

На правах рукописи

ГУРИНА АЛЁНА АЛЕКСЕЕВНА

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

Специальность 1.5.7. - Генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2023

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

Научный

Рогозина Елена Вячеславовна

руководитель:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов картофеля Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург

**Официальные
оппоненты:**

Матвеева Татьяна Валерьевна

доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет", г. Санкт-Петербург

Богомаз Денис Игоревич,

кандидат биологических наук, доцент Института Биомедицинских систем и биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого", г. Санкт-Петербург

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита состоится «17» апреля 2024 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.235.01, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: www.vir.nw.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор сельскохозяйственных
наук

Новикова Любовь
Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Картофелеводство относится к числу ведущих отраслей мирового и российского агропроизводства (FAO, 2020). Средние ежегодные потери урожая картофеля составляют около 17% валового сбора (Savary et al., 2019), а основными причинами этих потерь считают различные заболевания. Ключевым фактором, обеспечивающим устойчивое и стабильное функционирование производства картофеля, являются высокоурожайные, устойчивые к болезням и вредителям сорта, качество продукции которых соответствует требованиям потребителей (Tiwary et al., 2022). Для создания таких сортов требуется интрогрессия генов устойчивости (*R*-гены). Прimitивные культурные виды (ПКВ) картофеля относятся к первичному генофонду, представители которого легко скрещиваются с *S. tuberosum* L. Многие исследователи отмечали чрезвычайное разнообразие ПКВ картофеля, и выделяли генотипы, устойчивые к различным заболеваниям (Горбатенко, 2006; Gabriel, 2013; Hawkes, Hjerding, 1989). Кроме того, являясь приближенными к ранним доместцированным формам картофеля, виды *S. stenotomum* Juz. et Buk. и *S. phureja* Juz. et Buk. представляют собой промежуточное звено между диким картофелем и *S. tuberosum*. И исследования особенностей полиморфизма генов, отвечающих за такие ключевые признаки, как устойчивость к болезням, может внести новый вклад в знание и понимание эволюционных процессов, лежащих в основе введения растений в культуру, и совместного действия искусственного и естественного отборов.

Степень разработанности темы исследований. Геном удвоенного моноплоида *S. phureja* DM1-3 секвенирован в 2011 году (PGSC, 2011) и долгое время являлся единственной полной сборкой генома картофеля. В геноме DM1-3 был произведён поиск *NLR*-генов (семейство, к которому относятся многие из известных *R*-генов) и сравнение выявленных последовательностей с известными генами устойчивости (Lozano et al., 2012; Jure et al., 2012). Также в синтезированном *de novo* геноме *S. goniocalyx* Juz. et Buk. ранее произведен поиск гомологов *R*-генов картофеля (Liu, 2020). В обеих работах использовались лишь единичные образцы двух культурных видов картофеля и не исследовался полиморфизм

между образцами ПКВ картофеля. Уже секвенированы множество геномов, как диких, так и культурных видов картофеля, но их анализ находится на уровне поиска общих закономерностей, и анализ полиморфизма конкретных генов, по сведениям автора, пока не проведён (Bao et al., 2022; Hoopes et al., 2022; Kyriakidou et al., 2020).

Среди образцов ПКВ картофеля проводился поиск отдельных генов и локусов, связанных с устойчивостью к болезням. У *S. phureja* выявлен ген устойчивости к фитофторозу *Rpi-phu1* (Sliwka et al., 2010). Его расположение в геноме и связь со сцепленными маркерами позволили предположить, что он гомологичен гену *Rpi-vnt1*, но функциональный вариант у ПКВ картофеля не был секвенирован (Foster et al., 2009; Pel, 2009). Также ранее были найдены гены, ассоциированные с устойчивостью к фитофторозу, – *StTL15A* и *StGP28*, вирусам X – *Nxphu* и Y – *Ry(o)phu* (Alvarez et al., 2017; Tommiska et al., 1998; Torrance et al., 2020). В целом, группа ПКВ картофеля недостаточно охарактеризована по генам устойчивости к возбудителям болезней. За исключением вышеперечисленных работ по изучению общего разнообразия и эволюции картофеля (Li et al., 2018; Tang et al., 2022) данное исследование одно из первых, изучающих генетический полиморфизм этой группы культурных родичей картофеля.

Цель исследования – поиск и характеристика гомологов *R*-генов у примитивных культурных видов картофеля.

Задачи.

1. Провести фенотипическую оценку образцов ПКВ картофеля и выявить устойчивые к фитофторозу и золотистой картофельной нематоды (ЗКН) – потенциальные источники *R*-генов.
2. *In silico* поиск и анализ гомологов *R*-генов в данных полногеномного секвенирования из открытых источников.
3. Оценка ПКВ картофеля из коллекции ВИР по наличию маркеров генов устойчивости к фитофторозу и ЗКН и характеристика полиморфизма выявленных последовательностей.
4. Создание и изучение гибридных популяций ПКВ картофеля от скрещивания родительских форм с контрастными фенотипами.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на использовании традиционных и современных подходов биологического исследования, анализе теории и новых разработок, используемых в современной науке. Используются следующие методы: сравнительно-морфологическое описание растений, фитопатологическое исследование, гибридологический анализ, молекулярно-генетические методы (маркерный анализ методом ПЦР, секвенирование по Сэнгеру), аналитический (стандартные методы *in silico* анализа полногеномных данных секвенирования и статистического анализа).

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка образцов ПКВ картофеля (*S. × ajanhuiri* Juz. et Buk., *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*) из клоновой коллекции ВИР по морфологическим, фитопатологическим, хозяйственно-ценным и молекулярно-генетическим признакам. Впервые проведено секвенирование и охарактеризован полиморфизм нуклеотидных последовательностей маркерных фрагментов генов устойчивости к фитофторозу (*Rpi-vnt1*, *RB/Rpi-blb1*) и ЗКН (*Gro1-4*). Выявлена связь одного из аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1* с устойчивостью к фитофторозу у образца *S. stenotomum* к-11020–283. Проведен *in silico* поиск и анализ *R*-генов у ПКВ картофеля и впервые установлено наличие гомологов кодирующих последовательностей генов устойчивости к фитофторозу (*Rpi-R3b*, *Rpi-ber1*), вертициллёзному увяданию (*Ve1*, *Ve2*), цистообразующим нематодам (*Gro1-4*, *Gpa2*) и вирусу X (*Rx1*) у ПКВ картофеля. Впервые показана неравномерность частот замен в нуклеотидных последовательностях различных *R*-генов.

Теоретическая и практическая значимость. Выявлены образцы клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР устойчивые к фитофторозу – 14 генотипов и ЗКН – 8 генотипов. Выделены образцы потенциально интересные для генетического анализа других признаков: многоклубнёвость, окраска мякоти клубня, стабильность урожая. Выявлена потенциальная перспективность использования ПКВ в качестве источников гена устойчивости к вертициллёзному увяданию *Ve1*.

Для ПКВ картофеля показаны отличия в характере полиморфизма нуклеотидных последовательностей гомологичных

R-генам, референсные последовательности которых секвенированы у различных видов. Так, в генах из культурного картофеля количество общих для всех образцов ПКВ замен (SNP) значительно меньше, по сравнению с генами из североамериканских диких видов. Для ПКВ картофеля подтверждена неравномерная скорость аминокислотных (а.к.) замен в разных доменах NLR. По сравнению с другими доменами а.к. замены в LRR-доме происходят существенно чаще.

Полученные нами данные о непропорционально большом числе замен в стартовой области гена, опубликованные сведения о гомологах этого гена у других видов картофеля, и схожесть другого участка с консенсусной последовательностью Козак для двудольных являются основой для предположения об иной локализации старт-кодона гена *Rpi-vnt1* у ПКВ картофеля, по сравнению с референсной последовательностью.

В коллекции ВИР выявлено несколько аллельных вариантов маркерных фрагментов гена *Rpi-vnt1* и показано, что устойчивость у *S. stenotomum* к-11020-283 коррелирует с конкретным аллельным вариантом этого гена. Разработаны CAPS-маркеры для скрининга популяции от внутривидового скрещивания *S. stenotomum* к-11020-283 × *S. stenotomum* к-9301-276 на предмет наличия аллельного варианта *Rpi-vnt1*, ассоциированного с устойчивостью.

Положения, выносимые на защиту.

1. Клоновая коллекция ПКВ картофеля ВИР характеризуется фенотипическим разнообразием (по морфологическим признакам и устойчивости к различным заболеваниям картофеля), а также высоким уровнем скрытого разнообразия, проявляющегося в генеративном потомстве.

2. Среди ПКВ картофеля выделены образцы – источники устойчивости к фитофторозу и золотистой картофельной нематоде.

3. У ПКВ картофеля обнаружены гомологи белок-кодирующих последовательностей *Rpi*-генов, а также генов *Gpa2*, *Rx*, *Ve1* и *Ve2*.

4. Характер полиморфизма *R*-генов у ПКВ картофеля зависит от филогенетической удалённости вида-источника референсного гена от культурного картофеля.

5. 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-11020-283.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием классических и современных методик и высокотехнологичного оборудования и подтверждается их воспроизводимостью в ходе эксперимента и статистической обработкой данных. Интерпретация данных, научные положения и выводы подкреплены иллюстративным материалом, таблицами и рисунками. Результаты исследования опубликованы в международных и отечественных изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК).

Результаты диссертационного исследования представлены на международных конференциях: V Вавиловская международная конференция, Санкт-Петербург, 2022; Международная конференция «125 лет прикладной ботаники в России», Санкт-Петербург, 2019; VI и VII Международные Научные Конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология Растений» PlantGen 2021 Новосибирск и PlantGen 2023 Казань; Международная научно-практическая конференция «Состояние, проблемы и перспективы развития отраслей картофелеводства, плодовоовощеводства и бахчеводства» Алматы, 2021.

Публикации. Результаты исследования опубликованы в четырех статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Оценка образцов коллекции картофеля на устойчивость к фитофторозу и золотистой картофельной нематоде выполнена совместно с д.б.н. Н.В. Мироненко и к.б.н. А.В. Хютти в лаборатории естественного иммунитета растений (рук. академик РАН О.С. Афанасенко) Всероссийского института защиты растений (ВИЗР). Клонирование ампликонов и разработка CAPS-маркеров выполнены совместно с к.б.н. Н.В. Алпатьевой старшим научным сотрудником отдела генетики ВИР. Секвенирование маркерных фрагментов R-генов выполнено в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ в соответствии с планом гранта РФФИ №22–26–00111. Результаты совместных исследований отражены в общих публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах. Состоит из введения, основной части, содержащей 12 таблиц и 28 иллюстраций, заключения, списка литературы (включает 258 наименований из них 238 на иностранном языке) и четырёх приложений.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов:

РФФИ №20-516-10001 КО_а. Изучение генов устойчивости картофеля к фитофторозу и их роли в формировании разнообразия эффекторов у патогена.

РНФ №22-26-00111 Гены устойчивости картофеля к фитофторозу в контексте эволюции культурных и диких клубненосных видов *Solanum* L.

РНФ №21-76-10050 Роль изоформ фактора инициации трансляции *eIF4E* в восприимчивости картофеля к вирусу Y

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературе приведены сведения о ботанических и генетических особенностях ПКВ картофеля. Описаны экономически значимые заболевания картофеля и способы борьбы с ними, гены, участвующие в обеспечении устойчивости культурных и диких видов картофеля к заболеваниям. Также затронуты основные направления и вехи исследований генетики картофеля. Основное внимание уделено современным представлениям о действии иммунитета и проявлении устойчивости растений, о белках, осуществляющих распознавание патогенов на разных уровнях, их структуре и функциях.

Глава 2. Материалы исследования

Материалами послужили образцы ПКВ картофеля из клоновой коллекции ВИР, а также данные опубликованные в NCBI из проектов PRJNA394943 (Li et al., 2019) и PRJNA754534 (Tang et al., 2022) (Таблица 1).

Для гибридологического анализа выполнено 13 комбинаций внутри и межвидовых скрещиваний, из них 9 результативных. Исследованы гибриды двух популяций от внутривидового скрещивания (*S. stenotomum* и *S. × ajanhuiri*) и одной популяции от контролируемого самоопыления (*S. × ajanhuiri*).

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

Вид	Число образцов (генотипов) коллекции ВИР*			<i>in silico</i> анализ R-генов (SRA/сборки геномов)
	бот. описание	лаб. оценка уст. к фитофторозу и ЗКН	молекулярно-генетический анализ	
<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 всех образцов, оцененных на устойчивость в лабораторных опытах, выполнено ботаническое описание и молекулярно-генетический анализ

Глава 3. Методы исследования

В 2020 г. выполнено **ботаническое описание** ПКВ картофеля по 65 дескрипторам. Описание надземных органов растений выполнено в фазе G1 (первый генеративный период развития), клубней — при сборе урожая. Ежегодно в 2020-2022 гг. проводился учет продуктивности растений клоновой коллекции (2-4 повторность) и **полевой устойчивости** к различным заболеваниям согласно методическим рекомендациям ВИР (Киру и др., 2010).

Оценка **по устойчивости к возбудителю фитофтороза листьев** проведена на естественном инфекционном фоне и при искусственном заражении в лаборатории естественного иммунитета растений ВИЗР. Лабораторная оценка устойчивости к фитофторозу проведена по стандартной методике (Brylinska, Sliwka, 2017) с использованием изолята МР1841, содержащего все 11 генов вирулентности (1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11). Контроль - сорт Невский к-10736 (восприимчивый) и сорт Сударыня к-12206 (устойчивый).

Оценка **по устойчивости к золотистой картофельной нематоде** (ЗКН) проведена в лаборатории естественного

иммунитета растений ВИЗР по общепринятой методике (Яковлева, Долягин, 1993) с небольшими модификациями (Хютти и др., 2020). Контроль - сорт Невский к-10736 (восприимчивый), сорт Red Scarlett к-12096 (устойчивый).

Диагностика **мозаичных вирусов** (ХВК, УВК, SBK, MBK) проведена методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay).

Молекулярно-генетический анализ. ДНК выделена с использованием модифицированной методики ЦТАБ (Gavrilenko et al., 2014). Скрининг на наличие маркеров генов устойчивости к фитофторозу: *R2-like*, *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-vnt1* и ЗКН: *H1* и *Gro1-4* проведен согласно рекомендациям авторов (Shultz et al., 2012; Milzarek et al., 2011; Gebhardt et al., 2006; Wang et al., 2008; Lenman et al., 2016; Haesart et al., 2015; Pel, 2009). Для маркеров, разработанных и модифицированных автором, условия подбирали экспериментально. Клонирование осуществляли по методике ВИР (Алпатьева и др., 2019). Секвенирование проведено на приборе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Для **разработки CAPS-маркеров** на основании секвенированных последовательностей маркерных фрагментов *Rpi-vnt1.3-611* и *Vnt-tail-897* определены рестриктазы, сайты рестрикции которых отличались у выявленных для родительских форм аллелей. Реакция выполнялась в соответствии с рекомендациями производителя (SibEnzyme).

In silico анализ проведен по-обычному для такой задачи алгоритму. Для **SRA-данных** алгоритм включал фильтрацию данных Trimmomatic 0.39 (Bolger et al., 2014); выравнивание на референсные прочтения bowtie2 v2.3.5.1 (Langmead, Salzberg, 2012); фильтрование плохо выравненных прочтений samtools 1.10 и bedtools 2.30.0 (Quinlan, Hall, 2010); поиск вариантов VarScan 2.4.4. (Koboldt et al., 2009). **В сборках геномов** ПКВ картофеля поиск гомологов *R*-генов осуществлен с использованием локального алгоритма BLAST 2.5.0+ (Ladunga et al., 2017). На следующем этапе проведено локальное выравнивание с использованием алгоритма Clustal W (Kumar et al., 2018) и получены предполагаемые а.к. последовательности. Сохранность доменной организации исследована при помощи InterPro (Paysan-Lafosse et al., 2023).

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

Глава 4. Результаты и обсуждение

Морфологическое разнообразие ПКВ картофеля

В 2019-2020 гг. выполнены ботанические описания растений клоновой коллекции и выделены 84 клон ПКВ картофеля, соответствующие видовым описаниям, без ярко выраженных признаков вирусных инфекций. Анализ данных о продуктивности растений и морфологических признаках клубней позволил выявить генотипы интересные для изучения по другим направлениям, таким как многоклубнёвость, окраска мякоти, стабильность продуктивности.

В популяциях внутривидовых гибридов обнаружено высокое разнообразие по морфологическим признакам. Получены формы, значительно отличающиеся от родительских по многим признакам. Это особенно характерно для потомства от самоопыления *S. × ajanhuiri* и отражает высокое скрытое разнообразие, способное проявиться при генеративном размножении в последующих поколениях.

Иммунологическая характеристика ПКВ картофеля

Проведена оценка (полевая и лабораторная) ПКВ картофеля по устойчивости к фитофторозу, ЗКН, мозаичным вирусам картофеля (X, Y, S и M) и альтернариозу.

По результатам лабораторного заражения 64 генотипов ПКВ картофеля выделено 14 генотипов с различной степенью устойчивости (MR или R) к фитофторозу: *S. goniocalyx* (MR), *S. × ajanhuiri* (MR, R), *S. stenotomum* (3MR, 1R) и *S. phureja* (5MR, 2R). Выделены устойчивые к ЗКН генотипы: *S. goniocalyx* (R), *S. phureja* (4MR, 3R) и 10 гипертравосприимчивых (HS) генотипов.

Иммуноферментный анализ выявил различия в поражении вирусами представителей разных групп генофонда – сортов, гибридов, культурных и диких видов картофеля (рисунок 1). Так, по сравнению с дикими видами, культурный картофель значительно реже поражается ХВК. У ПКВ картофеля вирус X обнаружен только в составе смешанной инфекции. Возможно, что у культурного картофеля есть механизм, обеспечивающий

устойчивость к вирусу X. Факторами устойчивости могут быть, как гомологи гена *Rx1* (источник *S. andigenum*), так и другие гены.

Поражение вирусами Y и M выявлено у представителей различных групп культурного картофеля (ПКВ, межвидовые гибриды, сорта).

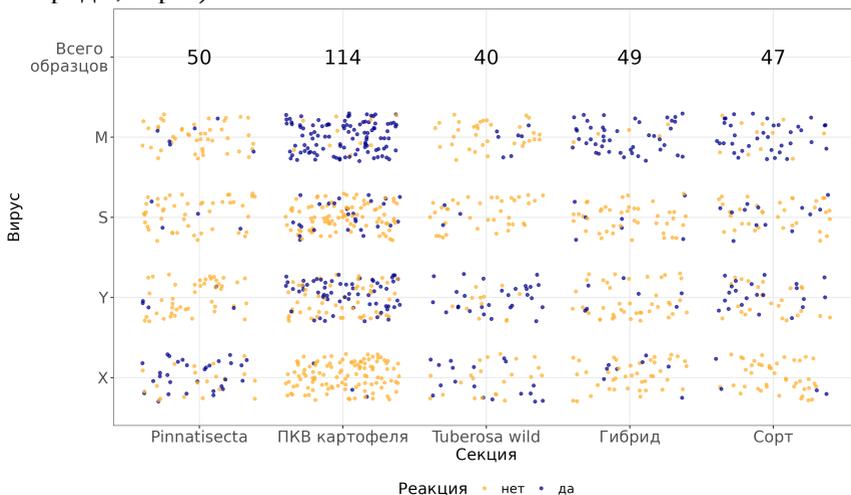


Рисунок 1 – Вирусные инфекции, обнаруженные у разных генотипов картофеля в коллекции ВИР.

In silico анализ полиморфизма R-генов у ПКВ картофеля

Для ПКВ картофеля (сырых данных полногеномного секвенирования (SRA) и сборках генома) проведён поиск гомологичных последовательностей 26 R-генов. Кодировующие последовательности (cds) всех исследованных генов обнаружены со степенью сходства не менее 80%. Гомологи генов *Ve1*, *Ve2*, *R3b*, *Rpi-ber1*, *Gro1-4*, *Gpa2*, *Rx1* проанализированы и обнаружены у ПКВ картофеля впервые. Некодирующие последовательности генов (UTR, интроны) имели более сильные отличия от референсных.

Анализ полиморфизма выполнен для 15 R-генов. Распределение встречаемости сайтов полиморфизма соответствует представлениям о ПКВ картофеля, как о группе близкородственных видов. При анализе SRA-данных в cds выявлено более 2000 сайтов полиморфизма, большинство из которых являлись SNP (однонуклеотидным полиморфизмом).

Более 25% SNP были общими для всех изученных образцов ПКВ картофеля (Рисунок 2), что хорошо согласуется с другими исследованиями (Li et al., 2018; Tang et al., 2022; Hardigan et al., 2017; Spooner et al., 2014). Однако это значение неравномерно распределено между генами: в генах из североамериканских диких видов картофеля больше общих для всех образцов ПКВ картофеля SNP. Для генов, изначально клонированных у культурного картофеля, более характерны SNP, найденные в одном или небольшом количестве образцов.

Кроме SNP, для каждого гена, хотя бы в одном из паралогов, (многие гены представлены в геноме многочисленными копиями) выявлены инсерции и делеции, но наиболее характерны инделы для генов *Rpi-amr3* и *R1*.

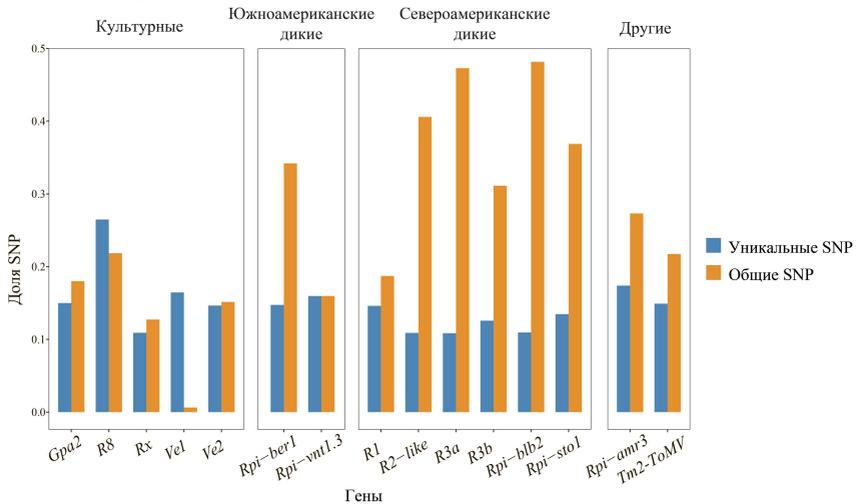


Рисунок 2 – Встречаемость SNP в гомологах *R*-генов среди образцов ПКВ картофеля (по SRA-данным). Доля общих SNP значительно отличается в группах *R*-генов из североамериканских диких видов и из культурных видов картофеля ($p\text{-val} = 0.025$).

В сборках ПКВ картофеля (без учета DM1-3) у гомологов всех *R*-генов, обнаружены копии, потенциально способные производить белки (в а.к. последовательностях нет преждевременных стоп-кодона). Степень сходства с референсными а.к. последовательностями составляет 72–100%

(рисунок 3А). Уровень сходства различается в зависимости от происхождения вида-источника референсного гена. Самый высокий уровень сходства с референсными последовательностями у ПКВ картофеля выявлен для а.к. последовательностей Ve1 и Ve2 (устойчивость к вертициллезному увяданию), относящихся к семейству RLP/RLK. В связи с отсутствием замещенных а.к. в последовательности Ve1, можно предположить, что среди ПКВ картофеля есть устойчивые к вертициллезному увяданию формы. При анализе белков семейства CNL самый высокий уровень сходства (около 92%) выявлен у а.к. последовательностей, кодируемых генами из южноамериканских видов картофеля *Rpi-vnt1.3* и *Rpi-ber1*. В то время как, уровень сходства а.к. последовательностей (*Gra2*, *Rx1* и *Rpi-R8*), кодируемых генами из культурного картофеля, с референсными последовательностями составляет 85-90%.

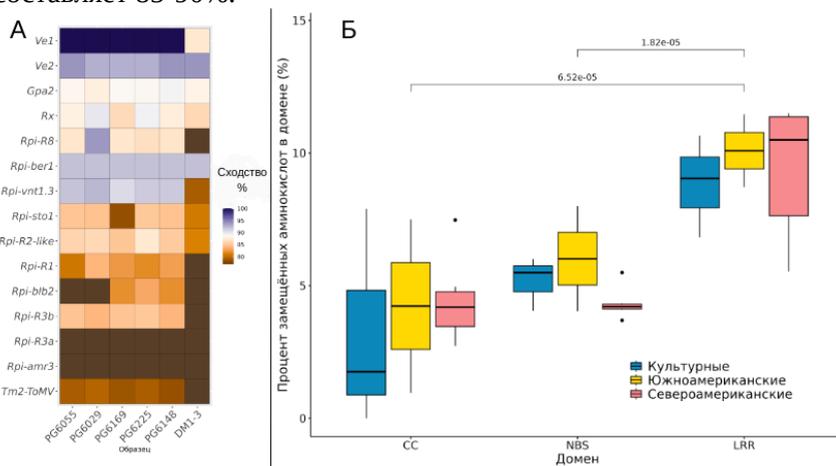


Рисунок 3 – А – Тепловая карта сходства а.к. последовательностей, кодируемых R-генами у ПКВ картофеля с референсными. Б – Сравнение доли а.к. замен в разных доменах CNL.

Уровень сходства а.к. последовательностей, кодируемых генами из североамериканских диких видов картофеля (*Rpi-R2-like*, *Rpi-sto1*, *Rpi-R1* и *Rpi-R3b*), варьирует от 80 до 85%. Для всех генов их этой группы, кроме *R1*, ранее показана распространённость маркерных фрагментов генов среди представителей различных серий дикого и культурного картофеля (Rogozina et al., 2023). Более

низкая степень сходства с референсной последовательностью характеризует а.к. последовательности Rpi-R3a и Rpi-amr3, показатели которой варьируют около значения 75% (рисунок 3А).

Выполненный при помощи InterPro, функциональный анализ а.к. последовательностей показал, что нет изменений в доменной организации белков, кодируемых гомологами CNL-генов у ПКВ картофеля. На рисунке 3Б показано распределение а.к. замен по доменам CNL. Показано, что процент замещённых а.к. значительно варьирует в зависимости от домена: значимо большая доля замещённых а.к. (около 9%) приходится на LRR-домен ($p\text{-val} = 0.0001714$). Частоты а.к. замен в образцах ПКВ картофеля также не равномерно распределены по доменам: общие для всех образцов ПКВ картофеля замены характерны для NBS-домена, а в LRR-доме общие и найденные в небольших группах образцов а.к. замены распределены более равномерно.

Полиморфизм R-генов у образцов из коллекции ВИР.

Скрининг коллекции на наличие маркеров известных генов устойчивости к фитофторозу (*R2-like*, *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-blb2* и *Rpi-vnt1.3*) и ЗКН (*H1*, *Gro1-4*) первоначально не выявил ассоциаций устойчивость-маркер. Маркер гена *R2-like* отсутствовал, *Rpi-blb2* был найден лишь в четырёх образцах, различных по устойчивости, два маркера гена *RB/Rpi-blb1* имели отличия в частоте их обнаружения среди ПКВ картофеля, *Rpi-vnt1.3* обнаружен у многих образцов, как устойчивых, так и восприимчивых. Было принято решение проанализировать последовательности маркерных фрагментов генов *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-vnt1* и *Gro1-4* у генотипов контрастных по устойчивости.

Полиморфизм последовательности гена *RB/Rpi-blb1*

В образцах ПКВ картофеля ВИР обнаружен довольно большой паттерн общих изменений относительно референсной последовательности гена *RB/Rpi-blb1*. Это хорошо согласуется с данными полученными *in silico* – 34,15% SNP в этом гене найдены у всех изученных образцов. Большинство более крупных изменений характеризовали отдельные паралоги, присутствующие во всех сборках. В маркерном фрагменте Rpi-sto1-890 мы выявили сайт (двухнуклеотидная инсерция), явно препятствующий нормальному функционированию гена у образца *S. goniocalyx* к-9922 (MR) и у одного из аллельных вариантов *S. × ajanhuiri* к-9911-

139 (S). Между сборками геномов ПКВ картофеля также наблюдаются существенные отличия в степени сходства с а.к. последовательностью референсного гена *Rpi-sto1*. Всё это говорит о существовании полиморфизма среди ПКВ картофеля, который, однако, связать с признаком устойчивости к фитофторозу не удалось. Этот ген, скорее всего, не отвечает за устойчивость образца к-9911 *S. × ajanhuiri* (так как в его LRR-домене обнаружены делеции приводящие к сдвигу рамки считывания), но судить о его участии в формировании признака у других образцов преждевременно.

Полиморфизм последовательности гена *Rpi-vnt1*

Первоначально при исследовании последовательностей маркерного фрагмента (*Rpi-vnt-612*) у образцов из коллекции ВИР было выявлено несколько вариантов последовательности (рисунок 4) (Гурина и др., 2022). Различия с референсным геномом на этом участке составляют от 5 до 13%. У исследованных восприимчивых образцов *S. goniocalyx* (к-3558) и *S. stenotomum* (к-9301) представлен вариант (*a1*), содержащий 28 SNP и пятинуклеотидную делецию, которая может привести к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Впоследствии оказалось, что у одного из восприимчивых генотипов *S. × ajanhuiri* к-9911-139 этой делеции нет, но есть другие изменения. Среди устойчивых генотипов распространён вариант с девятинуклеотидной инсерцией и 52 SNP (*A3*). Еще один из вариантов (*a2*) обнаружен только в устойчивом *S. stenotomum* к-11020, он не содержит инсерций и делеций, но отличается от референсной аллели по 21 позиции (SNP).

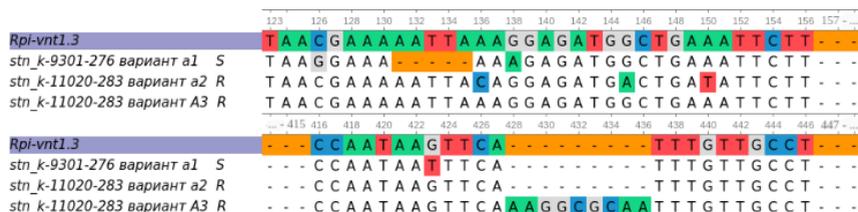


Рисунок 4 – Выравнивание различных аллельных вариантов нуклеотидной последовательности образцов ПКВ картофеля из коллекции ВИР на маркерный фрагмент гена *Rpi-vnt1.3*

При *in silico* анализе гомологов *Rpi-vnt1.3* в сборках геномов

ПКВ картофеля обнаружено, что начальный участок последовательности (соответствующий участку до 141 п.н. у *Rpi-vnt1.3*) имеет более сильные отличия, по сравнению с кодирующими последовательностями всех исследованных *R*-генов. Поскольку у некоторых гомологов этого гена (*Tm2²*) этот участок не является кодирующим, возможно, что и у гомологов гена *Rpi-vnt1* у ПКВ картофеля стартовый кодон расположен позже. Более того, в сборках генома ПКВ картофеля для большинства копий характерно наличие в этой области делеций и инсерций, приводящих к сдвигу рамки считывания. В то же время, если началом белок-кодирующей последовательности считать 142 нуклеотид, где у гена *Rpi-vnt1* также есть АТГ (стартовый кодон), большинство копий оказываются потенциально функциональными.

Дополнительным свидетельством в пользу более позднего начала кодирующей последовательности гена является тот факт, что в работе М. Пела (M. Pel) укороченная версия гена *Rpi-vnt1* также была функциональной (Pel., 2009), хотя устойчивость проявлялась только при применении методов, связанных со сверхэкспрессией данного участка. Мы предполагаем, что эта часть гена, может служить для привлечения или, напротив, блокирования факторов инициации трансляции. То есть обеспечивать дополнительный механизм тонкой регуляции действия *NLR*-гена, которая необходима для обеспечения нормального функционирования и эволюции иммунитета растений в ряду поколений (Borelli, 2018).

Таблица 2 – Сравнение участков, соответствующих окружению первого и второго (142 пн относительно первого) возможных старт-кодонов в гене *Rpi-vnt1*, с последовательностью Козак для двудольных (Joshi et al., 1997; Gupta et al., 2016).

Позиция	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6
Консенсусная н.п. Козак	a	a	A	A/C	a	A	U	G	G	C	u
1-й стартовый кодон	A	A	A	A	G	A	U	G	A	A	U
2-й стартовый кодон	A	G	G	A	G	A	U	G	G	C	U

Еще одним, хоть и не решающим фактором, в пользу укороченного варианта гена является более точное соответствие окружения второго стартового кодона фрагменту Козак,

характерному для двудольных, а точнее, наличию гуанина и цитозина в +4 и +5 позициях, соответственно (таблица 2). Позиция +4, согласно литературным данным, считается одной из самых важных и сохраняется в консенсусе окружения старт-кодона всех эукариот (Joshi et al., 1997).

Таким образом, в коллекции ПКВ картофеля ВИР обнаружено несколько вариантов гена *Rpi-vnt1.3*, маркерные фрагменты отличаются друг от друга и от последовательности референсного гена как SNP, так и более крупными изменениями–инделами. Некоторые отличия приводят к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона, что явно свидетельствует о нефункциональности гена, но у других образцов, в том числе восприимчивых, таких изменений нет. Различия между образцами позволили разработать серию CAPS-маркеров, позволяющих отличить варианты друг от друга.

Полиморфизм последовательности гена *Gro1-4*

При *in silico* анализе последовательностей, гомологичных гену *Gro1-4*, у ПКВ картофеля выявлены значительные отличия длины первого интрона (Вместо 5463 – от 386 до 4367 нуклеотидов в разных паралогах). Однако, если принимать во внимание только кодирующие участки последовательности, то во всех геномах обнаружены последовательности, потенциально способные производить белок, гомологичный *Gro1-4* (согласно его экзонной структуре). Тем не менее без дополнительных исследований невозможно судить о том, как такое изменение длины первого интрона способно повлиять на протекание сплайсинга и итоговую последовательность мРНК.

У образцов из коллекции ВИР найдены SNP и трёхнуклеотидная делеция в последовательности маркерного фрагмента гена *Gro1-4*. Большинство обнаруженных изменений характеризовали все исследованные образцы, но по ряду сайтов был обнаружен полиморфизм между генотипами ПКВ картофеля. Тем не менее не было обнаружено изменений, ассоциированных с устойчивостью к ЗКН, как и вариантов, явно препятствующих функциональности гена.

Создание и анализ гибридных популяций от скрещивания родительских форм с контрастными фенотипами

Гибриды двух популяций от внутривидового скрещивания (S.

stenotomum и *S. × ajanhuiri*) и популяции от контролируемого самоопыления (*S. × ajanhuiri*). охарактеризованы по устойчивости к фитофторозу в полевых условиях в течение двух лет. Молекулярно-генетический анализ проведен для гибридов (*S. stenotomum* к-9301-276 × к-11020-283) и их родительских форм.

Разработка CAPS-маркеров для внутривидовых гибридов *S. stenotomum*

От маркерного фрагмента *Rpi-vnt1.3-612* гена *Rpi-vnt1*, вариант, обнаруженный у восприимчивой родительской формы - клона к-9301–276 (*a1*), отличается наличием пятинуклеотидной делеции и 28 SNP (рисунок 4). У устойчивого родителя – клона к-11020-283 выявлено два варианта: один из них (*a2*) не содержит инсерций и делеций, и наиболее близок к последовательности референсного гена, отличаясь только 21 SNP. Другой (*A3*) содержит девятинуклеотидную инсерцию и 52 SNP (рисунок 4).

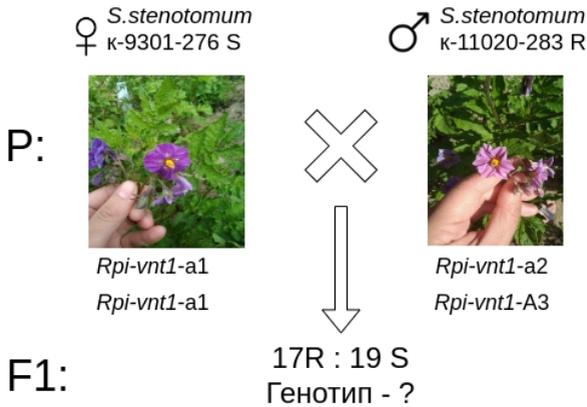


Рисунок 5 – Схема скрещивания при создании популяции внутривидовых гибридов *S. stenotomum*

Результаты секвенирования не позволяют установить являются ли индели критичными для эффективности аллелей, или роль играют какие-либо из многочисленных SNP. Наличие связи между устойчивостью и присутствием какой-то из аллелей (*a2* или *A3*) можно установить только по результатам гибридологического анализа (рисунок 5). В исследованной нами популяции было получено расщепление по полевой устойчивости к фитофторозу близкое к 1:1 (17R: 19S).

Нами разработаны CAPS-маркеры на два участка гена *Rpi-vnt1*, различающие аллели родительских форм. Всего использовано четыре CAPS-маркера (по два на каждый из маркерных фрагментов: Rpi-vnt1.3-612 и Vnt-tail-897), применение которых позволяет идентифицировать аллели родительской формы *S. stenotomum* к-11020-283 в гибридах. Отмечено, что один из вариантов (A3 на рисунке 4) чаще встречался у устойчивых генотипов и при проверке данной гипотезы при помощи χ^2 , данное предположение подтвердилось (таблица 3).

Таблица 3 – Таблица сопряженности устойчивость/генотип по CAPS-маркерам у гибридов *S. stenotomum* к-9301-276 × к-11020-283

* $\chi^2 = 9,63$ ($p < 0.05$)**	Фенотип (полевая устойчивость)		
	Генотип (CAPS-маркер)	устойчив	восприимчив
a1A3	15	6	21
a1a2	2	13	15
Всего	17	19	36

Примечание: * χ^2 подсчитывался исходя из ожидаемого распределения 1:1:1:1

** показано значение χ^2 с учетом поправки Йейтса

Выявленная связь не исключает, что устойчивость обеспечивается не этим геном, а находящимся в непосредственной близости от него. Однако, ввиду кластерной организации генов семейства *NLR*, к которому относится в том числе *Rpi-vnt1*, с большой долей вероятности можно утверждать, что один из паралогов именно этого гена обеспечивает распознавание фитофтороза у *S. stenotomum* к-11020-283.

Проверка CAPS-маркеров на расширенной выборке - 26 генотипов ПКВ картофеля из клоновой коллекции ВИР, охарактеризованных по устойчивости к фитофторозу, не дала результатов. Вопрос о частоте кандидатной аллели (A3) среди ПКВ картофеля остаётся открытым и требует дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования проведена комплексная оценка образцов клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР, включающая фенотипирование по морфологическим признакам,

продуктивности, устойчивости к фитофторозу и ЗКН, маркерный анализ и секвенирование фрагментов *R*-генов. *In silico* проведён поиск и анализ гомологов 26 известных *R*-генов в образцах ПКВ картофеля из открытых баз данных. Впервые показано наличие гомологов кодирующих последовательностей генов *Ve1*, *Ve2*, *R3b*, *Rpi-ber1*, *Gro1-4*, *Gpa2*, *Rx* у ПКВ картофеля. Проведён анализ образцов клоновой коллекции ПКВ картофеля ВИР на наличие маркеров генов устойчивости к фитофторозу и ЗКН и исследован полиморфизм последовательностей маркерных фрагментов генов *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-vnt1* и *Gro1-4*. Впервые охарактеризованы аллельные варианты гомологов *R*-генов у представителей ПКВ картофеля в коллекции ВИР и их отличия от референсных последовательностей этих генов. Выявлена связь одного из аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1* с устойчивостью к фитофторозу генотипа *S. stenotomum* к-11020-283.

Выводы

- Образцы ПКВ картофеля из коллекции ВИР характеризуются большим разнообразием, включающим высокое скрытое разнообразие по морфологическим и генетическим признакам.
- Выделены образцы ПКВ картофеля из коллекции ВИР — источники устойчивости к фитофторозу и ЗКН. Выявлена потенциальная возможность использования ПКВ картофеля в качестве источников устойчивости к вертициллёзному увяданию.
- В геномах ПКВ картофеля найдены последовательности, гомологичные белок-кодирующим последовательностям *R*-генов, включая клонированные у филогенетически далёких источников — образцов диких видов картофеля.
- Характер полиморфизма гомологов *R*-генов у ПКВ картофеля и их отличия от референсной последовательности гена зависят от филогенетической удалённости источника исследуемого гена от культурного картофеля. Частоты аминокислотных замен не зависят от происхождения источников референсных генов, но различны для определённых доменов белков CNL.
- В образцах ПКВ картофеля из коллекции ВИР идентифицировано несколько аллельных вариантов маркерных фрагментов гена *Rpi-vnt1*. Для образца к-11020 *S. stenotomum* показана связь одного из вариантов с устойчивостью.
- В образцах из коллекции ПКВ картофеля ВИР обнаружены

различные аллельные варианты маркерных фрагментов гена *RB/Rpi-blb1*. Но явной связи между вариантами и устойчивостью не обнаружено.

- У образцов видов *S. × ajanhuiri*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum* из коллекции ВИР выявлен полиморфизм маркерной последовательности гена *Gro1-4*. Связи каких-либо вариантов с устойчивостью ЗКН не обнаружено, но и вариантов, явно препятствующих работе гена также не выявлено.

- Разработаны CAPS-маркеры для скрининга популяции от внутривидового скрещивания *S. stenotomum* к-11020–283 × *S. stenotomum* к-9301–276 на предмет наличия аллельного варианта *Rpi-vnt1*, ассоциированного с устойчивостью.

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.; Drobayazina, 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>

4. Рогозина Е. В., **Гурина А. А.** Распространение мозаичных вирусов картофеля на видах секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. в коллекции ВИР. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2023;184(2):226-234. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-2-226-234>

5. **Гурина А. А.**, Ганчева М. С., Алпатьева Н. А., Рогозина Е. В. *In silico* поиск и анализ *R* генов у примитивных культурных видов картофеля. Вавиловский Журнал Генетики и селекции (в печати, принята к публикации 30.08.2023). 2024