

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, КОДИРУЮЩИХ NBS-ARC-ДОМЕН, У ГОМОЛОГОВ *Rx1* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ

© 2012 г. К. В. Борис^{1*}, Н. Н. Рыжова¹, Е. З. Кочиева^{1,2}

¹Центр “Биоинженерия” Российской академии наук, Москва, 117312

²Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

Поступила в редакцию 28.06.2011 г.

Принята к печати 16.08.2011 г.

Определены и охарактеризованы нуклеотидные последовательности генов-гомологов *Rx1*, кодирующие NBS-ARC-домен, у 10 культурных и дикорастущих видов картофеля с различной устойчивостью к X-вирусу картофеля. В изученных последовательностях выявлены индели, а также ряд нуклеотидных замен, в том числе приводящих к аминокислотным заменам в высококонсервативных участках домена. Не выявлено прямых ассоциаций обнаруженных мутационных изменений в консервативных мотивах NBS-ARC-домена с уровнем устойчивости изученных образцов к X-вирусу картофеля.

Ключевые слова: виды *Solanum*, гены устойчивости, однонуклеотидный полиморфизм, X-вирус картофеля.

NBS-ARC DOMAIN VARIABILITY OF *Rx1* HOMOLOGUES OF CULTIVATED POTATO AND RELATED WILD SPECIES, by K. V. Boris^{1*}, N. N. Ryzhova¹, E. Z. Kochieva^{1,2} (¹Centre “Bioengineering”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia; *e-mail: docboris@mail.ru ; ²Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia). In the present work NBS-ARC domain sequences of *Rx1* homologues of ten accessions of cultivated and wild potato species which differ in susceptibility to potato virus X were obtained and studied. Within the NBS-ARC domain different indels and nucleotide/amino acid substitutions, including substitutions in the conservative motives of the domain were detected. There were no direct associations between the mutational changes found in the conservative motives of the NBS-ARC domain and the susceptibility of the studied accessions to X virus.

Keywords: *Solanum* species, resistance genes, SNP polymorphism, potato virus X.

Гены *Rx* определяют устойчивость растений к X-вирусу картофеля (PVX), который может вызывать значительное снижение урожайности картофеля. Гены *Rx* относятся к семейству NBS-LRR генов резистентности растений (R-генов). У картофеля обнаружено два гена, отвечающих за устойчивость к PVX – *Rx1* и *Rx2* [1, 2], причем *Rx1* обеспечивает около 80% устойчивости. Ген *Rx1* находится на хромосоме XII картофеля и входит в состав протяженного кластера, включающего девять генов-гомологов [2, 3]. Нуклеотидная последовательность гена *Rx1* содержит ряд консервативных участков, соответствующих областям, кодирующим функциональные белковые домены [2]. Основным считается домен NBS-ARC, присутствующий во многих R-белках [4, 5]. Домен NBS (nucleotide binding site), как следует из его названия, это нуклеотид-связывающий домен. ARC-

домен подразделяют на два субдомена – ARC1 и ARC2, которые выполняют разные функции. Субдомен ARC1 участвует в белок-белковых взаимодействиях, он необходим для соединения N-концевой части белка с LRR-доменом *Rx1*. Субдомен ARC2 участвует в активации гена устойчивости в присутствии элиситора [6].

В свою очередь, внутри NBS-ARC-домена выделяют ряд специфических высококонсервативных областей, таких как мотивы киназы-1 (P-петля), киназы-2 (Walker B), киназы-3а (RNBS-B), GxP, RNBS-D, MHD [2, 6].

В домене NBS-ARC обнаружен ряд мутаций, вызывающих как потерю функций белка, так и его автоактивацию [7]. Наличие подобных мутаций указывает на важную роль этого домена в функционировании R-белка. Однако, каким образом происходит узнавание патогена или ини-

* Эл. почта: docboris@mail.ru

цируется передача сигнала, до сих пор неизвестно [8].

В представленной работе проведен анализ варибельности последовательностей, кодирующих NBS-ARC-домен, у гомологов *Rx* культурных и дикорастущих видов картофеля с различным уровнем устойчивости к PVX.

В настоящее время определены последовательности только двух генов *Rx1* (*Solanum tuberosum* (сорт Сага) и *S. acaule*), а также ряда гомологов *Rx1*, включая ген *Rx2* и *RGC* (Resistance Gene Candidate) [1–3, 9, 10]. На основе этих данных нами разработаны комбинации праймеров (F 5'-CA-GAAGATATGGTTGACTCGG-3' и R 5'-GAG-GAGGTAAGAGTAAAGTTGGAGGTG-3'), которые позволяют амплифицировать участки генов-гомологов *Rx*, включающие последовательности, кодирующие NBS-ARC-домен, у образцов 10 культурных и дикорастущих видов картофеля (табл. 1). Полученные продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) были клонированы, секвенированы и проанализированы в программе MEGA4 [11].

Длина выбранного для анализа фрагмента, включающего последовательность NBS-ARC-домена, составила от 710 до 1050 п.н.

В целом изучаемый фрагмент характеризовался достаточно высоким уровнем полиморфизма, что, по-видимому, связано с присутствием нескольких гомологов генов *Rx* в геноме картофеля.

В амплифицированных фрагментах выявлен ряд точковых замен (SNP), 17 из которых локализованы в области консервативных, функционально значимых мотивов.

Ранее была показана инвариантность ряда аминокислотных позиций в белках NBS-LRR, например, остатка гистидина в MHD-мотиве [12]. В связи с этим особый интерес представляют нуклеотидные замены в области, кодирующей NBS-ARC-домен, которые приводят к изменению аминокислотного остатка в молекуле белка. Всего в высококонсервативных мотивах выявлено 12 аминокислотных замен (табл. 2), которые потенциально могут изменить функции белка.

В результате сравнительного анализа показано, что уровень полиморфизма ARC-домена выше, чем NBS-домена (15.2 и 11.5% соответственно). По-видимому, это связано с большей значимостью NBS для правильного функционирования R-белка, что подтверждается выявлением множества мутаций, приводящих к потере функции [4]. Так, например, в мотивах Р-петли и киназы-2, которые являются наиболее консервативными, не найдено аминокислотных замен.

Следует отметить, что не обнаружено прямой корреляции между аминокислотными заменами в консервативных мотивах домена NBS-ARC и уровнем устойчивости изучаемых образцов к PVX.

Таблица 1. Устойчивость анализируемых образцов к X-вирусу картофеля

Вид	Устойчивость к X-вирусу картофеля	Число клонов
<i>S. tuberosum</i> сорт Пушкинский	IS	4
<i>S. acaule</i>	I	1
<i>S. chacoense</i>	IS	2
<i>S. leptophyes</i>	VS	1
<i>S. marinasense</i>	—	2
<i>S. microdontum</i>	VS	2
<i>S. sparsipilum</i>	—	1
<i>S. berthaultii</i>	—	1
<i>S. okadae</i>	I	1
<i>S. brevicaule</i>	VS	1

Примечание. I — устойчивый к X-вирусу картофеля образец; IS — средне восприимчивый образец; VS — сильно восприимчивый образец.

Однако интерес представляли также аминокислотные замены вне консервативных мотивов домена NBS-ARC. Так, например, в NBS-домене R-белка образца *S. microdontum*, высокочувствительного к PVX, последовательность SerLeuThr (TCT TTG ACA) заменена на ProSerIle (CCT TCG ATA), что может быть одной из возможных причин отсутствия устойчивости к PVX у данного образца. Подобные замены обнаружены и в NBS-домене образца *S. marinasense* — SerLeuThr/ProSerArg (CCT TCG AGA), который содержит также характерную для *Rx2* несинонимичную замену Lys/Asn и уникальную несинонимичную замену Pro/His. Благодаря сходству последовательностей NBS-доменов *S. microdontum* и *S. marinasense*, можно предположить, что образец *S. marinasense* имеет низкую устойчивость к PVX.

Особый интерес представляет клон *Rx* из образца *S. leptophyes*, который, как и один из клонов *S. tuberosum*, содержит стоп-кодон (TAA) в последовательности, кодирующей NBS-домен. Данный образец *S. leptophyes* крайне чувствителен к PVX-инфекции.

В последовательностях генов-гомологов *Rx* помимо единичных нуклеотидных замен обнару-

Таблица 2. Аминокислотные замены в консервативных мотивах NBS-ARC-домена у различных видов картофеля

Вид	Номер в базе данных NCBI	Кодон	Аминокислотная замена	Тип замены
Мотив киназы-3				
<i>S. acaule</i>	JN564736	ACA/ATA	T/I	NS
Мотив GxP				
<i>S. leptophyes</i> , <i>S. sparsipilum</i>	JN564737	ACA/GCA	T/A	NS
	JN564738			
<i>S. brevicaule</i>	JN564739	ATT/ACT	I/T	NS
<i>S. leptophyes</i>	JN564737	CTT/ATT	L/I	S
<i>S. marinasense</i>	JN564740	ACT/ATT	T/I	NS
	JN564741			
<i>S. tuberosum 1.2</i>	JN564742	CCT/CTT	P/L	NS
Мотив RNBS-D				
<i>S. leptophyes</i> , <i>S. sparsipilum</i>	JN564737	ATA/AAA	I/K	NS
	JN564738			
<i>S. tuberosum 1.3</i>	JN564743	TTT/TGT	F/C	NS
<i>S. leptophyes</i> , <i>S. sparsipilum</i> , <i>S. tuberosum</i>	JN564737	ACA/GCA	T/A	NS
	JN564738			
	AJ011801			
Мотив MHD				
<i>S. tuberosum 1.3</i>	JN564743	ATA/ATG	I/M	S
<i>S. sparsipilum</i>	JN564738	ATC/ACC	I/T	NS
<i>S. chacoense</i>	JN564744	TAT/TGT	Y/C	NS

Примечание. S – синонимичная аминокислотная замена; NS – несинонимичная аминокислотная замена.

жены индели. Так, например, во всех четырех клонах *S. tuberosum* (сорт Пушкинский) и у *S. sparsipilum* выявлены протяженные делеции (341, 91 и 63 п.н.) в участках, кодирующих консервативные мотивы Р-петли и киназы-3. Размеры делеций в этих функциональных районах NBS-домена могут говорить о том, что полученные последовательности являются псевдогенами.

В нашей работе впервые получены и охарактеризованы кодирующие NBS-ARC-домен последовательности гомологов *Rx1* дикорастущих видов картофеля с различной устойчивостью к PVX. Обнаружены индели, а также ряд нуклеотидных замен, в том числе, приводящих к аминокислотным заменам в высококонсервативных участках домена. Влияние подобных замен на функциональный статус R-белка требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-00446-а), программы Президиума Российской академии наук “Молекуляр-

ная и клеточная биология”, а также Госконтракта (ГК 16.512.112154).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ritter E., Debener T., Barone A., Salamini F., Gebhardt C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.* **227**, 81–85.
- Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell.* **11**, 781–791.
- Bakker E., Butterbach P., van der Voort R., van der Vossen E., van Vliet J., Bakker J., Goverse A. 2003. Genetic and physical mapping of homologues of the virus resistance gene *Rx1* and the cyst nematode resistance gene *Gpa2* in potato. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 1524–1531.
- Takken F.L.W., Albrecht M., Tameling W. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 383–390.
- Glowacki S., Macioszek V.K., Kononowicz A.K. 2010. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. *CMBL.* **16**, 1–24.

6. Rairdan G.J., Moffett P. 2006. Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell*. **18**, 2082–2093.
7. Bendahmane A., Farnham G., Moffett P., Baulcombe D.C. 2002. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site–leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J*. **32**, 195–204.
8. Sacco M.A., Mansoor S., Moffett P. 2007. A RanGAP protein physically interacts with the NB-LRR protein Rx, and is required for Rx-mediated viral resistance. *Plant J*. **52**, 82–93.
9. van der Voort R., Kanyuka K., van der Vossen E., Bendahmane A., Mooijman P., Klein-Lankhorst R.M., Stiekema W.J., Baulcombe D.C., Bakker J. 1999. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *MPMI*. **12**(3), 197–206.
10. van der Vossen E., van der Voort R., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D.C., Bakker J., Stiekema W.J., Klein-Lankhorst R.M. 2000. Homologues of a single resistance gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J*. **23**(5), 567–576.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
12. van Ooijen G., Mayr G., Kasiem M.M.A., Albrecht M., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W. 2008. Structure–function analysis of the NBS-ARC domain of plant disease resistance proteins. *J. Exp. Botany*. 1–15.