

На правах рукописи

Гурина Алёна Алексеевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

научно-квалификационной работы (диссертации)

Полиморфизм *R* генов у примитивных культурных видов секции *Petota*
Dumort. рода *Solanum* L.

Направление 03.02.07. Генетика

Направленность (профиль) 06.06.01. Биологические науки

Санкт-Петербург, 2023 г.

Работа выполнена в: отделе генетических ресурсов картофеля
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Заведующий отделом:

Рогозина Елена Вячеславовна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
отдела генетических ресурсов картофеля ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский
институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)»

(подпись)

Научный руководитель:

Рогозина Елена Вячеславовна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
отдела генетических ресурсов картофеля ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский
институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)»

(подпись)

Рецензенты:

Пороховинова Елизавета Александровна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетических
ресурсов масличных и прядильных культур ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский
институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)»

(подпись)

Антонова Ольга Юрьевна,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
отдела биотехнологии ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)»

(подпись)

Оглавление

Глава 1. Введение.....	5
1.1. Актуальность исследований.....	5
1.2 Современное состояние проблемы.....	7
1.3. Цель и задачи работы.....	8
1.4 Научная новизна.....	9
1.5 Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
1.6. Положения выносимые на защиту.....	11
1.7. Апробация результатов работы.....	11
Глава 2. Материалы исследования.....	13
Глава 3. Методы исследования.....	14
3.1. Комплексная оценка образцов ПКВ картофеля из клоновой коллекции ВИР.....	14
3.1.1. Оценка устойчивости к фитофторозу.....	14
3.1.2. Оценка устойчивости ПКВ картофеля к золотистой картофельной нематодe (ЗКН).....	15
3.1.3. Молекулярно-генетический анализ.....	15
3.2 <i>In silico</i> поиск и анализ полиморфизма <i>R</i> генов у образцов ПКВ картофеля.....	16
3.2.1. Поиск гомологов <i>R</i> генов в сырых данных полногеномного секвенирования (SRA).....	16
3.2.2. Поиск гомологов <i>R</i> генов в полногеномных сборках ПКВ картофеля.....	17
3.2.3. Анализ полиморфизма гомологов <i>R</i> генов у ПКВ картофеля.....	17
Глава 4. Результаты и обсуждение.....	19
4.1. Вариабельность фенотипических характеристик ПКВ картофеля.....	19
4.1.1. Полиморфизм ПКВ картофеля по морфологическим признакам.....	19
4.1.2. Полиморфизм ПКВ картофеля по устойчивости к заболеваниям.....	20
4.2. <i>In silico</i> анализ полиморфизма <i>R</i> генов у ПКВ картофеля.....	21

4.3. Полиморфизм <i>R</i> генов у образцов ПКВ картофеля в коллекции ВИР.....	27
4.3.1. Полиморфизм последовательности гена <i>RB/Rpi-blb1</i> у примитивных культурных видов картофеля.....	28
4.3.2. Полиморфизм последовательности гена <i>Rpi-vnt1.3</i> у примитивных культурных видов картофеля.....	31
4.3.3. Полиморфизм последовательности гена <i>Gro1-4</i> у примитивных культурных видов картофеля.....	34
4.4. Гибридологический анализ и создание CAPS маркера гена <i>Rpi-vnt1.3</i> для популяции <i>S. stenotomum</i>	35
Глава 5. Заключение.....	38
Выводы.....	38
Дальнейшие перспективы и планы исследования.....	40
Список опубликованных работ.....	40
Список Литературы.....	42

Глава 1. Введение

1.1. Актуальность исследований

Картофелеводство относится к числу ведущих отраслей мирового и российского агропроизводства. По данным FAO мировое производство картофеля в 2020 году составило более 350 млн тонн, и Российская Федерация — одна из стран, занимающих ведущее место в мире по производству данной культуры [1]. По данным S.Savary картофель занимает пятое место среди всех сельскохозяйственных культур по доле потерянному урожаю, которая в среднем ежегодно составляет около 17% [2]. Основной причиной потери урожая являются различные патогены. Вспышка некоторых заболеваний локально способна уничтожить вплоть до 100% урожая, что может нанести значительный урон экономике и продовольственной безопасности отдельных регионов (Ирландский голод 1845–1849 был вызван вспышкой возбудителя фитофтороза) [3]. Это характерно для таких заболеваний, как фитофтороз, цистообразующая нематода, бактериальное увядание, рак картофеля, вирусные заболевания картофеля. Основным фактором, обеспечивающим устойчивое и стабильное функционирование производства картофеля, являются высокоурожайные, устойчивые к болезням и вредителям сорта, качество продукции которых соответствует требованиям потребителей. Для создания таких сортов часто требуется вливание генов устойчивости (*Resistance genes* или *R* гены), источником которых, как правило, являются дикие виды, но между ними и культурным картофелем существует генетический барьер, который препятствует скрещиванию. Дикие виды содержат большое количество нежелательных для культурного картофеля признаков (например содержание соланина в клубнях), от которых в последствии приходится избавляться большим числом возвратных скрещиваний, в результате которых может произойти и исчезновение признака устойчивости. Под влиянием всех этих причин процесс интрогрессии генов из диких видов очень длителен и требует

значительных ресурсов, например перенос гена *Rpi-blb2* от *S. bulbocastanum* Dunal в сорта Бионика и Толюко занял более 45 лет [4].

Примитивные культурные виды (ПКВ) картофеля, в том числе *S. phureja* Juz. & Bukasov, *S. stenotomum* Juz. & Bukasov, *S. goniocalyx* Juz. & Bukasov и *S. ajanhuiri* Juz. & Bukasov, являющиеся объектом данного исследования, относятся к первичному генофонду, представители которого легко скрещиваются с *S. tuberosum* L. [5]. Многие исследователи отмечали среди ПКВ картофеля генотипы устойчивые к различным заболеваниям [6–8]. Но в отличие от некоторых диких видов, устойчивость не является преобладающей характеристикой всех образцов этой группы. Тем не менее облегчение процесса переноса гена, а также отсутствие многих нежелательных признаков, сопутствующих интрогрессии из диких видов картофеля, безусловно, делают отдельных представителей ПКВ картофеля перспективными для использования в селекции.

Некоторые виды ПКВ картофеля являются прекрасным объектом для генетических исследований, поскольку, во-первых, являются диплоидами, в отличие от тетраплоидного *S. tuberosum*. Во-вторых, устойчиво производят довольно большое количество клубней, позволяющее в течение времени изучения поддерживать нужные генотипы, что отличает их от многих диких видов, поддержание конкретных генотипов затруднено, в связи с нестабильностью производства и хранения клубней. Есть и сложности, препятствующие проведению многих исследований, особенно в классической генетике. В частности, у большинства образцов ПКВ картофеля есть механизмы, блокирующие самоопыление, в результате действия которых, производство чистых линий или получение F₂ гибридных популяций становится практически невозможным.

1.2 Современное состояние проблемы

Удвоенный моноплоид *S. phureja* DM1-3 был секвенирован в 2011 году [9]

и долгое время являлся единственной полной сборкой генома картофеля, считаясь референсным. В нем был произведён поиск NBS-LRR генов — семейства, к которому относятся многие из известных *R* генов [10,11]. Было произведено сравнение найденных NBS-LRR генов с известными генами, но исследование и обсуждение вопросов различий в сходстве последовательностей, неравномерности замен и возможной функциональности не проводилось. Liu Z в 2020 году производил поиск гомологов генов устойчивости картофеля в новосинтезированном геноме *S. gonioscalyx* [12]. В обеих работах использовались лишь единичные образцы не позволяющие произвести оценку полиморфизма генов у ПКВ картофеля. К настоящему моменту секвенированы и частично собраны множество геномов, как диких, так и культурных видов картофеля, но пока их анализ находится на уровне поиска наиболее общих закономерностей, и поиск и анализ полиморфизма конкретных генов, по сведениям автора, пока не проведён [13–16].

Li Y. [17] и Tang D. [16] рассматривали вопросы эволюции и систематики картофеля, а также процессов, связанных с одомашниванием этой культуры, в том числе в обоих исследованиях есть разделы посвященные *R* генам. Оба автора говорят о более высокой степени изменчивости NBS-LRR генов, по сравнению с другими генами, при сравнении диких и культурных видов, в обеих работах говорится о снижении разнообразия *R* генов у культурных видов по сравнению с дикими, что вероятно связано с более высоким систематическим разнообразием диких видов по сравнению с культурными. Тем не менее обе работы [16,17] посвящены поиску более глобальных закономерностей и вопросы гомологии, эволюционных особенностей и полиморфизма отдельных *R* генов в них не рассмотрен.

Среди образцов ПКВ картофеля проводился поиск отдельных генов и локусов, связанных с устойчивостью. У *S. phureja* был выявлен ген устойчивости к фитофторозу *Rpi-phu1* [18], он не клонирован, но его

расположение в геноме и связь со сцепленными маркерами позволили предположить S.Foster и M.Pel, что он гомологичен гену *Rpi-vnt1*, хотя в своих исследованиях они не нашли функционального варианта этого гена у ПКВ картофеля [19,20]. Также у различных образцов ПКВ картофеля и межвидовых гибридов *S. stenotomum* × *S. phureja* известны многочисленные QTL [21,22], и их анализ привёл к распознаванию у группы Phureja (*S. tuberosum* Group Phureja) таких генов, ассоциированных с устойчивостью к фитофторозу, как StTL15A и StGP28 [23]. Есть несколько генов устойчивости к вирусным заболеваниям: Nx_{phu} , X_{1ps} и X_{2ps} — к вирусу X и $Ry(o)phu$ к вирусу Y [24–26]. Но в целом группа изучена довольно слабо, даже у известных генов и QTL, не известны их частоты в популяциях, последовательности генов или аллельные вариации. За исключением работ по изучению полных геномов и работ, полностью посвященных различным методам молекулярной систематики, данное исследование одно из первых, изучающих генетический полиморфизм этой группы.

1.3. Цель и задачи работы

Целью данного исследования стал поиск и характеристика гомологов *R* генов у примитивных культурных видов картофеля.

Задачи работы

- Оценка полиморфизма примитивных культурных видов по фенотипическим характеристикам в клоновой коллекции ВИР.
- Выявление устойчивых к фитофторозу и золотистой картофельной нематод (ЗКН) образцов ПКВ картофеля- потенциальных источников *R* генов.
- Поиск гомологов *R* генов в полногеномных данных опубликованных в NCBI и оценка вариабельности последовательностей обнаруженных гомологов.
- Оценка ПКВ картофеля из коллекции ВИР по наличию SCAR маркеров генов устойчивости к фитофторозу и ЗКН и полиморфизма

последовательностей маркерных фрагментов генов *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-vnt1.3* и *Gro1-4*.

1.4 Научная новизна

Впервые произведена комплексная оценка ПКВ картофеля из клоновой коллекции ВИР по морфологическим, фитопатологическим и молекулярно-генетическим признакам. Показано наличие гомологов кодирующих последовательностей *R* генов, в частности гомологи генов *Ve1*, *Ve2*, *R3b*, *Rpi-ber1*, *Gro1-4*, *Gpa2*, *Rx* у ПКВ картофеля впервые обнаружены при помощи *in silico* анализа. Впервые охарактеризован полиморфизм последовательностей *R* генов у ПКВ картофеля. Показана связь одного из аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1.3* с устойчивостью к фитофторозу у *S. stenotomum* к-11020.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы

Выявлены образцы клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР устойчивые к фитофторозу (*S. ajanhuiri* — 2 генотипа, *S. goniocalyx* — 1 генотип, *S. phureja* — 7 генотипов, *S. stenotomum* — 4 генотипа), к ЗКН (*S. goniocalyx* — 1 генотип и *S. phureja* - 7 генотипов).

Выявлена потенциальная перспективность использования примитивных культурных видов в качестве источников гена *Ve1* — устойчивость к вертициллезному увяданию.

Для ПКВ картофеля показаны отличия в характере полиморфизма гомологов *R* генов, секвенированных из филогенетически различно удалённых от культурного картофеля источников. Так, в генах из североамериканских диких видов большая доля замен характерна для всех образцов группы ПКВ, в то время как отличия между образцами ПКВ картофеля не столь значительны, как в генах источниками которых являются образцы культурного картофеля.

Для ПКВ картофеля подтверждена неравномерная скорость аминокислотных замен в разных доменах NBS-LRR генов. В LRR домене

замены происходят существенно чаще, по сравнению с NBS доменом. Доля замен в СС домене значительно варьирует при сравнении разных генов.

Ввиду непропорционально большого числа замен в стартовой области гена *Rpi-vnt1.3*, литературных данных о гомологах этого гена у других видов, большей схожести с консенсусной последовательностью Козака для двудольных и ряда других факторов, сделано предположение о другой локализации старт-кодона этого гена у ПКВ картофеля, по сравнению с референсной последовательностью *Rpi-vnt1.3*.

В коллекции ВИР выявлено несколько аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1.3* и показано, что устойчивость у *S. stenotomum* к-11020 связана с конкретным аллельным вариантом этого гена.

Разработаны CAPS маркеры для скрининга потомства *S. stenotomum* к-11020 на предмет наличия аллельного варианта *Rpi-vnt1.3*, ассоциированного с устойчивостью.

1.6. Положения выносимые на защиту

- Клоновая коллекция ПКВ картофеля ВИР характеризуется фенотипическим разнообразием (по морфологическим и иммунологическим признакам), а также высоким уровнем скрытого разнообразия, проявляющегося в генеративном потомстве.
- Среди примитивных культурных видов выделены образцы – источники устойчивости к фитофторозу и золотистой картофельной нематодой.
- У ПКВ картофеля обнаружены гомологи белок-кодирующих последовательностей исследованных *R* генов.
- Характер полиморфизма *R* генов у ПКВ картофеля зависит от филогенетической удалённости вида-источника референсного гена от культурного картофеля.
- У ПКВ картофеля из коллекции ВИР выявлены различные аллельные варианты гена *Rpi-vnt1.3*, один из которых предположительно связан с

устойчивостью у образца *S. stenotomum* к-11020.

1.7. Апробация результатов работы

Результаты исследований были представлены на V Вавиловской международной конференции; Международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России»; 6-й Международной Научной Конференции «Генетика , Геномика, Биоинформатика И Биотехнология Растений» PlantGen 2021, Международной научно-практической конференции «Состояние, проблемы и перспективы развития отраслей картофелеводства, плодовоовощеводства и бахчеводства»

Результаты исследования опубликованы в трёх статьях в журналах рекомендованных ВАК (см раздел 5.3).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ и РНФ:

- №20-516-10001 КО_а. Изучение генов устойчивости картофеля к фитофторозу и их роли в формировании разнообразия эффекторов у патогена.
- №22-26-00111 Гены устойчивости картофеля к фитофторозу в контексте эволюции культурных и диких клубненосных видов *Solanum* L.

Работа состоит из глав: введение, материалы, методы, результаты с четырьмя подглавами, заключение, список опубликованных работ, список литературы. Содержит четыре таблицы и пять иллюстраций.

Глава 2. Материалы исследования

Материалами послужили образцы ПКВ картофеля из коллекции ВИР, а также данные опубликованные в NCBI из проектов [PRJNA394943](#) [17] и PRJNA754534 [16] (Таблица 1).

Таблица 1. Количество образцов ПКВ картофеля, представленных на разных этапах исследования.

	Число образцов (число генотипов)			
Название вида	Ботаническое описание и полевая оценка устойчивости к фитофторозу	Лабораторная оценка устойчивости к фитофторозу и ЗКН	Молекулярно-генетический анализ	in silico анализ R-генов (SRA/сборки геномов)
<i>S. ajanhuiri</i>	3 (4)	2 (3)	2 (3)	0
<i>S. goniocalyx</i>	10 (12)	7 (8)	8 (9)	4 / 1
<i>S. stenotomum</i>	25 (27)	21 (23)	25 (28)	8 / 2
<i>S. phureja</i>	40 (41)	30 (30)	35 (35)	9 / 3
Всего	78 (84)	60 (64)	70 (75)	21 / 6

Для гибридологического анализа было проведено скрещивание 13 комбинаций внутри и межвидовых скрещиваний, из них 9 результативных. В дальнейшем использовались 2 популяции от скрещивания и одна полученная от контролируемого самоопыления. У образцов, контрастных по устойчивости, было произведено выборочное секвенирование SCAR-маркеров генов *Rpi-vnt1.3*, *RB/Rpi-blb1* и *Gro1-4*.

Для *in silico* анализа в качестве материала использована последовательность референсного генома картофеля DM1-3 v4.3 [9], сырые данные полногеномного секвенирования (SRA), полученные в проекте PRJNA394943 [17], а также сборки геномов из проекта PRJCA006011 [16].

Глава 3. Методы исследования

3.1. Комплексная оценка образцов ПКВ картофеля из клоновой коллекции ВИР

В 2019–2020 году произведены ботанические описания образцов клоновой

коллекции по ряду дескрипторов, сформированных на основе литературных данных об изменчивости и видовых характеристиках ПКВ картофеля [8,27–31]. Дескрипторы надземной вегетативной и генеративной частей растений описаны в фазе G1 (первый генеративный период развития), клубни описывались при сборе урожая, который производился после отмирания ботвы.

В 2020–2022 проведены фенологические наблюдения и учет поражаемости различными заболеваниями на естественном инфекционном фоне [29].

Статистическая обработка полученных результатов и визуализация производилась с использованием языков программирования Python 3.7 и R 4.3.0

3.1.1. Оценка устойчивости к фитофторозу

Полевая оценка клоновой коллекции ПКВ картофеля на устойчивость к фитофторозу (возбудитель *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) проводилась в течение трёх лет в динамике по девятибалльной шкале, от момента поражения восприимчивого стандарта (сорт Early Rose) до естественного отмирания ботвы (2020-2022гг) [29].

Лабораторный скрининг образцов картофеля на устойчивость к фитофторозу проводили по стандартной методике [32] совместно с сотрудниками лаборатории Иммуитета растений к болезням во Всероссийском Институте Защиты Растений (ВИЗР). Для заражения использовался инокулюм на основе изолята MP1841, полученного из Института Селекции и Акклиматизации Растений, Млохов, Польша (IHAR-Mlochow). Изолят содержит все 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11 гены вирулентности. Условия заражения были аналогичны методике А.В. Хютти [33]. Степень поражения оценивалась на шестые сутки после заражения по девятибалльной шкале [34], где 9 — отсутствие поражения, а 1 — гибель растения.

3.1.2. Оценка устойчивости ПКВ картофеля к золотистой картофельной нематодe (ЗКН)

Оценка на устойчивость к ЗКН (возбудитель *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens) производилась в лабораторных условиях, совместно с сотрудниками лаборатории Иммуитета растений к болезням в ВИЗР. Каждый образец исследовался в трехкратной повторности. К каждому образцу вносили суспензию инокулюма ЗКН в концентрации 3500 яиц и личинок на 100 см³ почвы из размноженной популяции, собранной в Ленинградской области и типированной до патотипа Ro1 [35]. Выращивание произведено в контролируемых условиях при температуре 22°C. За восприимчивый стандарт был принят сорт Невский, за устойчивый - Red Scarlett. Оценку результатов заражения проводили через три месяца по числу образовавшихся цист на видимых участках корней на коме почвы [36].

3.1.3. Молекулярно-генетический анализ

ДНК выделяли из молодых листьев с использованием модифицированной методики СТАБ. Скрининг проводился на наличие SCAR-маркеров генов устойчивости к фитофторозу (*RB/blb1*, *Rpi-blb2*, *R2-like* и *Rpi-vnt1.3*) и золотистой картофельной нематодe (*H1*, *Gro1-4*). ПЦР проводили с использованием Taq-полимеразы («Диалат», Москва). Использовались маркеры и условия, представленные в оригинальных статьях, а также разработанные и модифицированные автором. Визуализацию производили в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, и документировали в системе BioDocII (Biometra GmbH, Германия).

Для секвенирования ПЦР-амплификаты очищали с использованием набора CleanUp Standart, производили лигирование в pAL-TA вектор (по протоколу, предлагаемому фирмой-распространителем Eurogen), а после трансформировали штамм DH5α *E. coli* [37]. Секвенирование производилось с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ на приборе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

На основании секвенированных последовательностей маркерных фрагментов Rpi-vnt1.3-612 и Vnt-tail-897 были определены рестриктазы, сайты рестрикции которых отличались у разных образцов (в первую очередь мы смотрели на родительские формы, но другие образцы также учитывались). После проведения ПЦР составляли реакционную смесь из воды, буфера для рестриктазы, рестриктазы и продуктов амплификации в соотношении, рекомендованном производителем (все использованные рестриктазы произведены в фирме SibEnzim), смесь в течение 16 часов выдерживалась при температуре рекомендованной, производителем. Результаты визуализировали в 3-процентном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, и документировали в системе BioDocII (Biometra GmbH, Германия).

3.2 *In silico* поиск и анализ полиморфизма R генов у образцов ПКВ картофеля

3.2.1. Поиск гомологов R генов в сырых данных полногеномного секвенирования (SRA)

После оценки качества секвенирования (FASTQC v0.11.9) [38] и фильтрации (удаление ПЦР-дубликатов, прочтений с более чем 20% нуклеотидов с Phred качеством < 5 или более 10% нераспознанных нуклеотидов) (Trimmomatic 0.39) [39] низкокачественных прочтений производилось выравнивание прочтений каждого образца на референсные R гены с использованием локального множественного выравнивания программы bowtie2 v.2.3.5.1 [40]. Результаты выравнивания обрабатывались при помощи программ samtools 1.10 и bedtools 2.30.0, они же использовались для оценки достаточности и однородности покрытия генов [41]. Поиск вариантов осуществлялся VarScan 2.4.4. с минимальным покрытием 5 [42].

3.2.2. Поиск гомологов R генов в полногеномных сборках ПКВ картофеля

Также была произведена проверка наличия последовательностей генов в нескольких сборках геномов ПКВ картофеля из проекта PRJCA006011 [16] и референсного генома картофеля DM1-3 516 R44 (далее DM1-3) [9] при

помощи local blast 2.5.0+ алгоритма [43]. При этом отбирались последовательности, покрывающие не менее 80% референса (референсом выступали полные последовательности *R* генов или отдельные участки последовательности гена — UTR, экзоны, интроны) и сходством не менее 80%. В дальнейшем из референса по координатам, полученным с помощью local blast, были отобраны последовательности длиной, соответствующие полным последовательностям референсных генов. Далее при помощи локального выравнивания ClustalW отбирались последовательности с полностью представленной кодирующей областью гена.

Для всех генов, кроме *Gro1-4*, удалось получить выравнивание полной последовательности гена. В последовательности *Gro1-4* представлен крупный (более 5 тысяч п.н.) интрон, сильные отличия в котором препятствуют проведению локального выравнивания, и исследование производилось по двум участкам: экзон1 и экзоны 2–5. (см раздел 4.3.3.).

3.2.3. Анализ полиморфизма гомологов *R* генов у ПКВ картофеля

Локальное выравнивание для каждого гена выполнено с использованием алгоритма ClustalW в программе MegaX [44]. Исследованы замены, инсерции и делеции, а также их возможное влияние на аминокислотную последовательность. Для вычисления доменной организации и ключевых позиций в аминокислотных последовательностях *R* генов использован InterPro [45]. В сборках для многих генов были обнаружены многочисленные копии и исследовалась каждая копия, но в дальнейшем анализе были использованы только наиболее схожие из тех, что производили полноценную аминокислотную последовательность.

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1. Вариабельность фенотипических характеристик ПКВ картофеля

4.1.1. Полиморфизм ПКВ картофеля по морфологическим признакам

Было проведено полное ботаническое описание 78 образцов (84 генотипа) четырёх видов ПКВ картофеля: *S. ajanhuiri*, *S. goniocalyx*, *S. stenotomum*, *S. phureja* из клоновой коллекции картофеля ВИР. Для дальнейшего фитопатологического и молекулярно-генетического анализа были выбраны образцы, наиболее соответствующие видовым характеристикам, без явных признаков вирусного поражения и устойчиво (в течение нескольких лет) образующие достаточное для анализа количество клубней.

По большинству признаков среди ПКВ картофеля наблюдалось значительное варьирование, связанное и высокой полиморфностью этих видов (таблица 2). Ряд параметров варьировал не только между генотипами, но и различался в разные годы исследования в пределах одного генотипа. В частности, такие параметры, как интенсивность и локализация окраски антоциана, степень опушенности, диаметр стебля и характер крыльев (прямые или волнистые, узкие или широкие, жесткие или мягкие) могли отличаться в разные годы исследований кардинальным образом.

В целом пределы варьирования многих показателей оказались чрезвычайно широкими (таблица 2), а полиморфизм в коллекции чрезвычайно высок, что привело к невозможности проведения ординации: для описания 80 и более процентов изменчивости, даже в пределах одного вида (кроме *S. ajanhuiri*) требуется более 15 осей, а при анализе всех видов в комплексе ведущими оказываются признаки разделяющие виды, что дополнительно демонстрирует всю многогранность варьирования ПКВ картофеля.

Таблица 2. Характеристики количественных признаков образцов разных видов ПКВ картофеля в клоновой коллекции ВИР.

Признак	<i>S. phureja</i>	<i>S. stenotomum</i>	<i>S. gonicalyx</i>	<i>S. ajanhuiri</i>
Количество генотипов (шт)	41	27	12	4
Высота растения (см)	40,22±7,87	42,59±8,7	40,83±10,19	40±10,8
Длина листа (см)	13,06±3,22	13,18±3,41	12,5±3,1	16,71±3,45
Ширина листа (см)	7,07±1,42	7,53±1,7	7,18±2,23	8,04±0,95
Диаметр чашечки (см)	1,35±0,25	1,36±0,28	1,45±0,32	1,61±0,46
Длина лепестков (см)	1,24±0,28	1,2±0,24	1,18±0,18	1,38±0,25
Количество клубней на одно растение (шт)	22,9±17,5	18,5±8,2	22,9±12,4	14,9±8,1
Вес клубней на одно растение (гр)	281,3±156,3	254,3±119,6	253±197,3	255,6±177,8

4.1.2. Полиморфизм ПКВ картофеля по устойчивости к заболеваниям

В 2020–2022 годах проведена полевая оценка клоновой коллекции картофеля на устойчивость к фитофторозу в условиях естественного инфекционного фона. Ежегодно выделяли быстро поражаемые и не поражаемые генотипы. Но в связи со значительными различиями условий разных лет оценки показатели значительно варьировали. В частности, в 2022 году были благоприятные условия для развития альтернариоза, и многие образцы, которые в другие годы были отмечены как устойчивые, оказались сильно поражены в результате совместного течения инфекций. К тому же на поздних стадиях симптомы поражения этими заболеваниями чрезвычайно похожи и невозможно отследить какая именно инфекция привела к отмиранию ботвы, что приводит к искажению результатов.

Была проведена лабораторная оценка устойчивости к фитофторозу 60 образцов (64 генотипов). Среди всех исследованных видов выделены устойчивые/среднеустойчивые генотипы. Один из образцов *S. gonicalyx* был среднеустойчивым, остальные восприимчивые. В образцах остальных трёх исследованных видов были выявлены все варианты фенотипов по устойчивости к фитофторозу. Всего было выделено 14 образцов, обладающих разной степенью устойчивости. Что соответствует данным о

встречаемости устойчивых форм среди ПКВ картофеля [6,46].

В рамках заражения ЗКН изучено 60 образцов (64 генотипа). 46 генотипов оказались восприимчивыми, и число цист, сформированных после заражения, было сравнимо или немного меньше по сравнению с восприимчивым контролем (сорт Невский). Растения десяти генотипов (трёх видов) во всех повторностях погибли менее чем через месяц после заражения, что свидетельствует об их гипертосприимчивости. Также восемь генотипов имели различную степень устойчивости (устойчивые и среднеустойчивые в равном количестве). Все изученные образцы *S. ajanhuiri* оказались поражаемыми ЗКН, среди образцов *S. stenotomum* были выделены гипертосприимчивые, реакция которых требует дальнейшего анализа, устойчивых обнаружено не было. Среди образцов *S. goniacalyx* и *S. phureja* были представлены все варианты реакций на поражение ЗКН — от гипертосприимчивости до устойчивости.

4.2. *In silico* анализ полиморфизма *R* генов у ПКВ картофеля

Проведён поиск гомологов 27 *R* генов или их участков. Найдены последовательности гомологичные всем исследованным генам или их участки. В дальнейшем гены, точные и полные белок-кодирующие последовательности которых неизвестны, и гены, при первичном поиске которых были значительные расхождения (в частности, при анализе SRA данных ген *Rpi-mch1* имел крайне низкое покрытие, хотя в сборках он присутствовал), были исключены из анализа. Также в поиске были использованы некоторые референсные *R* гены, гомологичные друг другу, например *R2*, *R2-like*, *Rpi-blb3*, *Rpi-abpt* — это группа схожих между собой генов, найденных у различных образцов и видов на IV хромосоме [47]. Из каждой такой группы были выбраны гены, которые при поиске в геномах ПКВ картофеля имели наибольшую схожесть: из гомологов *R2* — *R2-like*, среди гомологов *RB/blb1* — *Rpi-sto1*, среди различных аллельных вариантов *Rpi-vnt1* — *Rpi-vnt1.3*. Таким образом, полностью анализ проведён для 15 *R*

генов и частично выполнен для *Gro1-4* (см раздел 4.3.3.), поскольку его различия в его интронной структуре не позволяют выполнить аналогичный остальным исследованным *R* генам анализ, и сравнение было бы некорректно.

Поиск гомологов *R* генов, как в SRA данных, так и в сборках ПКВ картофеля показал наличие кодирующих последовательностей (cds) всех изученных *R* генов. Гомологи некоторых генов и ранее были выявлены при анализе референсного генома картофеля DM1-3 [10,11], а также при поиске в сборке *S. gonioscalyx* [12], гомологи других генов проанализированы и обнаружены впервые. В то же время некодирующие последовательности генов (UTR, intron) имели значительные отличия (сходство некоторых интронов составляло менее 60%), которые могли существенно затруднить выполняемый ранее поиск гомологов этих генов или скрининг на присутствие SCAR маркеров.

При анализе SRA данных в кодирующих последовательностях 15 *R* генов было выявлено более 2000 сайтов полиморфизма, большинство из которых являлись однонуклеотидным полиморфизмом (SNP), но были обнаружены и инсерции и делеции. Особенно они оказались характерными для генов *Rpi-amr3* и *R1*. Эти данные соответствуют и последовательностям гомологичным этим генам и в сборках. Более 25% SNP были общими для всех изученных образцов ПКВ картофеля. Но это значение неравномерно распределено между генами. Большая доля SNP, обнаруженных у всех образцов ПКВ картофеля, была характерна для генов из североамериканских диких видов картофеля, в частности в генах *R3a* и *Rpi-blb2* она составляла около 50%. Для генов, изначально клонированных у культурного картофеля, она была значительно меньше и в среднем варьировала в пределах 11–15%, а в гене *Ve1* общих для всех ПКВ картофеля SNP зафиксировано не было. С SNP уникальными для отдельных образцов ситуация обратная — наибольшая доля в генах из культурного картофеля (например, для генов *Ve1* и *R8* частота

уникальных SNP более 20%), наименьшая у генов североамериканского происхождения: 7% среди SNP *R2-like*, 8,5% в *Rpi-blb2*, наибольшее значение среди всех генов североамериканских видов у гена *R1* — 15%.

В сборках гены представлены разным числом копий: от одной или небольшого числа как у генов *R3a*, *Rpi-blb2* до многокопийности — в частности гомологи гена *R2-like* в геноме ПКВ картофеля представлены более чем 20 копиями. У большинства генов хотя бы одна из копий являлась потенциально белок-образующей (содержала старт-кодон в том же месте, что и у референсного гена, и не содержала явных стоп-кодонов в тех границах *cds*, которые были определены для этого гена). Лишь в сборке DM1-3 было найдено три *R* гена, ни один из гомологов которых не может производить гомологичную аминокислотную последовательность, в остальных сборках у каждого из генов было найдено как минимум по одной потенциально белок-образующей копии.

Отличия в сходстве аминокислотных последовательностей (рис. 1), как и распределение SNP по числу образцов, в которых они были обнаружены, в целом соответствует представлениям о филогенетической удалённости источников некоторых *R* генов. Самое низкое сходство демонстрируют гомологичные копии таких генов, как *Rpi-amr3* и *R3a*. Уровень отличий аминокислотных последовательностей этих генов у ПКВ картофеля по сравнению с референсными превышал 20% для всех исследованных сборок. В случае с *Rpi-amr3* это вполне объясняется филогенетическим отдалением *S. americanum* Mill. — донором этого гена устойчивости, которые не относятся к клубненосным видам рода *Solanum*. Степень различий гена *R3a* выше, чем у других генов *S. demissum* Lindl. (*R1*, *R2-like*, *R3b*), возможно это связано с тем, что в большинстве сборок у этого гена обнаружена всего одна копия.

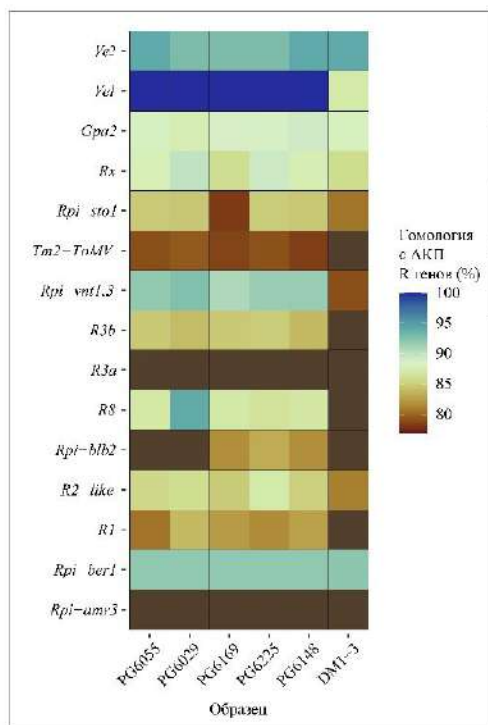


Рисунок 1. Тепловая карта сходства аминокислотных последовательностей R генов с наиболее сходными гомологичными копиями, обнаруженными в сборках геномов ПКВ картофеля.

К следующей по увеличению сходства группе (различия 15–20%) относятся преимущественно гены из североамериканских диких видов: *Rpi-blb2*, *R1*, *R3b*, *Rpi-sto1*, а также *Tm2-ToMV*, источник которого доподлинно неизвестен. У некоторых генов этой группы наблюдается значительное варьирование между гомологами в сборках разных образцов ПКВ картофеля. В большинстве случаев оно связано с полиморфизмом наиболее схожей по нуклеотидной последовательности копии, который приводит к отсутствию аминокислотной последовательности, в результате чего в сравнении используется другая копия. Но в некоторых случаях речь действительно идёт о полиморфизме внутри одной гомологичной копии гена.

К следующей группе с отличиями от референсных генов 10–15% относятся некоторые из генов, найденных у культурного картофеля: *R8*, *Rx*, *Gra2*. Довольно необычно, что гомологи генов из южноамериканских диких видов *Rpi-vnt1.3* и *Rpi-ber1* имеют меньше отличий с аминокислотной последовательностью референсных генов. Возможно, гены культурного картофеля являются привнесёнными в результате селекционного процесса, что подтверждается данными М. Hardigan [48], в работе которого показаны интрогрессии в тетраплоидных ландрасах и ещё более многочисленные в

сортах картофеля, но, являющиеся совершенно не характерными, единично представленными в диплоидных видах.

Но наиболее сходными с референсными оказались гены *Ve1* (аминокислотная последовательность которого в большинстве сборок вообще не отличается от референсной) и *Ve2*. Эти гены являются представителями другого семейства (RLP/RLK) и обеспечивают работу другого варианта иммунитета. Хотя, оба гена открыты, как гены устойчивости к вертициллёзному увяданию (поражение *Verticillium dahliae* Kleb.), есть основания предполагать, что они могут препятствовать поражению растений и другими патогенами сходной природы, поскольку PAMP (а гены *Ve1* и *Ve2* относятся к этому типу иммунитета) обеспечивают распознавание эффекторов, характерных для широкого круга патогенов. Обнаруженная у ПКВ картофеля последовательность, полностью аналогичная гену *Ve1*, говорит о перспективности их использования в качестве источников устойчивости к вертициллёзному увяданию. Возможно, имеет смысл проведение фитопатологического исследования для определения ширины круга патогенов, распознаваемых этой системой.

Большинство *R* генов относятся к семейству NLR и обладают сложной структурой. Ранее исследователями была показана неравнозначность скорости замен в разных доменах [49]. Так NBS домен является более консервативным, поскольку связан с активацией механизма защиты растений внутри клетки, в то время как LRR домен, отвечающий за распознавание патогена, более вариабельный и скорость замен в нём выше. Было решено проанализировать количество замен в разных доменах аминокислотных последовательностей гомологов *R* генов у ПКВ (рис. 2).

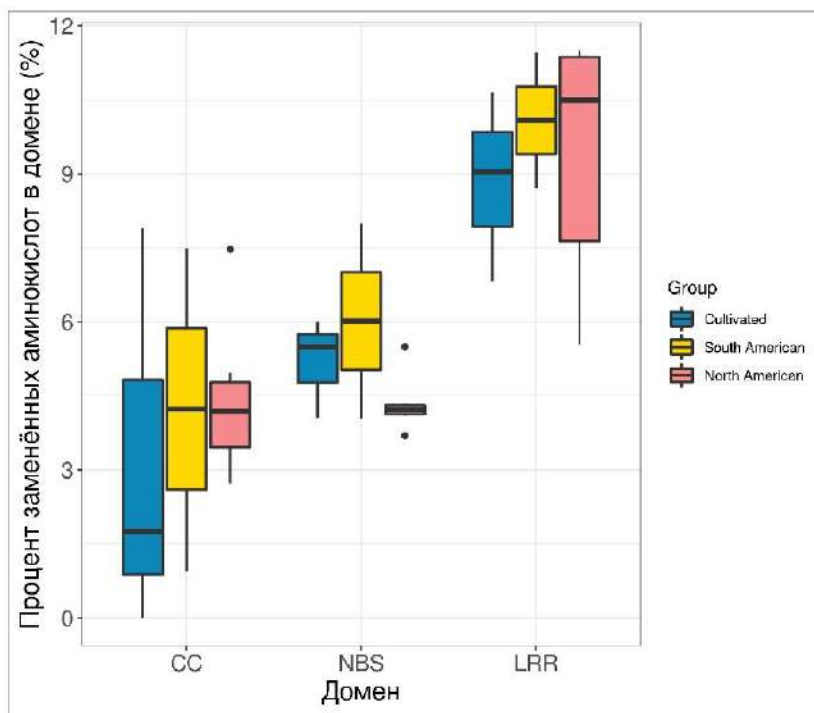


Рисунок 2. Сравнение доли аминокислотных замен в разных доменах *R* генов. Учитывались только последовательности образующие полноценные белки (не содержащие преждевременных стоп-кодона). Не включены гены *Ve1* и *Ve2*, имеющие, согласно данным *InterPro* и *NCBI*,

другую доменную организацию.

LRR домен, как и в литературных данных, оказался наиболее вариабельным: в среднем более 9% аминокислот в этом домене были заменены, независимо от происхождения гена. Минимальное количество замен оказалось в NBS домене генов из североамериканских диких видов картофеля, более того оно значительно меньше различалось между генами, варьируя между 3,6 и 5,5%. Замены в CC домене значительно варьировали между генами, практически отсутствуя в генах *R8*, *Rpi-vnt1.3* и *Rx* и достигая 7 (*Rpi-blb2*, *Gpa2*) и даже 11% в *Tm2-ToMV*.

Таким образом, хотя в целом, характер полиморфизма у ПКВ картофеля значительно различается у генов, происходящих из филогенетически различных источников, распределение аминокислотных замен между доменами от гена не зависит.

4.3. Полиморфизм *R* генов у образцов ПКВ картофеля в коллекции ВИР

Для 70 образцов (75 генотипов) был проведён скрининг на наличие известных SCAR-маркеров генов устойчивости к фитофторозу и ЗКН. Среди генов устойчивости к фитофторозу были выбраны маркеры тех генов,

гомологи которых были ранее показаны при анализе NBS-LRR генов в референсном геноме картофеля DM1-3 [10,11]. Маркеры выбирались среди тех, которые ранее использовались при скрининге сортов или диких видов, отличающихся от первоначального источника референсного гена. Таким образом был проведён скрининг на наличие маркеров генов устойчивости к фитофторозу *RB/Rpi-blb1* (*Rpi-sto1-890*, *Rpi-blb1-821*), *R2-like* (*R2-like area ½*), *Rpi-vnt1.3* (*Rpi-vnt1.3-621*) и маркеров генов устойчивости к ЗКН: *H1* (57R и TG689) и *Gro1-4* (*Gro1-4-602*).

Маркер гена *R2-like* у ПКВ картофеля обнаружен не был. *In silico* анализ этого гена показал, что в областях праймирования у ПКВ картофеля находится большое количество замен (4-7 на каждый из праймеров), которые могли повлиять на возможность отжига праймера. Не связывание праймеров с матрицей и, соответственно, отсутствие специфического продукта амплификации могли привести к не обнаружению маркера *R2-like area ½* в образцах ПКВ картофеля из коллекции ВИР. В местах праймирования других маркеров также были обнаружены замены, в связи с чем маркеры *Rpi-sto1-890*, *Rpi-blb1-820*, *Rpi-vnt1.3-621* были модифицированы в соответствии с частотными у ПКВ картофеля заменами (см разделы 4.3.1. и 4.3.2.). При первичном скрининге образцов из клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР корреляции между наличием маркера и полевой или лабораторной устойчивостью обнаружено не было.

Для скрининга на наличие генов устойчивости к ЗКН были выбраны маркеры генов *H1* -(TG689, 57R) и *Gro1-4* (*Gro1-4*). Маркер 57R был найден у всех образцов ПКВ картофеля, TG689 и *Gro1-4-602* встречались, как в устойчивых, так и в восприимчивых образцах, но никакого паттерна связанного с реакцией на заражение ПКВ картофеля золотистой картофельной нематодой мы не обнаружили. Маркеры гена *H1* являются сцепленными с геном, а его последовательность не известна, таким образом, мы более подробно сосредоточились на изучении полиморфизма гена *Gro1-4*

(см раздел 4.3.3).

4.3.1. Полиморфизм последовательности гена *RB/Rpi-blb1* у примитивных культурных видов картофеля

RB/Rpi-blb1 — первоначально был найден у *S. bulbocastanum*, его гомологи *Rpi-sto1* и *Rpi-pta1* были обнаружены у *S. stoloniferum* (L.) Schltdl. и *S. papita* Rydb. и имеют более 99% сходства. Эти виды являются представителями разных секций диких видов картофеля (*Bulbocastana* (Rydb.) Hawkes и *Longipedicellata* Buk.) и филогенетически далеки друг от друга, и ещё более далеки от культурного картофеля. На последовательность этого гена были разработаны несколько маркеров, два из которых (*Rpi-sto1-890* и *Rpi-blb1-820*) были использованы при скрининге коллекции ПКВ картофеля ВИР. Но первоначальный скрининг выявил значимые отличия в частоте между этими маркерами. Так *Rpi-sto1-890* был обнаружен во многих образцах, вплоть до 71% генотипов *S. stenotomum*, в то время как *Rpi-blb1-820* был найден лишь единично.

При биоинформатическом поиске этого гена в сборках были найдены оба экзона со сходством 93-94% для экзона 1 и 89-90% для экзона 2. Сходство интронной последовательности существенно ниже и не превышает 80%, кроме того содержит многочисленные делеции и инсерции, которые могут значительно повлиять на длину интрона, что может отразиться на длине амплифицируемого фрагмента *Rpi-sto1-890*, и возможно, послужило причиной появления большого количества неспецифических фрагментов при визуализации результатов ПЦР в агарозном геле. Кроме того, *in silico* анализ показал многочисленные SNP в области праймирования. Мы переработали последовательности праймеров с учетом частотных замен и в результате амплификация маркерных фрагментов зафиксирована во всех образцах.

У генотипов ПКВ картофеля из коллекции ВИР сходство полных маркерных фрагментов с последовательность референсного гена *Rpi-sto1* составляет от 81 до 85%. Если учитывать только участки маркера, лежащие в

пределах кодирующей последовательности (без учета интрона), то сходство повысится до 93-94%, что полностью соответствует значениям сходства с экзоном 1 в сборках геномах ПКВ картофеля, проанализированных *in silico*. На этом участке у двух образцов, контрастных по устойчивости, были обнаружены двух-нуклеотидные инсерции, ведущие к образованию стоп-кодонов, что явно свидетельствует о том, что у *S. goniacalyx* к-9922 эта последовательность не связана с формированием устойчивости (это среднеустойчивый образец).

При сравнении остальных последовательностей с референсом обнаружено 15 позиций с аминокислотными заменами, две из них обнаружены у всех образцов, по остальным наблюдался значительный полиморфизм. В последовательности маркерного фрагмента *Rpi-sto1-890* мы не обнаружили замен, ассоциированных с устойчивостью, все замены были или единичны или присутствовали, как у устойчивых, так и у восприимчивых образцов.

Нам удалось секвенировать последовательности маркера *Rpi-blb1-820* только для двух генотипов *S. ajanhuiri* к-9911, контрастных по устойчивости. В обоих генотипах обнаружена семи-нуклеотидная делеция, ведущая к образованию стоп-кодона, таким образом для этого образца *Rpi-sto1* не может быть геном, ассоциированным с устойчивостью.

Таким образом, в образцах ПКВ картофеля ВИР мы обнаружили довольно большой паттерн общих изменений относительно референсных последовательностей. Что хорошо согласуется с данными полученными *in silico* — 34,15% SNP найденных в этом гене были найдены у всех изученных образцов, а большинство более крупных изменений характеризовали отдельные копии, но присутствовали во всех сборках. Вместе с тем, в маркерном фрагменте *Rpi-sto1-890* мы выявили сайт (двух-нуклеотидная инсерция), явно препятствующий нормальному функционированию гена у отдельных образцов, хотя конкретно этот сайт в данных NCBI обнаружен не был. Между сборками ПКВ картофеля также наблюдаются существенные

отличия в сходстве с аминокислотной последовательностью референсного гена *Rpi-sto1*. Всё это говорит о существовании полиморфизма среди ПКВ картофеля, который, однако, связать с признаком устойчивости не удалось. Этот ген, скорее всего, не формирует устойчивость у образца *S. ajanhuiri* к-9911, но судить о его участии в формировании признака у других образцов преждевременно. Высокая доля общих отличий ПКВ от референсного гена, как в *in silico* анализе, так и у образцов коллекции ВИР, скорее говорит об отсутствии связи между аллельными вариантами этого гена и устойчивостью к фитофторозу у ПКВ картофеля.

4.3.2. Полиморфизм последовательности гена *Rpi-vnt1.3* у примитивных культурных видов картофеля

Rpi-vnt1, с тремя аллельными вариантами: *Rpi-vnt1.1*, *Rpi-vnt1.2* и *Rpi-vnt1.3* (FJ423046.1) был открыт у *S. venturii* Hawkes & Hjert., впервые клонирован S.Foster [20] и соавторами, а в рамках диссертации M.Pel [19] были подробно рассмотрены и его гомологичные последовательности у других видов, включая ПКВ картофеля. Он же предположил, что *Rpi-vnt1.3* гомологичен гену *Rpi-phu1* (локусу, ассоциированному с устойчивостью к фитофторозу у *S. phureja* открытому ранее J.Sliwka) [18]. Однако в его работах ни одна из гомологичных последовательностей не была функциональной, в отличие от собственно гена *Rpi-vnt1*.

Первоначальный анализ последовательностей гена *Rpi-vnt1.3* у ПКВ картофеля из коллекции ВИР выявил три аллельных варианта, один из которых был явно не функционален (пяти-нуклеотидная делеция). Наблюдался чёткий паттерн ассоциации с устойчивостью (в восприимчивых образцах аллельные варианты без делеции не были встречены) (рис. 3).

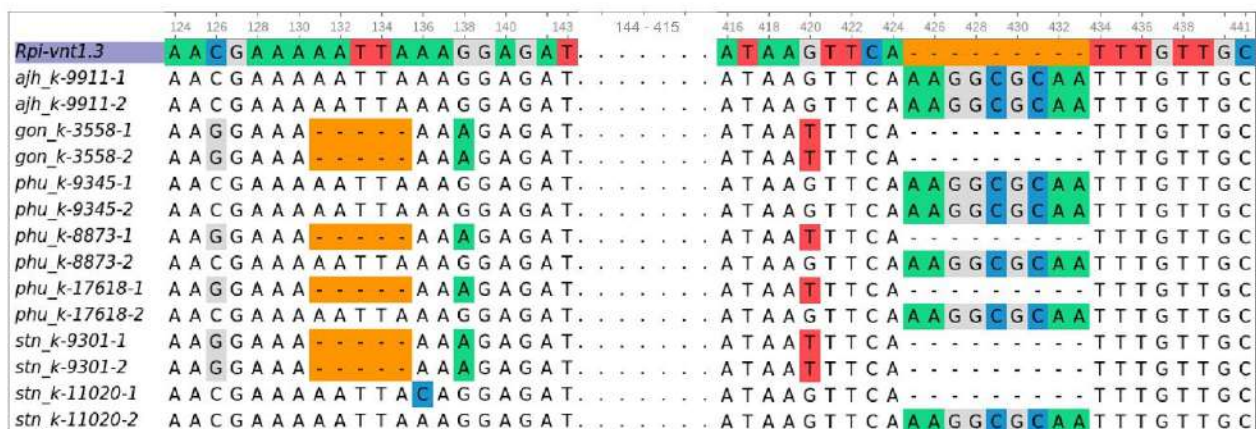


Рисунок 3. Выравнивание нуклеотидной последовательности образцов ПКВ картофеля из коллекции ВИР на последовательность гена *Rpi-vnt1.3* (GeneBank: FJ423046.1)

Для подтверждения функциональности и более подробного анализа полиморфизма этого гена нами были созданы ещё два маркера (рис. 4). Один из них (Vnt-head-469) захватывает начало гена, которое, согласно *in silico* данным, имеет значительные отличия, как между образцами, так и между копиями внутри одного образца. Второй маркер (Vnt-tail-897) создан на участок, соответствующий LRR мотиву, поскольку в исследовании других генов (*RB/Rpi-blb1*) были значительные отличия в обнаружении и сходстве разных участков гена.

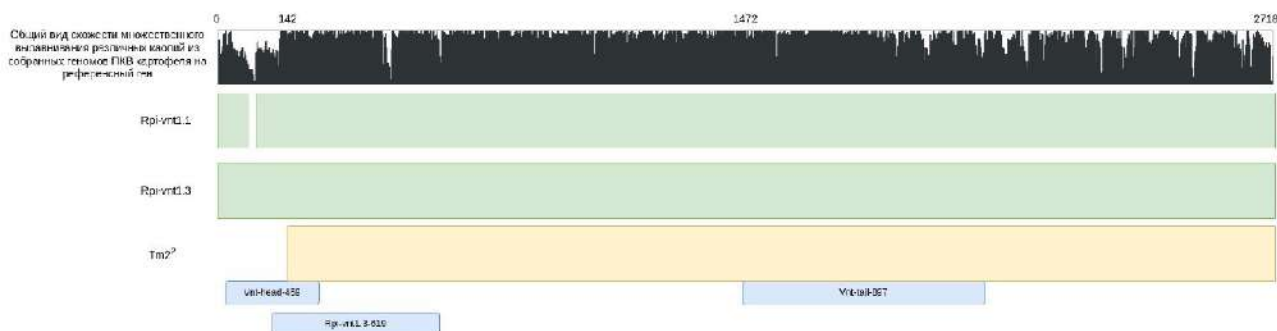


Рисунок 4. Схема *Rpi-vnt1* и гомолога *Tm2²* с общим видом множественного выравнивания различных копий гомологичных генов у ПКВ картофеля

Анализ начального участка гена (маркер Vnt-head-429) показал, что и в устойчивых образцах есть изменения, ведущие к образованию стоп-кодона. А степень гомологии этого участка не соответствовала таковой по данным NCBI или при сравнении других участков гена (рис. 4). Выявленные отличия, вместе с анализом литературных данных, привели нас к

предположению о более позднем расположении старт-кодона. M.Pel (2009) и S.Foster (2009) при анализе функциональности этого гена показали, что при использовании методов со сверхэкспрессией работает и укороченный фрагмент, гомологичный гену *Tm2²* из томата, а также многим другим последовательностям у других диких видов картофеля. При использовании методов с обычным уровнем экспрессии, растения, содержащие укороченный вариант гена, не были устойчивыми [19, 20]. Предположения M. Pel связаны с устойчивостью белка, но мы считаем, что решающую роль играет нетранслируемый участок мРНК, который M.Pel считал частью *cds* [19]. Дополнительным аргументом в пользу более позднего расположения стоп-кодона (на рисунке 4 отмечен 142 нуклеотид, а также соответствует началу гена *Tm2²*) является более точное соответствие консенсусной последовательности Козака установленной для двудольных [50–52]. Одной из ключевых позиций в этой последовательности, влияющих на степень распознавания старт-кодона, является присутствие гуанина (G) на +4 позиции, он отсутствует в стартовом-кодоне, заявленном для референсного гена, но присутствует у предполагаемого нами старт-кодона, который соответствует 142 позиции референсного гена *Rpi-vnt1.3*.

В области LRR домена, на который ложится маркер Vnt-tail-897, было обнаружено несколько изменений, уникальных для отдельных генотипов. *S. phureja* к-8873, устойчивый к фитофторозу, содержит три крупные делеции размером 15, 38 и 29 нуклеотидов, соответственно. Эти делеции приводят к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона. У остальных исследованных генотипов столь сильных изменений нет, но одна из аллелей устойчивого образца *S. stenotomum* к-11020, использованного как родительская форма при создании популяции, имеет трехнуклеотидную инсерцию, отсутствующую у других образцов, и приводящую к вставке дополнительной аминокислоты (Изолейцина между 743 и 744 аминокислотами референса).

Кроме этих изменений зафиксировано также довольно большое количество SNP, которое позволило разработать CAPS маркеры, отличающие устойчивую и восприимчивую родительские формы *S. stenotomum* (см раздел 4.4.).

4.3.3. Полиморфизм последовательности гена *Gro1-4* у примитивных культурных видов картофеля

Gro1-4 (GeneBank: AY196151.1) — ген устойчивости к золотистой картофельной нематодe, первоначально описанный у *S. spgazzini* Bitter. Имеет сложную структуру, состоящую из четырёх экзонов, трёх интронов. Ввиду очень крупных некодирующих областей, которые у примитивных культурных видов картофеля имеют значительно более сильные отличия от референсных последовательностей, установить степень гомологии полных последовательностей, не удалось.

Во всех геномах были обнаружены последовательности потенциально способные производить белок, гомологичный *Gro1-4* (согласно его экзонной структуре), но судить о том, как столь глобальное изменение первого интрона способно повлиять на протекание сплайсинга и итоговую последовательность мРНК мы не можем.

При анализе последовательностей маркерного участка в образцах из коллекции ВИР мы также обнаружили значительные изменения в области интрона 3, в частности крупную инсерцию в 27 нуклеотидов, но нас в большей степени интересовали изменения в кодирующей области гена (рис. 5) и их возможная связь с устойчивостью.

	304	306	208	210	212	314	216	218	220	222	224	226	228	230	232	233-463	464	466	468	470	472	474	476	478	480	482	484	486	488	490	492	494	
Gro1-4 reference	A	A	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
phu 19198 R	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
gon 11080 R	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
phu 24326 MR	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
phu 24326-2 MR	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
phu 8940 MR	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
gon 8509 S	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
gon 8509-2 S	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
ajn 9900 S	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
stn 11020 S	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T
stn 14790 S	A	A	T	G	T	T	G	A	T	G	A	G	T	T	C	A	T	T	C	A	G	A	A	C	T	T	T	G	C	T	T	G	T

Рисунок 5. Выравнивание нуклеотидной последовательности образцов ПКВ картофеля из коллекции ВИР на последовательность гена *Gro1-4* (GeneBank: AY196151.1)

В общей сложности на участках экзонов маркера гена *Gro1-4* в генотипах ПКВ картофеля найдено 31 SNP и одна трех-нуклеотидная делеция (рисунок 5). Делеция и почти половина найденных SNP имеются у всех изученных образцов, остальные - у одного или двух образцов, причём довольно часто в гетерозиготном состоянии.

Ни один из SNP не ассоциирован с устойчивостью, хотя большинство из них привели к аминокислотным заменам, в том числе у всех образцов есть участки с несколькими заменёнными подряд аминокислотами. Большая часть маркерной последовательности кодирует один из лейцин-богатых повторов в соответствующей белковой структуре, а также начало C-JID домена, которые предположительно отвечают за распознавание субстрата, соответственно изменения аминокислотной последовательности в этом регионе могут повлиять на распознавание патогена. Но никакой связи SNP с устойчивостью (различий между группами устойчивых и восприимчивых образцов) мы не обнаружили, так что судить о возможной роли гена *Gro1-4* в формировании устойчивости к золотистой картофельной нематоды у примитивных культурных видов картофеля не представляется возможным.

4.4. Гибридологический анализ и создание CAPS маркера гена *Rpi-vnt1.3* для популяции *S. stenotomum*

Популяция была получена от скрещивания устойчивого генотипа *S. stenotomum* к-11020 (отцовская форма) и восприимчивого генотипа *S. stenotomum* к-9301 (материнская форма). В течение двух лет были сохранены

и изучены 35 генотипов этой популяции. В динамике была произведена оценка по поражению фитофторозом на естественном инфекционном фоне. В результате были выделены устойчивые и восприимчивые генотипы. Генотипы, сильно поразившиеся хотя бы в один год исследований, считались восприимчивыми.

По результатам секвенирования участков *Rpi-vnt1.3* у родительских форм для каждого из маркеров *Rpi-vnt1.3-612* и *Vnt-tail-897* были подобраны рестриктазы, таким образом, чтобы полученные фрагменты были хорошо различимы даже в гетерозиготном состоянии, которое ожидалось у потомства (Таблица 3). Нам было известно, что у устойчивого родителя имеется два аллельных варианта фрагмента *Rpi-vnt1.3-612*, поэтому рестриктазы подбирались таким образом, чтобы каждая отличала одну из аллелей от остальных.

Таблица 3. Разработка CAPS маркеров для выявления аллельных вариантов *Rpi-vnt1* у родительских форм *S. stenotomum*. Жирным шрифтом выделены диагностические фрагменты

Маркер	Рестриктаза	Ожидаемая длина фрагментов (н.)	
		S — восприимчивый родитель к-9301	R — устойчивый родитель к-11020
<i>Rpi-vnt1.3-612</i>	<i>AscI</i>	299+252+30+26	367+117+76+31+30
<i>Rpi-vnt1.3-612</i>	<i>HaeIII</i>	399 + 208	612
<i>Vnt-tail-897</i>	<i>RsaI</i>	897	647+150
<i>Vnt-tail-897</i>	<i>Tru9 I</i>	Фрагменты получились не ожидаемой длины, но вариант устойчивого родителя был отличим по фрагменту длиной около 350 нуклеотидов	

Проверка CAPS маркеров на популяции дала положительный результат. Результат воздействия рестриктазы *AscI* на *Rpi-vnt1.3-612* полностью совпадал с результатом обработки маркер *Vnt-tail-897*, рестриктазой *Tru9 I*. Что свидетельствует о тесном сцеплении этих фрагментов. А также был прямо противоположен результатам обработки этих маркеров двумя другими рестриктазами (*HaeIII* и *RsaI* соответственно). С данными по полевой

устойчивости оказался связан аллельный вариант выявляемый рестриктазами AscI и Tru9 I (Таблица 4).

Таблица 4. Результаты применения CAPS маркера с использованием сочетаний: маркер *Rpi-vnt1.3-612* с рестриктазой *AscI* и *Vnt-tail-897* с рестриктазой *Tru9 I*. (Результаты действия каждого из CAPS маркеров полностью совпадают). χ^2 подсчитывался исходя из ожидаемого распределения 1:1:1:1

$\chi^2 = 10,6$ (p < 0.05)	Полевая устойчивость за 2 года	
CAPS маркер	R - устойчив	S - восприимчив
Предположительно функциональный аллельный вариант (как у устойчивого родителя)	14	5
Предположительно нефункциональный аллельный вариант	3	13

Для некоторых образцов мы получили результаты, не соответствующие ожидаемому (если исходить из связи этого аллельного варианта *Rpi-vnt1.3* с устойчивостью), мы планируем в дальнейшем исследовать этот ген. Возможно нужный нам ген, просто находится рядом (тесно сцеплен) с этим геном, а возможно требуются какие-то дополнительные факторы для формирования устойчивости. Мы планируем секвенировать маркерные последовательности у потомства от скрещивания, а также разработать маркеры на оставшуюся часть гена, чтобы полностью получить последовательность гена у ПКВ картофеля из коллекции ВИР.

Глава 5. Заключение

В ходе исследования проведена комплексная оценка образцов клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР, включающая фенотипирование по морфологическим признакам и устойчивости к фитофторозу и ЗКН. *In silico* проведён поиск и анализ гомологов 27 известных *R* генов в образцах ПКВ картофеля из общедоступных баз данных. Проведён анализ образцов ПКВ картофеля из коллекции ВИР на наличие SCAR-маркеров и полиморфизм маркерных фрагментов *R* генов. Этот подход позволил оценить характер полиморфизма генов устойчивости ПКВ картофеля к фитофторозу, ЗКН и вертициллезному увяданию, выделить наиболее перспективные и интересные для дальнейшего изучения.

Выводы

- ПКВ картофеля в коллекции ВИР представляют большое разнообразие, включая высокое скрытое разнообразие по морфологическим и генетическим признакам.
- В клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР есть перспективные для использования в селекции образцы: источники устойчивости к фитофторозу *S. ajanhuiri* к-9900 и к-9911; *S. goniocalyx* к-9922; *S. phureja* к-8873, к-9345, к-11547, к-16896, к-17618, к-19321 и к-23516; *S. stenotomum* к-8354, к-9778, к-11020, к-17486. Источники устойчивости к ЗКН — *S. goniocalyx* к-11080 и *S. phureja* к-8210, к-8497, к-8940, к-9402, к-17462, к-19198, к-24326. Также выявлена потенциальная возможность использования ПКВ картофеля в качестве источников устойчивости к вертициллезному увяданию (возможно и другим заболеваниям).
- У ПКВ картофеля есть последовательности гомологичные белок-кодирующим последовательностям многих *R* генов, включая клонированные у филогенетически далёких источников.
- У образцов ПКВ картофеля различия в полиморфизме гомологов *R*

генов и общие отличия от референсной последовательности гена зависят от филогенетической удалённости источника исследуемого гена. Частоты аминокислотных замен не зависят от происхождения генотипов - источников референсных генов, но отличаются для разных участков: минимальное количество замен (3,6-5,5%) выявлено в домене NBS, наибольшая вариабельность (более 9%) отмечена у домена LRR, частота замен в домене СС варьирует от 0 до 11%.

- У ПКВ картофеля из коллекции ВИР обнаружено несколько аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1.3*. У устойчивого образца *S. stenotomum* к-11020 выявлено два аллельных варианта гена *Rpi-vnt1.3*, один из которых ассоциирован с устойчивостью. У образца *S. phureja* к-8873 обнаружены три последовательных делеции в LRR домене, препятствующие функционированию гена.

- В коллекции ПКВ картофеля ВИР обнаружены различные аллельные варианты гена *RB/Rpi-blb1*, не связанные с устойчивостью. В последовательности маркера *Rpi-sto1-890* среднеустойчивого образца *S. goniocalyx* к-9922 обнаружена двухнуклеотидная делеция, а в маркерной последовательности *Rpi-blb1-821* устойчивого генотипа *S. ajanhuiri* к-9911 — семинуклеотидная делеция. Оба варианта явственно препятствуют функционированию гена.

- У образцов видов *S. ajanhuiri*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum* выявлен полиморфизм маркерной последовательности гена *Gro1-4*, связи с устойчивостью не обнаружено, но и вариантов явственно препятствующих работе гена также не выявлено.

Дальнейшие перспективы и планы исследования

Автор планирует продолжить исследование связи аллельного варианта *Rpi-vnt1.3* с устойчивостью в популяции *S. stenotomum*, продолжить исследования образцов из коллекции ВИР по другим генам, из которых *Rpi-*

ber1, *R8* и, возможно, *Gpa2* и *Rx* являются наиболее перспективными. Представляет интерес проведение *in silico* анализа на расширенной выборке, с включением диких южноамериканских видов картофеля, что позволит продвинуться вперед в познании эволюционных особенностей *R* генов картофеля.

Другим возможным направлением для исследований является выявление патогенов, распознаваемых геном *Ve1*, изучение полиморфизма этого гена в более широкой выборке образцов коллекции картофеля и определение степени устойчивости, которую он может обеспечить. А также поиск других генов этого типа иммунитета, возможно обеспечивающих устойчивость к другому кругу патогенов.

Список опубликованных работ

1. Гурина А.А, Алпатьева Н.В, Чалая Н.А, Мироненко Н.В, Хютти А.В, Рогозина Е.В. Гомологи генов устойчивости к фитофторозу у представителей клубнеобразующих видов рода *Solanum* L. Генетика. – 2022. – Т. 58. – № 12. – С. 1418-1430. – DOI 10.31857/S0016675822120049.
2. Рогозина Е.В., Гурина А.А. Состав коллекции примитивных культурных видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. и актуальные направления их исследования. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020;181(3):190-202. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-190-202>
3. Rogozina, E.V.; Gurina, A.A.; Chalaya, N.A.; Zoteyeva, N.M.; Kuznetsova, M.A.; Beketova, M.P.; Muratova, O.A.; Sokolova, E.A.; Drobyazina, P.E.; Khavkin, E.E. Diversity of Late Blight Resistance Genes in the VIR Potato Collection. Plants 2023, 12, 273. <https://doi.org/10.3390/plants12020273>

Список Литературы.

1. FAO. Land use statistics and indicators. Global, regional and country trends, 2000–2020. Rome: FAOSTAT Analytical Brief, no. 48., 2020.
2. Savary S. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops // Nat Ecol Evol. 2019. Vol. 3, № 3. P. 430–439.
3. Ristaino J.B. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans* // Microbes Infect. Elsevier Masson, 2002. Vol. 4, № 13. P. 1369–1377.
4. Haverkort A.J. et al. Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project // Potato Res. Springer Netherlands, 2016. Vol. 59, № 1. P. 35–66.
5. Bradeen J.M. (James M., Kole Chittaranjan. Genetics, genomics and breeding of potato. CRC Press [distributor], 2011. 296 p.
6. Gabriel J., Franco J. *Solanum phureja* Juz et Buk.: Valuable Source of Genetic Resistance to Potato Late Blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] Tomato Breeding View project Genetics Resources View project. 2014.
7. Hawkes J.G., Hjerting J.P. The Potatoes of Bolivia: Their Breeding Value and Evolutionary Relationships. Oxford: Oxford University Press, 1989. 1–504 p.
8. Горбатенко Л.Е. Виды картофеля Южной Америки (Экология, география интродукция, систематика, селекционная значимость). СПб: ВИР, 2006. Vol.456.
9. Xu X. et al. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato // Nature. 2011. Vol. 475, № 7355. P. 189–195.
10. Lozano R. et al. Genome-wide identification and mapping of nbs-encoding resistance genes in *solanum tuberosum* group *phureja* // PLoS One. 2012. Vol. 7, №4.
11. Jupe F. et al. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome // BMC Genomics. 2012. Vol. 13, № 1.
12. Liu Z. Diversity of NB-LRR genes in the genome of *Solanum stenotomum* subsp. *goniocalyx*. 2020.
13. Bao Z. et al. Genome architecture and tetrasomic inheritance of autotetraploid potato // Mol Plant. Cell Press, 2022. Vol. 15, № 7. P. 1211–1226.
14. Hoopes G. et al. Phased, chromosome-scale genome assemblies of tetraploid potato reveal a complex genome, transcriptome, and predicted proteome landscape underpinning genetic diversity // Mol Plant. Cell Press, 2022. Vol. 15, № 3. P. 520–536.

15. Kyriakidou M. et al. Structural genome analysis in cultivated potato taxa // Theoretical and Applied Genetics. Springer, 2020. Vol. 133, № 3. P. 951–966.
16. Tang D. et al. Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes // Nature. Springer Science and Business Media LLC, 2022. Vol. 606, № 7914. P. 535–541.
17. Li Y. et al. Genomic Analyses Yield Markers for Identifying Agronomically Important Genes in Potato // Mol Plant. Cell Press, 2018. Vol. 11, № 3. P. 473–484.
18. Sliwka J. et al. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans* // J Appl Genet. 2010. Vol. 51, № 2. P. 133–140.
19. Pel M.A. Mapping, Isolation and characterization of genes responsible for Late Blight Resistance in Potato. 2009.
20. Foster S.J. et al. *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2(2)* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight // Mol Plant Microbe Interact. Mol Plant Microbe Interact, 2009. Vol. 22, № 5. P. 589–600.
21. Costanzo S. et al. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* x *S. stenotomum* // Theoretical and Applied Genetics. Springer, 2005. Vol. 111, № 3. P. 609–617.
22. Costanzo S., Christ B.J., Ay N E S K.G.H. Late blight resistance in a diploid full-sib potato family // Plant Breeding. Blackwell Verlag, 2004. Vol. 123. P. 377–381.
23. Álvarez M.F. et al. Identification of novel associations of candidate genes with resistance to late blight in *Solanum tuberosum* group Phureja // Front Plant Sci. Frontiers Media S.A., 2017. Vol. 8. P. 1040.
24. Tommiska T.J. et al. Mapping of the gene *Nx(phu)* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* IvP35 // Theoretical and Applied Genetics. Springer, 1998. Vol. 96, № 6–7. P. 840–843.
25. Vallejo R.L., Collins W.W., Young J.B. Inheritance of Resistance to Potato Virus Y and Potato Virus X in Hybrid *Solanum phureja* x *S. stenotomum* Diploid Potatoes // Journal of Heredity. Oxford Academic, 1995. Vol. 86, № 2. P. 89–93.
26. Torrance L. et al. Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja // Theoretical and Applied Genetics. Springer, 2020. Vol. 133, № 3. P. 967–980.
27. International Potato Center, Federacion Departamental de Comunidades Campesinas. Catalogo de variedades de Papa nativa de Huancavelica-Peru / ed. Portillo Z. Lima (Peru): CIP, 2016. Vol. 206.
28. Hawkes J.G. The Potato: Evolution, biodiversity and genetic resources.

London: Belhaven Press, 1990.

29. Киру С.Д. et al. Методические указания по поддержанию и изучению мировой коллекции картофеля. СПб: ВИР, 2010. 1–28 р.

30. Лехнович В.С. Картофель // Культурная флора СССР. Ленинград: Колос, 1979.

31. Юзепчук С.В., Букасов С.М. К вопросу о происхождении картофеля // Труды Всесоюзного съезда по генетике, селекции и семеноводству . 1929. Vol. 3. P. 593–611.

32. Brylinska M., Sliwka J. Laboratory assessment of potato resistance to *Phytophthora infestans* // Plant Breeding and seed science. 2017. Vol. 76.

33. Хютти А.В. et al. Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Vol. 24, № 4. P. 363–375.

34. Vleeshouwens V.G.A.A. et al. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation // Eur J Plant Pathol. 1999. Vol. 105. P. 241–250.

35. Limantseva L. et al. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry // Plant Breeding. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 133, № 5. P. 660–665.

36. Яковлева В.А., Долягин А.Б. Положение о порядке испытания сортов и гибридов картофеля на устойчивость к возбудителю рака картофеля (патотип I) и золотистой картофельной нематоды (патотип RoI) . Москва, 1993.

37. Алпатьева Н.В. et al. ПЦР-диагностика вредных организмов Гуара. Методические указания. Санкт-Петербург: ВИР, 2019. 1–36 р.

38. Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control // F1000Res. F1000Res, 2018. Vol. 7. P. 1338.

39. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. Oxford University Press, 2014. Vol. 30, № 15. P. 2114.

40. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat.Methods. 2012. Vol. 9, № 4. P. 357–359.

41. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features // Bioinformatics. Oxford Academic, 2010. Vol.26, № 6.P.841–842.

42. Koboldt D.C. et al. VarScan: variant detection in massively parallel

- sequencing of individual and pooled samples // Bioinformatics. Oxford University Press, 2009. Vol. 25, № 17. P. 2283.
43. Ladunga I. Finding Similar Nucleotide Sequences Using Network BLAST Searches // Curr Protoc Bioinformatics. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 58, № 1. P. 3.3.1-3.3.25.
44. Kumar S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // Mol Biol Evol. Mol Biol Evol, 2018. Vol. 35, № 6. P. 1547–1549.
45. Paysan-Lafosse T. et al. InterPro in 2022 // Nucleic Acids Res. Oxford Academic, 2023. Vol. 51, № D1. P. D418–D427.
46. Duan Y. et al. Late Blight Resistance Evaluation and Genome-Wide Assessment of Genetic Diversity in Wild and Cultivated Potato Species // Front Plant Sci. Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12.
47. Paluchowska P., Śliwka J., Yin Z. Late blight resistance genes in potato breeding // Planta. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022. Vol. 255, № 6.
48. Hardigan M.A. et al. Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato // Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences, 2017. Vol. 114, № 46. P. E9999–E10008.
49. Shao Z.Q. et al. Revisiting the Origin of Plant NBS-LRR Genes // Trends Plant Sci. Elsevier Current Trends, 2019. Vol. 24, № 1. P. 9–12.
50. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes // Gene. 1999. Vol. 234, № 2. P. 187–208.
51. Kochetov A. V. AUG codons at the beginning of protein coding sequences are frequent in eukaryotic mRNAs with a suboptimal start codon context // Bioinformatics. Oxford Academic, 2005. Vol. 21, № 7. P. 837–840.
52. Hernández G., Osnaya V.G., Pérez-Martínez X. Conservation and Variability of the AUG Initiation Codon Context in Eukaryotes // Trends Biochem Sci. Elsevier Current Trends, 2019. Vol. 44, № 12. P. 1009–1021.