et al.,1995). При трансляции нуклеотидных последовательностей экзонов анализируемого участка сахарозосинтазного домена получена последовательность из 193 аминокислотных остатков. В исследуемой полипептидной последовательности выявлено 8 аминокислотных замен (рис. 6).

Стоит отметить, что среди анализируемых экзонных последовательностей девяти сортов картофеля показано наличие семи аллельных вариантов нуклеотидных последовательностей и только шесть вариантов аминокислотных последовательностей. Это связано с тем, что сорта, для которых характерен аллельный вариант А (Манифест, Башкирский, Зорачка) и сорт Лилея, при трансляции имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Интересно, что соответствующие нуклеотидные последовательности экзонов данных двух аллельных вариантов имеют достаточно большое количество замен – 5 SNPs. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данные замены носят скорее нейтральный характер, и их закрепление в процессе эволюции не скажется на функционировании белка.

Полипептидные последовательности сортов Фаворит, Елизавета, Аскор, Карасайский и Мирас характеризуются наличием специфичных сайтов замещения аминокислот. При этом сорт Карасайский имеет наибольшее (по отношению к группе 1) количество замещений, и вероятность того, что он несет отличные от других сортов признаки, наиболее высока.

Заключение

Таким образом, среди исследуемого набора из 9 сортов картофеля российской и зарубежной селекции выявлено наличие 7 аллельных вариантов нуклеотидной последовательности сахарозосинтазного домена гена *Sus4*. Из 21 полиморфных сайтов, выявленных в последовательностях экзонов, 8 приводили к замене аминокислотных остатков. Подобное разнообразие нуклеотидного состава в пределах функционального домена гена сахарозосинтазы может представлять интерес для селекционеров, так как может влиять на свойства белка и, как следствие, приводить к изменению содержанию крахмала и сахаров в клубнях.

Работа выполнена при поддержке ГК № 14.M04.12.0016 МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии».

THE POLYMORPHISM OF THE SUS4 SUCROSE SYNTHASE DOMAIN SEQUENCES IN RUSSIAN, BELORUSSIAN AND KAZAKH POTATO CULTIVARS

Slugina M.A.[1,2,3], Zapekina T.I.[4], Meleshin A.A.[4]

[1]Department of Biotechnology of the Biological faculty of the Lomonosov State University 119234, Russia, Moscow, Leninskie Gory, 1, str.12

[2]Federal Research Centre «Fundamental principal of biotechnology» of Russian Academy of Sciences 119071, Russia, Moscow, Leninskiy prospect, 33

[3] Peoples' Friendship University of Russia 117198, Russia, Moscow, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 8 E-mail: mashinmail@mail.ru

[4] Federal State Budgetary Scientific Research Institution «All-Russian Scientific Research Institute of potato farming by A.G. Lorh» 140051, Russia, Moscow region, Lyuberetskiy district, p. Kraskovo 1, Lorkha street, 23 E-mail: aleksej-meleshin@yandex.ru, tatianazap@bk.ru

Summary

The potato is one of the main strategic crops in the Russian Federation, Belarus and Kazakhstan. Currently, we have achieved significant advances in the understanding of metabolic mechanism of carbohydrate and interconversion «sucrose – starch» in potato tubers. Sucrose synthase (*Sus*) is a key enzyme in the breakdown of sucrose. Sucrose synthase (*Sus*) is catalyzing a reversible reaction of conversion sucrose and UDP into fructose and UDP-glucose. The identification and subsequent characterization of the genes encoding plant sucrose synthase is the first step towards understanding their physiological roles and metabolic mechanism involved in carbohydrate accumulation in potato tubers. In the present work the nucleotide and amino acid polymorphism of the *Sus4* gene fragments containing sequences of the sucrose synthase domain were analyzed. *Sus4* gene fragments (intron III – exon VI) in 9 potato cultivars of Russian, Kazakh and Belarusian breeding were analyzed. The polymorphism of the *Sus4* sucrose synthase domain sequences was first examined. The length of analyzed fragment varied from 977 b.p. (cultivars Favorit, Karasaiskii, Miras) to 1013 b.p. (cultivars Zorochka, Manifest, Elisaveta, Bashkirskii). It was demonstrated that the examined sequences contained point mutations, as well as insertions and deletions. The common polymorphism level was 5.82%. It was shown that the examined sequences contained 58 SNPs and 4 indels. The most variable were introns IV (12.4%) and V (9.18%). The most variable was exon IV. 7 allelic variants were detected. 6 different amino acid sequences specific to different varieties were also identified.

Keywords: *potato, varieties, sucrose synthase gene Sus4, polymorphism.*

Литература

1. Baud, S. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis / S. Baud, M.N. Vaultier, C. Rochat // Journal of Experimental Botany. – 2004. – V.55. – P.397–409.
2. Edwards, S.K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses / S.K. Edwards, C. Johonstone, C. Thompson // Nucl. Acids Res. – 1991. – V.19. – P.1349.
3. Fu, H. High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron / H. Fu, S. Y. Kim, W. D. Park // The Plant Cell. – 1995. – V.7. – P.1387-1394.
4. Liu, Y-H. Regulation of fruit and seed response to heat and drought by sugars as nutrients and signals / Y-H. Liu, C.E. Of er, Y-L. Ruan // Frontiers in Plant Science. – 2013. – V.4. – P.12.
5. Tamura, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. / G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – V.30. – P.2725-2729.
6. Борис К. В. Изучение внутривидового полиморфизма фрагмента гена сахарозосинтазы *Sus4* картофеля (Solanum tuberosum) / К. В. Борис, Н. Н. Рыжова, Е. З. Кочиева // Генетика – 2011. – Т. 47. – С. 190-198.
7. Слугина М.А. Внутривидовой полиморфизм генов сахарозосинтазы картофеля сортов российской и казахстанской селекции /М. А. Слугина, К. В. Борис, А. А. Какимжанова, Е. З. Кочиева // Генетика – 2014. – Т. 50. – С. 677-682.