

На правах рукописи



Борис Ксения Витальевна

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ *SUS4* И *RX1* У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА
SOLANUM СЕКЦИИ *PETOTA***

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в группе молекулярных методов анализа генома лаборатории генетической инженерии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра «Биоинженерия» Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Кочиева Елена Зауровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ежова Татьяна Анатольевна
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры генетики

кандидат биологических наук
Мельникова Наталия Владимировна
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук г. Новосибирск

Защита состоится «12» декабря 2013 г. в 15.00 ч. на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3. www.vigg.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте института.

Автореферат разослан «11» ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Синельщикова Т. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) принадлежит к семейству Solanaceae и является важнейшей сельскохозяйственной культурой. Российская Федерация занимает ведущие позиции по объемам производства картофеля (<http://faostat.fao.org>). Потери урожая картофеля вызывает воздействие целого ряда фитопатогенов, борьба с которыми является важнейшей и до сих пор нерешенной задачей. Помимо этого, большое значение имеет изучение факторов, влияющих на качество урожая картофеля, а именно содержание и состав углеводов в клубнях, основным из которых является крахмал.

В последние годы значительное внимание уделялось исследованию генов углеводного метаболизма картофеля. Был выявлен ряд локусов количественных признаков (QTL), связанных с накоплением и транспортом углеводов у картофеля (Li *et al.*, 2008, 2010). Одним из них является ген *Sus/SuSy*, кодирующий фермент сахарозосинтазу, обеспечивающий обратимое расщепление сахарозы на УДФ-глюкозу и фруктозу, которые необходимы для синтеза крахмала в клубнях картофеля и являются основными запасными сахарами плодов томата. Показано также, что сахарозосинтаза вовлечена в ответные реакции растения на абиотический стресс, в том числе осмотический, анаэробный и температурный (Dejardin *et al.*, 1999; Kleines *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2013). Однако, несмотря на важность этого фермента, на данный момент из всех представителей Solanaceae известны последовательности генов сахарозосинтазы только картофеля (*S. tuberosum*) и томата (*S. lycopersicum*). Полиморфизм генов сахарозосинтазы у представителей Solanaceae практически не изучен, отсутствуют данные об аллельном разнообразии гена и о численности данного семейства генов у видов *Solanum* секции *Petota*. Изучение варибельности генов сахарозосинтазы у различных представителей семейства может прояснить общие вопросы, связанные не только с углеводным метаболизмом растений, но и с устойчивостью к абиотическому стрессу.

Одним из факторов, влияющих на урожайность картофеля и качество получаемой продукции, является зараженность посевов различными вирусными болезнями, при этом потери урожая могут достигать 70% (Анисимов и др., 2009). Одним из вредоносных является X вирус картофеля (PVX), поражающий надземные части растения. Несмотря на существенные потери от вирусных инфекций на сегодняшний день не существует надежных химических методов борьбы с ними. Наиболее перспективным методом является получение растений картофеля, несущих гены устойчивости к патогенным вирусам. Однако устойчивость современных сортов картофеля постепенно преодолевается новыми штаммами вируса в ходе коэволюции растение-вирус. Поэтому большое значение приобретает поиск новых источников генов устойчивости к X вирусу, которыми могут стать дикорастущие виды картофеля. Идентификация новых генов устойчивости к X вирусу и изучение их полиморфизма у этих видов может не только прояснить

ряд вопросов формирования ответной реакции растений на воздействие вирусной инфекции, но и способствовать селекции новых, более устойчивых к вирусам сортов. Следует отметить, что на сегодняшний день известны последовательности генов устойчивости к X вирусу только у двух образцов – *S. tuberosum* и *S. acaule*. Однако нет данных о полиморфизме этих генов у других представителей *Solanum* секции *Petota*, в том числе видов и образцов устойчивых к PVX.

Помимо идентификации генов сахарозосинтазы и генов устойчивости к PVX у дикорастущих видов картофеля, которые могут стать источниками ценных хозяйственных признаков, и изучения варибельности их последовательностей, интерес представляет также изучение возможной эволюции данных генов у представителей *Solanum* и их использование для изучения филогенетических отношений в пределах рода *Solanum*.

Цели и задачи исследования. Целями работы стали идентификация генов сахарозосинтазы и генов устойчивости к X вирусу картофеля у широкого круга представителей рода *Solanum* секции *Petota*, а также изучение внутривидового и межвидового полиморфизма данных генов.

Для достижения данных целей были поставлены следующие задачи:

1. Клонировать и секвенировать гены-гомологи сахарозосинтазы *Sus4* у видов рода *Solanum* секции *Petota*.
2. Провести анализ полиморфизма нуклеотидных и аминокислотных последовательностей клонированных генов сахарозосинтазы представителей рода *Solanum* секции *Petota*. Охарактеризовать их экзон-интронную структуру и основные функциональные белковые домены.
3. Изучить внутривидовой полиморфизм фрагмента сахарозосинтазного домена гена *Sus4* у сортов картофеля (*S. tuberosum*) отечественной и зарубежной селекции с различным содержанием крахмала в клубнях.
4. Провести анализ межвидового полиморфизма фрагментов сахарозосинтазного и глюкозилтрансферазного доменов генов-гомологов *Sus4* у широкого круга представителей семейства Solanaceae. На основании полученных данных составить схему возможной эволюции данного гена у представителей семейства Solanaceae.
5. Клонировать и секвенировать гены-гомологи *Rx1*, определяющего устойчивость к PVX у видов рода *Solanum* секции *Petota*.
6. Провести анализ полиморфизма нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *Rx1* генов у представителей рода *Solanum* секции *Petota*. Охарактеризовать их экзон-интронную структуру и основные функциональные белковые домены.
7. Провести оценку внутри- и межвидового полиморфизма NBS домена генов-гомологов *Rx1* у видов *Solanum* секции *Petota* и сортов *S. tuberosum* отечественной и зарубежной селекции методом EcoTILLING.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые получены полные кодирующие последовательности генов сахарозосинтазы у 13 видов картофеля, представляющих 11 серий подсекций *Potatoe* и *Estolonifera* секции *Petota*. Изучена экзон-интронная структура, а также кодируемые данными генами белковые последовательности. Впервые определен уровень межвидового полиморфизма генов сахарозосинтазы у представителей рода *Solanum* секции *Petota*.

На основании данных о вариабельности последовательностей фрагментов сахарозосинтазного домена *Sus4* гена впервые оценен внутривидовой полиморфизм 24 сортов картофеля (*S. tuberosum*) с различным содержанием крахмала в клубнях. Изучен внутри- и межвидовой полиморфизм по фрагменту сахарозосинтазного домена гена *Sus2* у видов и сортов томата. Впервые оценен полиморфизм сахарозосинтазного и глюкозилтрансферазного доменов генов сахарозосинтазы у различных представителей семейства Solanaceae (роды *Solanum*, *Capsicum*, *Datura*, *Atropa*, *Physalis*, *Lycium*, *Brunfelsia* и *Nicotiana*). Предложена схема возможной эволюции данного гена у представителей *Solanum*. Показано, что *Sus4* наравне с другими низкокопийными генами ядерного генома может быть успешно использован для изучения филогении и эволюции у Solanaceae.

Впервые идентифицированы последовательности 15 генов-гомологов *Rx1*, определяющего устойчивость к X вирусу у дикорастущих видов картофеля *S. acaule*, *S. megistacrolobum*, *S. leptophyes*, *S. berthaultii*, *S. brevicaule*, *S. gourlayi*. Определена экзон-интронная структура генов, выявлены и описаны все основные домены *Rx1 Solanum*. Изучен полиморфизм их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Методом EcoTILLING впервые проведен анализ фрагментов NBS доменов *Rx1* генов 96 образцов, включающих 18 сортов *S. tuberosum*, а также 41 вид *Solanum* секции *Petota*. В результате оценен уровень как внутри-, так и межвидового полиморфизма фрагмента NBS домена генов-гомологов *Rx1*, а также выявлен ряд видо- и образецспецифичных SNP.

Полученные в результате работы данные о полиморфизме генов *Sus4* и *Rx1* могут быть использованы в маркер-опосредованной селекции новых сортов картофеля, скрининге аллельного разнообразия коллекций, в том числе для идентификации новых источников хозяйственно-ценных признаков. Данные о полиморфизме гена *Sus4* также могут использоваться для решения проблем систематики и эволюции видов *Solanum*.

Личный вклад автора заключается в самостоятельном проведении теоретических и экспериментальных исследований. Результаты работы получены лично автором или же при ее непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях, в том числе на 9th Plant GEM (Стамбул, 2011), MolPhy3 (Москва, 2012) и 16th EBM (Марсель, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 10 работ, из них четыре – в рецензируемых научных журналах и шесть – в сборниках материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 139 печатных страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 235 наименований. Работа содержит 17 таблиц и 36 рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и анализ полиморфизма генов-гомологов *Sus4* у видов *Solanum* секции *Petota*

Для работы были отобраны 13 видов *Solanum* секции *Petota* из различных эколого-географических зон, относящиеся к надсериям *Rotata* и *Stellata* подсекции *Potatoe*, а также образец *S. etuberosum* подсекции *Estolonifera* (Hawkes, 1990) (табл. 1).

Клонирование полных кодирующих последовательностей генов-гомологов *Sus4* у видов *Solanum* секции *Petota*. На основании известной последовательности гена *Sus4* *S. tuberosum* (U24087) были разработаны праймеры, позволяющие амплифицировать полные кодирующие последовательности генов-гомологов *Sus4* у дикорастущих видов картофеля, а также дифференцировать их от последовательностей гена *Sus3*, кодирующего другую изоформу сахарозосинтазы (рис. 1).

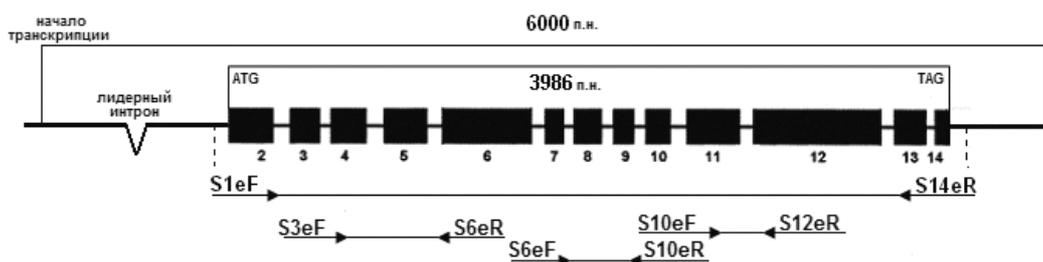


Рис. 1. Схема расположения праймеров для клонирования и секвенирования *Sus4* последовательностей

С использованием разработанных праймеров были амплифицированы полные кодирующие последовательности генов-гомологов *Sus4* у 13 видов *Solanum*, выбранных для анализа. Длина всех полученных фрагментов составила около 4000 п.н. Амплифицированные фрагменты были клонированы при помощи Qiagen Cloning Plus Kit. Всего были получены 23 последовательности (табл. 1).

Таблица 1. Образцы *Solanum* секции *Petota*, отобранные для клонирования генов-гомологов *Sus4*

№ коллекции CGN	Вид	Серия
подсекция <i>Potatoe</i> надсерия <i>Rotata</i>		
20568	<i>S. demissum</i>	<i>Acaulia</i>
21350	<i>S. vernei</i>	<i>Tuberosa</i>
-	<i>S. tuberosum</i> Приор	<i>Tuberosa</i>
21316	<i>S. boliviense</i>	<i>Megistacroloba</i>
17606	<i>S. stoloniferum</i>	<i>Longipedicellata</i>
22720	<i>S. limbanense</i>	<i>Conicibaccata</i>
подсекция <i>Potatoe</i> надсерия <i>Stellata</i>		
23775	<i>S. chacoense</i>	<i>Yungasensa</i>
17723	<i>S. lignicaule</i>	<i>Lignicaulia</i>
22698	<i>S. bulbocastanum</i>	<i>Bulbocastana</i>
22345	<i>S. pinnatisectum</i>	<i>Pinnatisecta</i>
17746	<i>S. polyadenium</i>	<i>Polyadenia</i>
22767	<i>S. circaeifolium</i>	<i>Circaeifolia</i>
подсекция <i>Estolonifera</i>		
17714	<i>S. etuberosum</i>	<i>Estolonifera</i>

Полиморфизм нуклеотидной последовательности генов-гомологов *Sus4* видов *Solanum* секции *Petota*. Полученные последовательности были выровнены и проанализированы в программе MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011).

Было показано, что все известные на сегодняшний день последовательности *Sus* генов растений можно разделить на четыре группы по их экзон-интронной структуре (Baud *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2005). Анализ клонированных последовательностей сахарозосинтазы видов *Solanum* секции *Petota* показал, что они относятся к SUS1 группе сахарозосинтаз растений.

Длина клонированных последовательностей генов сахарозосинтазы составила от 3961 п.н. у *S. demissum* до 4033 п.н. у *S. stoloniferum* (табл. 2). Общий уровень межвидовой вариабельности составил 15,3%. Полиморфизм экзонных последовательностей варьировал от 6,6% в экзоне IX до 13,2% в экзоне IV. При этом наиболее полиморфными оказались последовательности экзона IV (13,2%), а также экзонов X (12,5%) и II (12,2%). В пределах экзонов был выявлен ряд видоспецифичных замен, а также SNPs, характерные для групп видов.

Вариабельность интронных последовательностей представляла отдельный интерес, так как они могут быть более информативны при решении проблем систематики и эволюции видов *Solanum*. Интроны были более полиморфны, и, помимо единичных замен, содержали индели. Так, специфичные индели были обнаружены в интронах образцов *S. demissum* и *S. etuberosum*. Помимо видоспецифичных, были выявлены также индели, характерные для групп видов. Так, все *Sus4* последовательности видов надсерии *Stellata* содержали инсерцию ACAC/TACA в интроне V. Интересно, что такая же инсерция была обнаружена и у одного вида надсерии *Rotata* – *S. demissum*.

Таблица 2. Протяженность экзонов и интронов и полиморфизм клонированных последовательностей генов сахарозосинтазы видов *Solanum*

Экзоны	Длина, п.н.	SNPs (%)	Интроны	Длина, п.н.	SNPs (%)
экзон II	98	12 (12,2)	интрон II	256-274	50 (18,3)
экзон III	127	14 (11,0)	интрон III	92-95	19 (20,0)
экзон IV	152	20 (13,2)	интрон IV	81-85	15 (17,6)
экзон V	193	16 (8,2)	интрон V	236-267	69 (25,8)
экзон VI	336	26 (7,7)	интрон VI	86	17 (19,7)
экзон VII	96	9 (9,4)	интрон VII	86-90	10 (11,1)
экзон VIII	174	16 (9,2)	интрон VIII	90-92	24 (26,0)
экзон IX	117	14 (11,9)	интрон IX	97-107	24 (22,4)
экзон X	167	21 (12,5)	интрон X	74-78	35 (44,8)
экзон XI	225	18 (8,0)	интрон XI	245-272	75 (27,5)
экзон XII	564	58 (10,3)	интрон XII	80-85	17 (20,0)
экзон XIII	139	14 (10,0)	интрон XIII	97-100	17 (17,0)
экзон XIV	30	2 (6,6)			
Все экзоны	2418	240 (9,9)	Все интроны	1520-1631	373 (22,8)

Наиболее полиморфными оказались последовательности сахарозосинтазы образца *S. tuberosum*, который является не клубнеобразующим видом и относится к подсекции *Estolonifera* (Hawkes, 1990; Spooner and Salas, 2006).

Сравнение полученных последовательностей генов-гомологов *Sus4* 13 видов *Solanum* с известной последовательностью гена *Sus3*, кодирующего другую изоформу сахарозосинтазы *S. tuberosum* (U24088), подтверждает полученные ранее данные о значительных отличиях генов *Sus4* и *Sus3* в интронных областях (Fu and Park, 1995).

Полиморфизм аминокислотной последовательности *Sus4* видов *Solanum* секции *Petota*.

Полученные нуклеотидные последовательности были транслированы и проанализированы на наличие аминокислотных замен. Протяженность всех 23 последовательностей составила 805 а.о. Из выявленных 240 полиморфных нуклеотидных позиций 63 SNPs приводили к образованию 27 консервативных и 36 радикальных аминокислотных замен.

Анализ аминокислотных последовательностей сахарозосинтазного (экзоны I-XI) и глюкозилтрансферазного (экзон XII) доменов, характерных для *Sus* белков, позволил выявить у всех изученных последовательностей два высоко консервативных трансмембранных мотива: FLGRIPMVFNVVILSPHGYFA (экзон VI) и FGLTVEAMTCGLPTFATN (экзон XII), ранее описанные только у Fabaceae (Silvente *et al.*, 2003). В пределах последовательностей данных мотивов у всех исследованных образцов *Solanum* аминокислотных замен выявлено не было. На N-конце всех проанализированных последовательностей было показано наличие сайта фосфорилирования Ser11, характерного для большинства известных генов сахарозосинтазы (Winter *et al.*, 1997; Silvente *et al.*, 2003).

Проведенный сравнительный анализ показал, что, в отличие от проанализированных *Sus4* последовательностей, *Sus3* *S. tuberosum* имеет замену треонин/серин в трансмембранном мотиве 2.

Филогенетический анализ последовательностей генов-гомологов *Sus4* видов *Solanum* секции *Petota*. На основе полученных данных о нуклеотидном полиморфизме анализируемых *Sus4* последовательностей была построена дендрограмма (рис. 2).

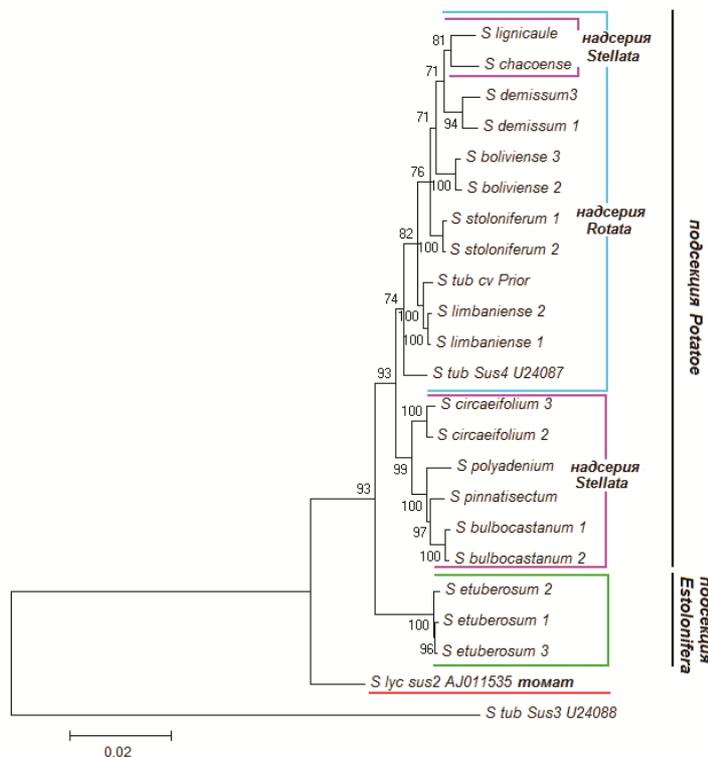


Рис. 2. Дендрограмма генетических различий, построенная по результатам анализа нуклеотидного полиморфизма генов сахарозосинтазы видов *Solanum* секции *Petota* методом МР (Maximum Parsimony)

На дендрограмме изученные последовательности формируют три основных кластера. Как и ожидалось, первый кластер (ИБ=100) образуют последовательности не клубнеобразующего вида *S. tuberosum* подсекции *Estolonifera*. Остальные два кластера включают виды клубнеобразующего картофеля. Второй кластер состоит из видов надсерии *Stellata*, которые принято считать наиболее древними (Hawkes, 1990; Spooner and Salas, 2006). Интересно, что два вида надсерии *Stellata*: *S. chacoense* и *S. lignicaule*, образуют отдельный подкластер в пределах третьего крупного кластера, образованного видами надсерии *Rotata*. В целом положение на дендрограмме изученных видов соответствует современной классификации (Olmstead *et al.*, 2008).

Анализ внутривидового полиморфизма фрагмента сахарозосинтазного домена гена *Sus4*. Для анализа внутривидового полиморфизма был выбран фрагмент гена *Sus4* с III по VI экзон, кодирующий основную часть сахарозосинтазного домена, определяющего функции фермента. В работе были использованы сорта *S. tuberosum* с различными показателями крахмалистости, сроками созревания и рекомендованные для выращивания в различных зонах, что могло позволить определить возможную корреляцию между выявленными нуклеотидными/аминокислотными заменами и хозяйственными характеристиками (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика взятых для анализа сортов картофеля (*S. tuberosum*)

№	Сорт	Страна	Срок созревания*	Крахмалистость, %*	Регионы*
1	Бинтје	Нидерланды	-	различная	-
2	Фрегата	Польша	среднепоздний	14-21	-
3	Гранола	Германия	-	низкая-средняя	-
4	Адретта	Германия	среднеранний	13-18	7, 10, 11, 12
5	Ресурс	Россия	среднеспелый	13-16	2, 3, 4, 5
6	Яхонт	Белоруссия	-	-	-
7	Атлант	Белоруссия	позднеспелый	17-22	3
8	Петербургский	Россия	среднеспелый	13-16	1, 2, 3, 4, 7, 12
9	Невский	Россия	среднеранний	10-12	все регионы
10	Чародей	Россия	среднеранний	15-17	1,2,4,5,6,7,12
11	Жуковский ранний	Россия	раннеспелый	10-12	2,3,4,5,6,7,8,9,10,12
12	Руссет Бурбанк	США	-	высокая	-
13	Шепорд	США	-	-	-
14	Никита	Нидерланды	среднеранний	13.5-18	-
15	Ласунак	Белоруссия	позднеспелый	15-22	2,3,4,5,6
16	Лазурит	Белоруссия	раннеспелый	14-16	3, 4, 5
17	Явар	Белоруссия	среднеранний	10-13	4
18	Раменский	Россия	среднепоздний	14-19	2
19	Любимец	Россия	среднеранний	11-15	3
20	Альтаир	Россия	среднеспелый	13-17	-
21	Брянский ранний	Россия	раннеспелый	14-16	3, 4, 6
22	Вестник	Россия	среднеспелый	16-18	3
23	Голубизна	Россия	среднеспелый	17-19	3, 4, 5, 6
24	Дезире	Нидерланды	среднеспелый	13-21	7

Регионы: 1 – Северный, 2 – Северо-Западный, 3 – Центральный, 4 – Волго-Вятский, 5 – Центрально-Черноземный, 6 – Северо-Кавказский, 7 – Средневожский, 8 – Нижневожский, 9 – Уральский, 10 – Западно-Сибирский, 11 – Восточно-Сибирский, 12 – Дальневосточный (*по данным Симаков и др, 2010)

Анализ нуклеотидной последовательности фрагментов сахарозосинтазного домена гена

***Sus4* сортов *S. tuberosum*.** Длина секвенированных фрагментов гена *Sus4* у 24 сортов картофеля варьировала от 938 до 974 п.н. (табл. 4). Общий уровень нуклеотидной вариабельности среди 24 сортов составил 10,5%. В составе изучаемых последовательностей были детектированы как точковые замены, так и индели. В целом полиморфизм в последовательностях интронов более чем в два раза превосходил полиморфизм в экзонах.

Таблица 4. Характеристика нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Sus4* у 24 сортов картофеля

Участок гена	Длина, п.н.	Число вариабельных сайтов (%)
фрагмент интрона III	73	11 (15%)
экзон IV	152	9 (5,9%)
интрон IV	78-83	15 (18-19,2%)
экзон V	193	12 (6,2%)
интрон V	235-272	38 (14-16,2%)
фрагмент экзона VI	207	14 (6,7%)
все интроны	386-428	64 (14,9-16,5%)
все экзоны	552	35 (6,3%)
общая длина	938-974	99 (10-10,5%)

В пределах экзонов были выявлены SNPs, в том числе сортоспецифичные, которые могут быть использованы для маркирования сортов картофеля (табл. 4). Наиболее вариабельным по длине оказался интрон V, последовательность которого содержала две

инсерции: 30-нуклеотидная инсерция встречалась у 11 сортов. У 13 сортов в 3'-концевом участке интрона присутствовала (T)₈-последовательность. Интрон IV у 17 анализируемых образцов содержал инсерцию ATGTT.

По наличию инсерций в интронах IV и V все изученные последовательности гена *Sus4* картофеля можно разделить на четыре основных типа (рис. 3). Самыми распространенными у изученных *Sus4* последовательностей сортов оказались I и IV типы. I тип был обнаружен у 13 сортов с различным содержанием крахмала в клубнях. IV тип также характеризовал смешанную по характеристикам крахмалистости группу из 15 сортов. Последовательность II типа обнаружена у трех сортов (Ласунак, Атлант, Дезире), III тип – у двух сортов (Раменский, Альтаир) (рис. 3).

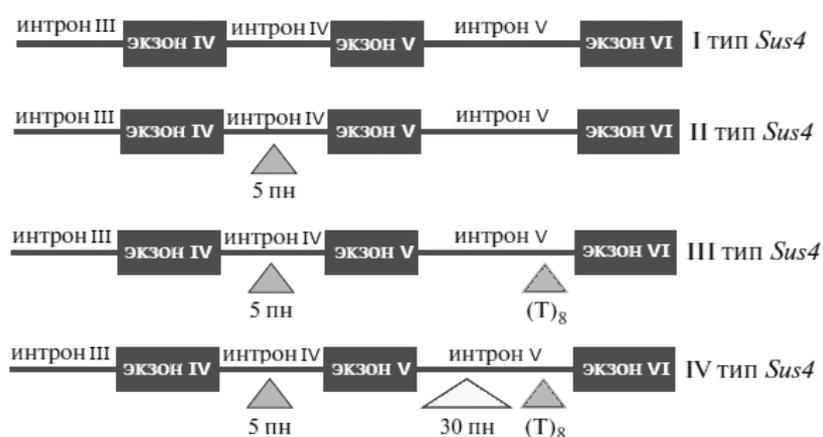


Рис. 3. Структура исследованного участка и типы последовательностей фрагмента гена *Sus4* картофеля (треугольниками обозначены инсерции)

Кластерный анализ последовательностей фрагментов сахарозсинтазного домена гена *Sus4* сортов *S. tuberosum*. На дендрограмме, построенной на основании данных о нуклеотидном полиморфизме изученных последовательностей, сорта картофеля объединяются в пять основных групп (рис. 4). В целом такая кластеризация совпала с описанным выше делением *Sus4* последовательностей картофеля на типы по наличию инсерций в интронах (рис. 3).

Ранее было показано, что сахарозсинтаза является одним из основных ферментов, вовлеченных в метаболизм крахмала в клубнях картофеля, а также участвует в ответных реакциях на абиотический стресс. Поэтому отдельный интерес представлял поиск возможной корреляции между выявленным полиморфизмом последовательности гена *Sus4* и хозяйственными характеристиками. В анализ были взяты сорта картофеля, различающиеся по крахмалистости, срокам созревания и рекомендуемым регионам выращивания (табл. 3).

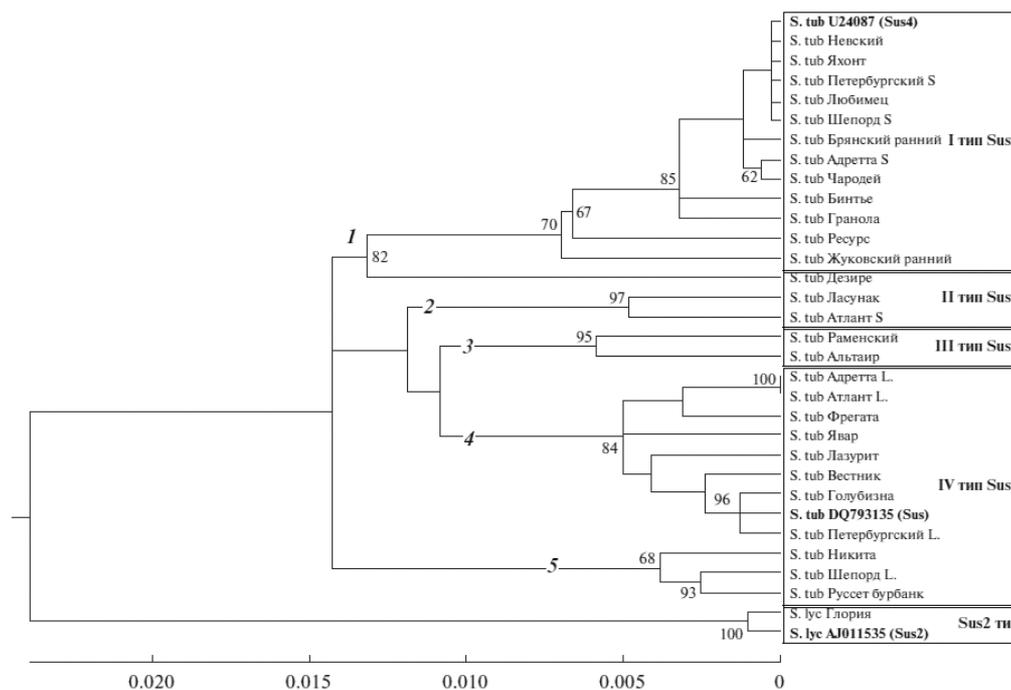


Рис. 4. Дендрограмма генетических различий, построенная на основании анализа нуклеотидного полиморфизма фрагмента гена *Sus4* 24 сортов картофеля методом NJ. 1–5 – кластеры; цифры в узлах ветвей – индексы бутстрепа; *S. tub* – *Solanum tuberosum*, *S. lyc.* – *Solanum lycopersicum*)

Однако в результате проведенного анализа выявленных SNPs, а также кластерного анализа прямой зависимости между полиморфизмом изученных последовательностей и хозяйственными характеристиками сортов картофеля выявлено не было. Это может быть связано с тем, что несмотря на участие гена *Sus4* в формировании углеводного состава клубней на данный признак также влияют и другие гены, например, *GbssI* и *Stp23* (Li *et al.*, 2008). При этом степень влияния каждого из них до сих пор не определена.

Анализ аминокислотной последовательности фрагмента сахарозсинтазного домена *Sus4* сортов *S. tuberosum*. Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента гена *Sus4* картофеля были транслированы и проанализированы.

Таблица 5. Аминокислотные замены, выявленные в результате анализа последовательностей фрагмента сахарозсинтазы *Sus4* у 24 сортов картофеля

№	Аминокислотная замена	Порядковый номер а.о.	Кодон	Сорт, образец	Тип замен*
1	Q/E	76	CAA/GAA	Лазурит	R
2	I/V	98	ATC/GTC	Руссет Бурбанк, Шепорд, Никита	C
3	T/K	119	ACG/AAG	Явар	R
4	N/D	136	AAT/GAT	Ресурс	R
5	K/E	138	AAG/GAG	Брянский ранний	R
6	V/A	142	GTA/GCA	Руссет Бурбанк	C
7	T/K	151	ACA/AAA	Ресурс	R
8	C/F	169	TGC/TTC	Дезире	R
9	A/T	176	GCC/ACC	Руссет Бурбанк, Шепорд, Никита	C
10	S/T	203	TCT/ACT	Жуковский ранний	C
11	V/L	207	CTC/GTC	Невский	C
12	T/M	217	ACG/ATG	Петербургский	R
13	E/D	221	GAA/GAT	11 образцов**	C
14	H/L	254	CAT/CTT	Петербургский	R

15	R/L	257	CGC/CTC	Адретта	R
16	A/E	259	GCG/GAG	Петербургский	R

*С – консервативная аминокислотная замена, R – радикальная аминокислотная замена (Zhang, 2000)

**Петербургский, Голубизна, Вестник, Лазурит, Явар, Фрегата, Адретта, Атлант, Ласунак, Никита, Руссет Бурбанк.

Длина аминокислотной последовательности составила 184 а.о. В анализируемых последовательностях были детектированы 35 полиморфных нуклеотидных позиций, из которых 16 (45%) приводили к шести консервативным и 10 радикальным аминокислотным заменам (табл. 5).

Сравнительный анализ полиморфизма сахарозосинтазного домена *Sus* генов культурных и дикорастущих видов картофеля и томата. Помимо изучения гена сахарозосинтазы у картофеля представлялось интересным изучить полиморфизм данного гена у другого близкородственного представителя рода *Solanum* подрода *Potatoe* – томата. Известно, что гомологом гена *Sus4* картофеля у томата является ген *Sus2* (Fu and Park, 1995). Для проведения анализа полиморфизма гена *Sus2* у культурных и дикорастущих видов томата был выбран тот же фрагмент сахарозосинтазного домена с III по VI экзон, который был ранее проанализирован у картофеля.

В работе были использованы 28 образцов пяти видов томата: *S. cheesmaniae*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum*, при этом обыкновенный томат *S. lycopersicum* был представлен шестью разновидностями и 14 сортами.

Длина полученных фрагментов сахарозосинтазного домена гена *Sus2* томата составила от 904 до 907 п.н. Наибольшее число замен и инделей выявлено в последовательности интрона V. При этом 80% всех обнаруженных нуклеотидных замен были детектированы в *Sus2* последовательностях диких видов томата *S. cheesmaniae*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*. Для них также было характерно наличие специфичного набора SNPs. Помимо этого, в пятом интроне образца *S. habrochaites* выявлена делеция четырех нуклеотидов TTCC, а также мононуклеотидная инсерция.

Уровень полиморфизма по изучаемому фрагменту гена *Sus2* томата был крайне низким, причем не только внутривидовой (0,6%), но и межвидовой (6,8%). Интересно, что межвидовой полиморфизм по изученному фрагменту у томата оказался ниже, чем внутривидовой полиморфизм по аналогичному участку у *S. tuberosum* (10,5%).

Сравнение полученных *Sus4* последовательностей с известными последовательностями гена *Sus3* *S. tuberosum* (U24088) и гена *Sus2* *S. lycopersicum* подтверждает данные о более высоком сходстве последовательностей гена *Sus4* картофеля с *Sus2* томата, чем с геном *Sus3* картофеля. Это может служить непрямым доказательством в поддержку гипотезы о том, что гены *Sus4* и *Sus2* возникли до разделения эволюционных линий *S. tuberosum* и *S. lycopersicum* (Fu and Park, 1995).

Полиморфизм генов-гомологов *Sus4* у представителей семейства Solanaceae. Ген *Sus4* картофеля является монокопийным, что делает возможным его использование для реконструкции филогении и изучения таксономических отношений внутри семейства. Поэтому представлялось интересным изучить полиморфизм гена сахарозосинтазы у представителей семейства, относящихся к различным таксономическим группам, что позволило проследить эволюцию генов сахарозосинтазы у Solanaceae.

Для проведения анализа были отобраны представители подсемейств Nicotianoideae, Petunioideae, а также представители шести триб подсемейства Solanoideae: Capsiceae, Datureae, Hyoscyameae, Lycieae, Physaleae и Solaneae. Триба Solaneae представлена видами рода *Solanum*, пяти подродов (*Leptostemonum*, *Minon*, *Solanum*, *Brevantherum*, *Potatoe*), семи секций (*Crinitum*, *Melongena*, *Dulcamara*, *Solanum*, *Brevantherum*, *Petota*, *Lycopersicon*).

Полиморфизм фрагмента сахарозосинтазного домена у представителей семейства Solanaceae. Изученный фрагмент сахарозосинтазного домена включал участок с IV по VI экзон. Протяженность экзонных последовательностей у 47 образцов Solanaceae составила 405 п.н. Наиболее полиморфной была последовательность экзона V (192 п.н.), которая содержала ряд SNPs, в том числе видоспецифичных.

Последовательности интронов также были высоко полиморфны и помимо SNPs содержали индели. Так, длина интрона V значительно варьировала из-за наличия инделей, в том числе видо- и образецспецифичных. Все без исключения проанализированные последовательности Solanaceae содержали в интроне IV инсерцию ATGTT, отсутствие которой было характерно только для ряда проанализированных ранее *Sus4* последовательностей сортов *S. tuberosum* (рис. 3). Сравнение последовательностей фрагмента сахарозосинтазного домена сортов *S. tuberosum* и дикорастущих видов *Solanum* секции *Petota* позволило выявить новые типы *Sus4* по наличию инсерций в интронах. При этом последовательности ряда дикорастущих видов *Solanum* секции *Petota* можно отнести к ранее описанным у сортов *S. tuberosum* типам (рис. 5). Также было показано, что межсортовой полиморфизм *S. tuberosum* по изученному фрагменту гена *Sus4* достаточно высок и сравним с межвидовым полиморфизмом видов *Solanum* секции *Petota*. Это может быть связано с широким использованием дикорастущих видов картофеля в селекции современных сортов.

Сравнение последовательностей сахарозосинтазного домена гена *Sus2* томата и гомологичного ему гена *Sus4* картофеля показало, что ген *Sus2* содержит специфичную для всех видов томата инсерцию GAATTATTA в интроне V (рис. 5).

Инсерция 30 п.н. в интроне V, выявленная у ряда образцов *Solanum* секции *Petota*, была также характерна и для других изученных последовательностей сахарозосинтаз

изученного фрагмента составила 513 п.н. При этом уровень межвидового нуклеотидного полиморфизма был достаточно высок для такого консервативного функционального домена и составил 27%. Полиморфизм среди видов *Solanum* был значительно ниже и составил 16%.

Все изученные последовательности были транслированы. Длина полученного фрагмента составила 170 а.о. Было показано, что они содержат консервативный трансмембранный мотив (FGLTVVEAMTCGLPTFATNH), наличие которого характерно для генов сахарозосинтазы разных видов растений (Winter *et al.*, 1997; Silvente *et al.*, 2003). В пределах данного домена были выявлены 18 SNPs, не приводящих к аминокислотным заменам. В других участках гликозилтрансферазного домена были выявлены 30 аминокислотных замен, 17 из них – у видов рода *Solanum*. Некоторые замены характеризовали группы видов. Так, например, аминокислотная замена Lys/Glu была обнаружена у всех изученных видов *Solanum*.

На основании полученных данных о полиморфизме последовательностей экзона XII гена *Sus4* и его гомологов у различных представителей семейства Solanaceae были построены дендрограммы методами NJ, MP и ML (рис. 6). Полученные дендрограммы были конгруэнтны.

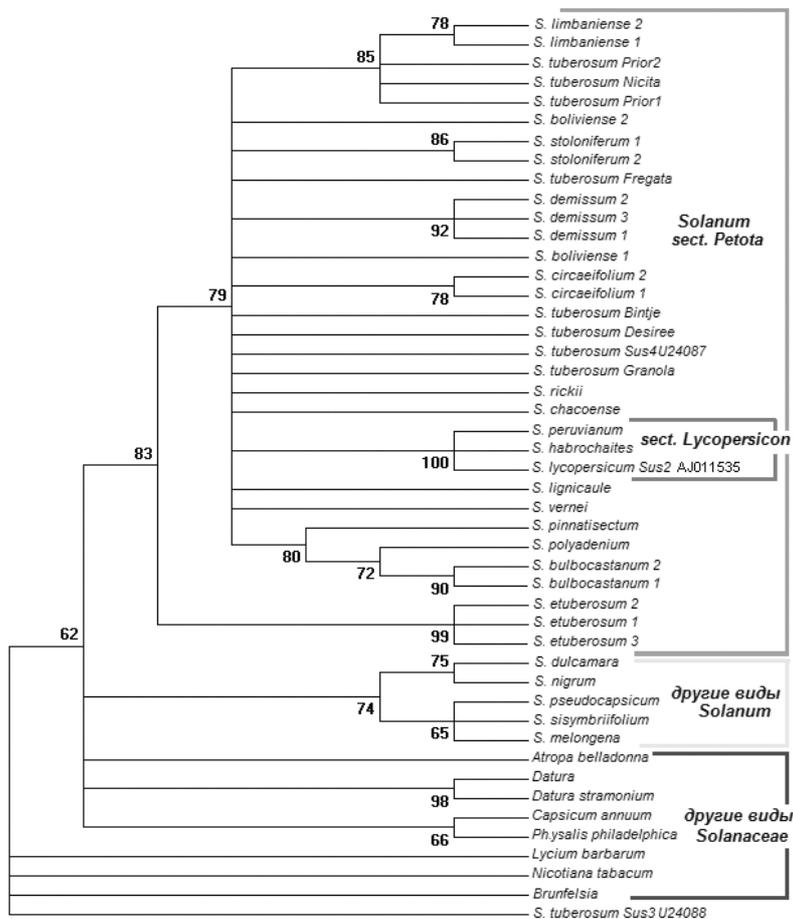


Рис. 6. Дендрограмма, отражающая сходство последовательностей гликозилтрансферазного домена генов сахарозосинтазы представителей Solanaceae. Метод ML (Maximum Likelihood).

В целом положение изученных последовательностей на дендрограммах соответствовало современным таксономическим данным (Olmstead *et al.*, 2008). Все виды секции *Petota* формировали один кластер. Интересно отметить, что виды томата (секция *Lycopersicon*) оказались ближе к клубнеобразующему картофелю (подсекция *Potatoe*), чем к неклубнеобразующим видам (подсекция *Estolonifera*). Положение видов томата на дендрограмме еще раз подтверждает их принадлежность к роду *Solanum*.

Также нужно отметить положение на дендрограмме гена *Sus3* картофеля относительно *Sus4* последовательностей видов Solanaceae, которое указывает на то, что эволюционные линии данных генов разошлись до отделения трибы Solaneae.

Полученные результаты показывают, что ген сахарозсинтазы может быть успешно использован для филогенетических исследований у представителей Solanaceae на различных таксономических уровнях.

Идентификация и изучение полиморфизма генов-гомологов *Rx1* у видов *Solanum* секции *Petota*

Подбор образцов для идентификации генов-гомологов *Rx1*. Для реализации задач работы были отобраны 17 образцов *Solanum*, представляющих четыре серии секции *Petota*, используемые в скрещиваниях для получения сортов картофеля и охарактеризованные по уровню устойчивости к X вирусу (табл. 6).

Таблица 6. Образцы видов картофеля, отобранные для клонирования генов-гомологов *Rx1*

Номер коллекции CGN	Образец	Серия	Устойчивость к PVX*
20644	<i>S. berthaultii</i>	<i>Tuberosa</i>	S
18118	<i>S. berthaultii</i>	<i>Tuberosa</i>	I
22717	<i>S. brevicaule</i>	<i>Tuberosa</i>	VS
18030	<i>S. brevicaule</i>	<i>Tuberosa</i>	I
18040	<i>S. gourlayi</i>	<i>Tuberosa</i>	I
18126	<i>S. leptophyes</i>	<i>Tuberosa</i>	S
18174	<i>S. leptophyes</i>	<i>Tuberosa</i>	VS
17729	<i>S. microdontum</i>	<i>Tuberosa</i>	VS
-	<i>S. tuberosum</i> сорт Пушкинский	<i>Tuberosa</i>	нет данных
17594	<i>S. marinasense</i>	<i>Tuberosa</i>	нет данных
22702	<i>S. sparsipilum</i>	<i>Tuberosa</i>	нет данных
18109	<i>S. okadae</i>	<i>Tuberosa</i>	нет данных
18206	<i>S. sucrense</i>	<i>Tuberosa</i>	нет данных
22364	<i>S. megistacrolobum</i>	<i>Megistacroloba</i>	VS
18029	<i>S. acaule</i>	<i>Acaulia</i>	I
18068	<i>S. acaule</i>	<i>Acaulia</i>	I
21347	<i>S. chacoense</i>	<i>Yungasensa</i>	нет данных

* иммунные образцы (I), средне восприимчивые образцы (IS), восприимчивые образцы (S), сильно восприимчивые образцы (VS) по данным CGN, (Нидерланды).

Разработка праймеров для амплификации генов-гомологов *Rx1* у видов *Solanum* секции *Petota*. Подбор праймеров для амплификации *Rx1* генов у видов клубнеобразующего картофеля является ключевым этапом работы. Это связано с тем, что, с одной стороны, разрабатываемые праймеры должны быть высокоспецифичными, чтобы амплифицировать только гомологи *Rx1* гена, с другой – праймеры, разрабатываемые на ограниченном массиве данных, представленных в генбанке, должны приводить к амплификации *Rx1* гомологов у филогенетически отдаленных видов картофеля секции *Petota*.

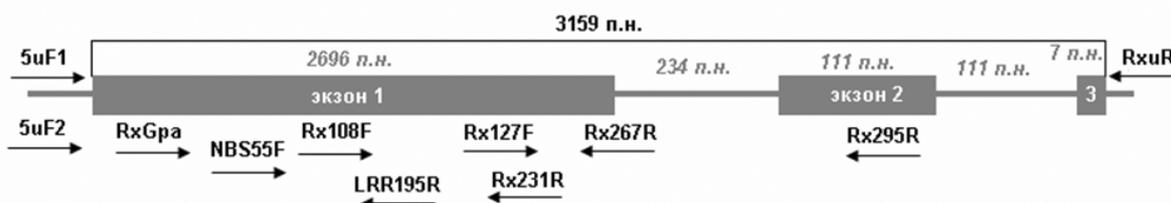


Рис. 7. Расположение праймеров, разработанных для амплификации и секвенирования генов-гомологов *Rx1*

При помощи разработанных праймеров были амплифицированы, клонированы и секвенированы 45 последовательностей генов-гомологов *Rx* 17 образцов 13 видов, относящихся к четырем сериям и двум надсериям секции *Petota Solanum* (рис. 7, табл. 6).

Экзон-интронная структура последовательностей генов-гомологов *Rx1* видов *Solanum* секции *Petota*. При исследовании *Rx1* локуса хромосомы XII *S. tuberosum* было показано наличие в нем девяти последовательностей со степенью сходства с *Rx1* 85 – 95%, так называемых RGH (**R**esistance **G**ene **H**omologues) (Bakker *et al.*, 2003). При этом только одна из девяти RGH является доказанным псевдогеном – RGH3 делетированным с 3' конца. Для остальных обнаруженных последовательностей нет данных о функциональном статусе, и считается, что их можно рассматривать как функциональные гены-кандидаты RGC (**R**esistance **G**ene **C**andidates), не имеющие протяженных делеций, сдвигов открытой рамки считывания (ОРС) и преждевременных терминаторных кодонов (Bakker *et al.*, 2003).

Так как одной из задач работы было изучение полиморфизма семейства *Rx* генов, интерес представляли как потенциально функциональные гены (гены-кандидаты (RGC/RGH)), так и последовательности псевдогенов. Проведенный сравнительный анализ показал, что все 45 клонированных последовательностей были гомологичны, но не идентичны известной последовательности гена *Rx1 S. tuberosum* (AJ011801), и состояли из трех экзонов и двух интронов.

Общая протяженность анализируемых последовательностей составила от 2643 до 3282 п.н. Интересно отметить, что наиболее вариабельными по длине оказались не интронные, а экзонные последовательности. Так, длина наиболее протяженного экзона I варьировала от 2338 до 2723 п.н., а экзона II от 3 до 210 п.н. Экзон III у всех изученных

последовательностей состоял из 7 п.н. При этом длины интронов варьировали от 156 до 236 п.н. у первого и от 87 до 113 п.н. у второго интрона (табл. 7).

Полиморфизм последовательностей генов-гомологов *Rx1* видов *Solanum* секции *Petota*.

Общий уровень нуклеотидного полиморфизма полученных последовательностей генов-гомологов *Rx1* в экзонных областях был достаточно высок и сравним с полиморфизмом интронов (табл. 7).

Таблица 7. Полиморфизм последовательностей экзонов и интронов клонированных последовательностей генов-гомологов *Rx1*

Участок гена	Протяженность, п.н.	Число переменных сайтов	%
экзон I	2338-2723	436	17,2
интрон I	156-236	44	22,5
экзон II	3-210	30	14,3
интрон II	87-113	25	25
экзон III	7	3	43

Длина последовательности экзона I варьировала от 2338 до 2723 п.н. Ряд инделей, выявленных в пределах экзона I изученных последовательностей, оказались образцеспецифичными. Так, например, у двух клонов образца *S. microdontum* была выявлена характерная только для них 12-нуклеотидная делеция в экзоне I. Интересно отметить, что все клонированные последовательности имеют вставку СТС в экзоне I, в то время как последовательность гена *Rx1* сорта Кара *S. tuberosum* (AJ011801) такой инсерции не имеет.

Длина последовательности интрона I варьировала от 156 до 236 п.н. из-за наличия инделей. Так, четыре клонированные последовательности *S. berthaultii* (CGN № 18030) имели делецию 22 п.н., а два клона *S. microdontum* делецию 80 п.н. в интроне I.

Последовательность экзона II изученных клонов оказалась наиболее переменной по длине 3–210 п.н., что было связано с наличием большого числа инделей. Последовательность интрона II была менее переменной по длине 87–113 п.н. Два клона образца *S. marinasense* имели две специфичные делеции 14 и 13 п.н. в интроне II.

Полиморфизм аминокислотных последовательностей *Rx1* видов *Solanum* секции *Petota*.

Полученные нуклеотидные последовательности генов-гомологов *Rx1* были транслированы и проанализированы.

Из всех изученных последовательностей 15 клонов образцов *S. acaule*, *S. megistacrolobum*, *S. leptophyes*, *S. berthaultii*, *S. brevicaulis*, *S. gourlayi* оказались гомологичны известной *Rx1* последовательности (транслированная AJ011801), протяженность которой составляет 937 а.о. (Bendahmane *et al.*, 1999). Основные различия аминокислотных последовательностей клонов от известной *Rx1* последовательности находились в районе «кислотного хвоста», который полностью соответствует второму экзону *Rx1* гена и значение которого в функционировании R-белка пока не установлено. Все перечисленные выше 15 последовательностей не содержали преждевременных стоп-кодонов, а также сдвигов ОРС.

По гомологии и наличию консервативных аминокислотных мотивов данные последовательности можно считать потенциально функциональными генами-гомологами, определяющими устойчивость к PVX.

Анализ последовательностей высоко консервативных аминокислотных мотивов в последовательностях СС и NBS-ARC доменов, необходимых для правильного функционирования Rx1 белка, показал наличие 15 аминокислотных замен, 10 из которых были радикальными (табл. 8, рис. 8). Кроме того, одна консервативная аминокислотная замена была выявлена в мотиве Киназы 2, который считается одним из наиболее консервативных.

Таблица 8. Аминокислотные замены в последовательностях консервативных мотивов СС и NBS-ARC доменов

№	Аминокислотная замена	Образец	Тип замен*
EDVID/EDMVD			
1	M/T	<i>S. leptophyes</i>	R
2	D/G	<i>S. leptophyes</i>	R
Р-петля (SIVGMGGIGKTTL)			
3	S/P	<i>S. gourlayi</i>	C
4	V/A	<i>S. tuberosum</i> Пушкинский,	R
	V/I	<i>S. microdontum</i>	C
Киназа 2 (RRYLVVIDDI)			
5	I/V	<i>S. berthaultii</i>	C
Киназа 3 (GSRILLTTR)			
6	I/T	<i>S. acaule</i>	R
7	G/S	<i>S. brevicaule</i>	C
GxP (GLPLAITVIAGLL)			
8	A/T	<i>S. leptophyes, S. brevicaule, S. berthaultii</i>	C
9	T/I	<i>S. brevicaule</i>	R
10	T/I	<i>S. marinasense</i>	R
11	V/A	<i>S. leptophyes,</i>	R
	V/L	<i>S. gourlayi</i>	C
RNBS-D (HLKPCFLYFAIFA)			
12	K/I	<i>S. leptophyes; S. brevicaule</i>	R
13	A/T	<i>S. leptophyes, S. brevicaule, S. gourlayi, S. berthaultii</i>	C
MHD (MHDVTRELCL)			
14	M/T	<i>S. berthaultii</i>	R
15	C/Y	<i>S. chacoense</i>	R

*C – консервативная аминокислотная замена, R – радикальная аминокислотная замена (Zhang, 2000).

Ранее было показано, что ряд аминокислотных замен в пределах данных мотивов может приводить к нарушению функции белка (Bendahmane *et al.*, 1999). Однако в изученных последовательностях подобных замен выявлено не было. При этом не было выявлено прямых ассоциаций идентифицированных аминокислотных замен с устойчивостью изученных образцов к X вирусу картофеля.

Таким образом, получены 15 последовательностей генов-гомологов *Rx1* видов *S. acaule, S. megistacrolobum, S. leptophyes, S. berthaultii, S. brevicaule, S. gourlayi*, которые имеют все консервативные мотивы, характерные для *Rx1* белка. Однако, помимо этих

потенциально функциональных генов, у ряда изученных последовательностей были выявлены делеции, затрагивающие области высококонсервативных мотивов, сдвиги рамки считывания и преждевременные стоп-кодоны, препятствующие образованию Rх1 белка. Подобные последовательности, по-видимому, представляют собой псевдогены.

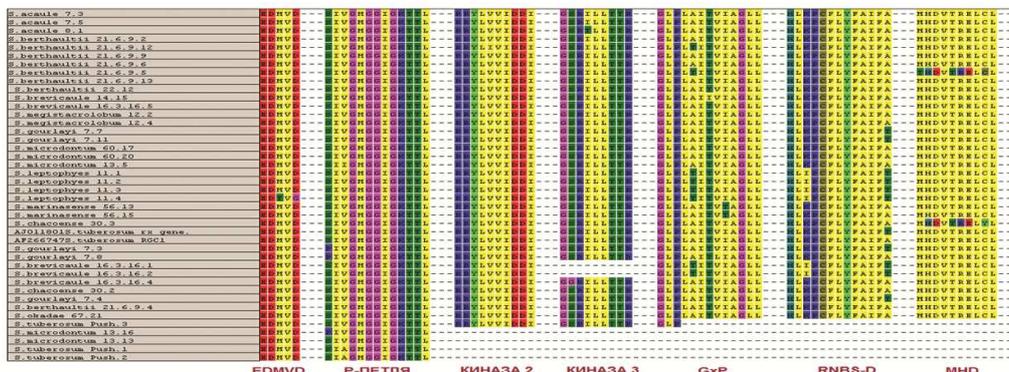


Рис. 8. Консервативные мотивы CC и NBS-ARC доменов клонированных последовательностей

Проведенный кластерный анализ транслированных последовательностей полученных генов-гомологов *Rх1* подтверждает их высокое сходство с известными последовательностями Rх1 и его гомологов из баз данных (рис. 9).

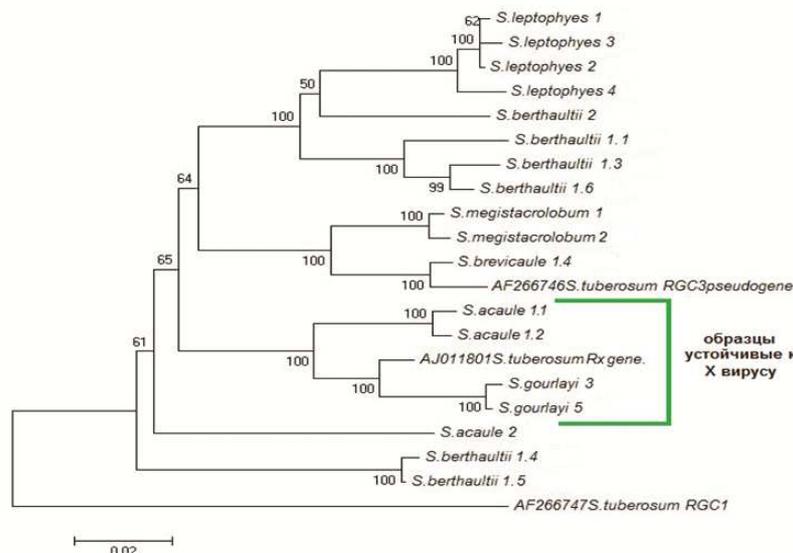


Рис. 9. Дендрограмма, построенная на основании анализа аминокислотных последовательностей Rх1 гомологов представителей *Solanum* секции *Petota* методом NJ (Neighbor Joining)

На дендрограмме отдельную группу образуют Rх1 последовательности образцов *S. gourlayi* и *S. acaule*, иммунных к X вирусу картофеля.

Анализ полиморфизма последовательностей NBS доменов генов-гомологов Rх1 методом EcoTILLING. EcoTILLING является точным, не требующим больших затрат и высокоэффективным методом анализа нуклеотидного полиморфизма фрагмента ДНК. Данный метод является менее затратным по сравнению с секвенированием и позволяет быстро проанализировать большое количество образцов (Comai *et al.*, 2004).

Метод EcoTILLING был впервые применен нами для изучения полиморфизма NBS домена гена *Rx1* и его гомологов у 96 образцов 41 вида *Solanum* и 18 отечественных и зарубежных сортов картофеля *S. tuberosum*.

Были разработаны две пары специфических EcoTILLING праймеров, позволяющих амплифицировать NBS домен гена *Rx1* и его гомологов, включающий последовательности, кодирующие высококонсервативные мотивы Р-петли и Киназы 2, у всех использованных для анализа образцов.

Анализ полученных данных позволил выявить у 96 образцов картофеля 61 вариабельный сайт в пределах изученного фрагмента. Как и ожидалось, межвидовой полиморфизм среди дикорастущих представителей секции *Petota* превышал внутривидовой среди сортов *S. tuberosum*. При этом у ряда изученных образцов были выявлены видоспецифичные SNP-спектры (рис. 10).

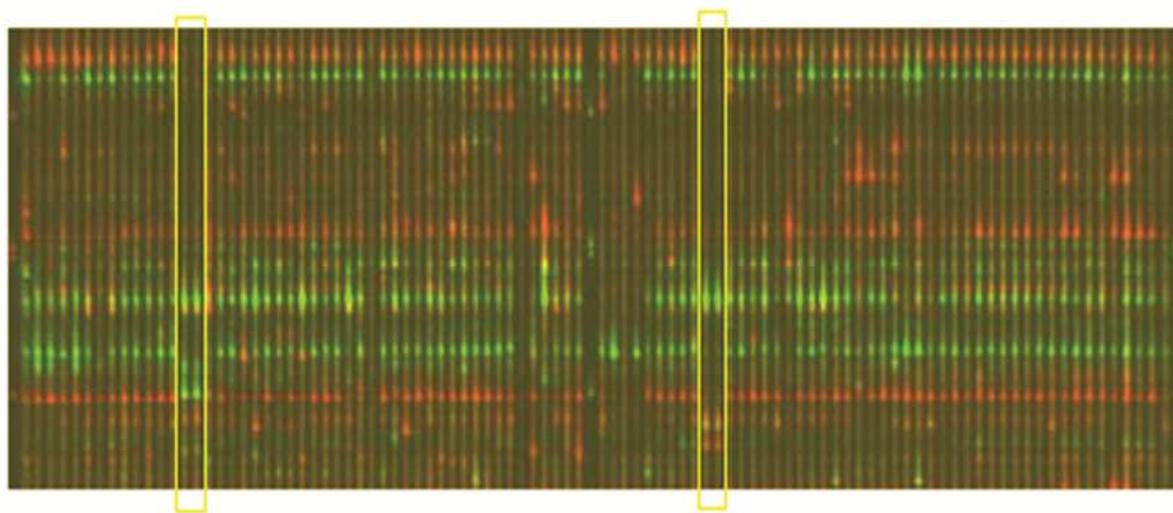


Рис. 10. Результаты EcoTILLING NBS домена гена *Rx1* 96 образцов *Solanum*. Выделены специфичные SNP-спектры видов *S. bulbocastanum* и *S. polyadenium* (надсерия *Stellata*)

Проведенный по результатам EcoTILLING NBS домена генов-гомологов *Rx1* двухфакторный PCA (Principal component analysis) (рис. 11) позволил выявить три основные группы образцов, что согласуется с данными проведенного кластерного анализа. Так, большинство исследованных сортов *S. tuberosum* образует группу I. К данной группе относятся и несколько дикорастущих видов, таких как *S. acaule* (6), *S. etuberosum* (27) и *S. limbanense* (41). При этом образцы, формирующие на дендрограмме второй кластер, по данным PCA являются наиболее отдаленными от остальных исследованных образцов. Третью группу образуют дикорастущие виды *Solanum*.

PCA позволил выявить ряд образцов (*S. chacoense* (22), *S. oploense* (53), *S. microdontum* (45), *S. neorossii* (49) и *S. acaule* (7)), которые не относятся к описанным группам, а занимают промежуточное положение и также как образцы из группы 2 могут быть потенциальными донорами новых аллелей гена.

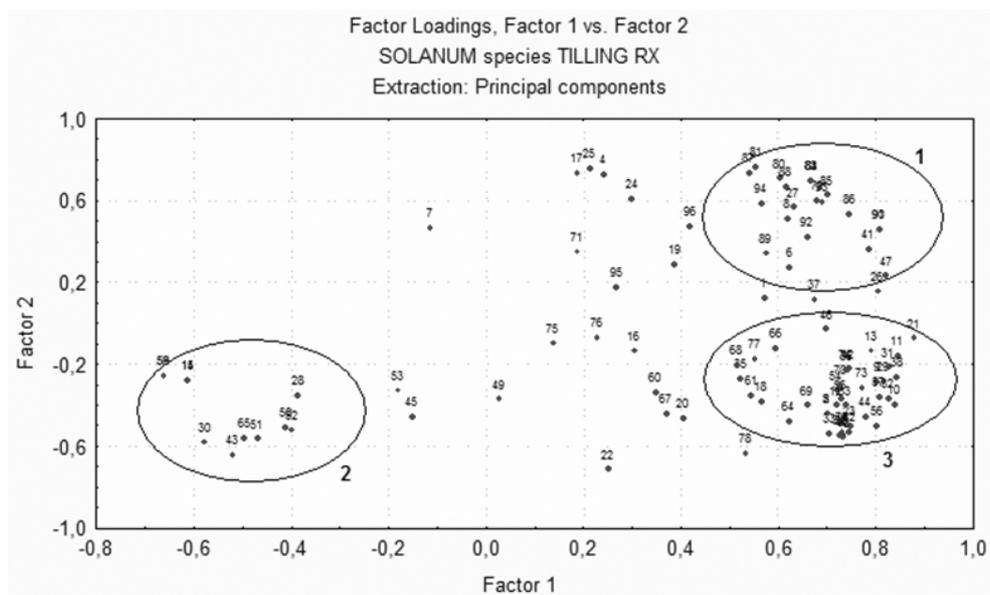


Рис. 11. PCO анализ результатов EcoTILLING образцов *Solanum*

ВЫВОДЫ

1. Определены и охарактеризованы полные кодирующие последовательности 13 генов-гомологов *Sus4* у дикорастущих видов картофеля 11 таксономических серий, подсекций *Potatoe* и *Estolonifera* секции *Petota* рода *Solanum*. Уровень межвидового полиморфизма последовательностей данных генов составил 15,3%. В кодирующих последовательностях были выявлены 240 SNPs, которые приводили к 63 аминокислотным заменам, в том числе 36 радикальным.
2. Установлено, что внутривидовой полиморфизм гена *Sus4* картофеля (*S. tuberosum*) у 24 сортов отечественной и зарубежной селекции составил 10,5%; выявлены сортоспецифичные точковые замены и индели. По наличию инделей в интронах гена *Sus4* выделены четыре группы сортов. Не было выявлено корреляции детектированных замен с содержанием крахмала в клубнях и сроками созревания сортов картофеля.
3. Определены последовательности, кодирующие участки сахарозосинтазного и глюкозилтрансферазного доменов генов сахарозосинтазы у 30 представителей семейства Solanaceae. На основе данных о полиморфизме полученных последовательностей гена сахарозосинтазы предложена схема его возможной эволюции у представителей *Solanum*. Показана возможность использования генов сахарозосинтазы для филогенетических исследований у Solanaceae.
4. Определены и охарактеризованы последовательности 15 генов-гомологов *Rx1*, определяющего устойчивость к X вирусу у шести дикорастущих видов картофеля *S. acaule*, *S. megistacrolobum*, *S. leptophyes*, *S. berthaultii*, *S. brevicaule*, *S. gourlayi*. В последовательностях основных доменов (CC, NBS-ARC) гомологов *Rx1* выявлено 15 аминокислотных замен, в том числе 10 радикальных.

5. При помощи метода EcoTILLING впервые проведен анализ внутри- и межвидового полиморфизма консервативного NBS домена гена *Rx1* и его гомологов у 78 образцов 41 вида *Solanum* секции *Petota* и 18 сортов *S. tuberosum*, выявлен 61 полиморфный сайт, включающий ряд видо- и образецспецифичных SNPs.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи из перечня рецензируемых научных журналов:

1. **Борис, К.В.** Изучение полиморфизма гена сахарозосинтазы *Sus2* у культурных и дикорастущих видов томата / К.В. Борис, Н.Н. Рыжова, К.Г. Скрыбин // Доклады академии наук. – 2010. – Т.433. – №5. – С.703 – 706.
2. **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. – №2. – С.190 – 198.
3. **Борис, К.В.** Вариабельность последовательностей кодирующих NBS-ARC домен у гомологов *Rx1* из различных видов картофеля / К.В. Борис, Н.Н. Рыжова, Е.З. Кочиева // Молекулярная биология. – 2012. – Т.46. – №1. – С.118 – 121.
4. **Борис, К.В.** NBS-LRR гены устойчивости к X вирусу картофеля / К.В. Борис, Е.З. Кочиева // Успехи современной биологии. – 2013. – Т.133. – №2. – С.120 – 128.

Тезисы докладов:

5. **Boris, K.V.** *Rx* gene homologues in *Solanum* sect. *Petota* species / K.V. Boris, E.Z. Kochieva // 16th Evolutionary Biology Meeting. Марсель. – 2012. – С. 161.
6. **Boris, K.V.** EcoTILLING for the identification of SNPs in the NBS domain of *Rx1* gene in *Solanum* sect. *Petota* species / K.V. Boris, E.Z. Kochieva // MolPhy3. Москва. – 2012. – С. 100.
7. **Boris, K.** *Sus2* homologues in *Solanum lycopersicum* varieties and related wild species / K. Boris, N. Ryzhova, E. Kochieva // 9th Plant Genomics European Meeting. Стамбул. – 2011. – С. 28.
8. **Boris, K.** NB-ARC domain variability in *Rx* homologues in *Solanum* species / K. Boris, N. Ryzhova, R. Hoekstra, E. Kochieva // 9th Plant Genomics European Meeting. Стамбул. – 2011. – С. 29.
9. **Борис, К.В.** *Rx* гены видов *Solanum*: полиморфизм CC-NBS-ARC доменов / К.В. Борис // 2-я Международная школа-конференция молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях». Звенигород. – 2011. – С. 24.
10. **Boris, K.** Identification and characterization of variability in *Sus4* homologues in *Solanum tuberosum* varieties / K. Boris, N. Ryzhova, E. Davletshina, E. Kochieva // 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. Болонья – 2010.