

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.86:582.542.1

ПОЛИМОРФИЗМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *KPI-A*  
ИЗ КАРТОФЕЛЯ ПОДРОДА *Potatoe* (sect. *Petota*, *Estolonifera*  
И *Lycopersicum*) И ПОДРОДА *Solanum*

© 2013 г. А. А. Криницына<sup>1,2</sup>, Н. В. Мельникова<sup>3</sup>, М. С. Беленикин<sup>3,5</sup>, Р. Poltronieri<sup>4</sup>, А. Santino<sup>4</sup>,  
А. В. Кудрявцева<sup>3</sup>, А. М. Савилова<sup>6</sup>, А. С. Сперанская<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии  
Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва, 127550

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>4</sup>National Research Council of Italy, Italy, Lecce, 73100

<sup>5</sup>Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997

<sup>6</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435

Поступила в редакцию 04.09.2012 г.

Принята к печати 30.10.2012 г.

Белки *KPI* группы А участвуют в защите растений картофеля от патогенных микроорганизмов и вредителей. Хотя в настоящее время известны последовательности достаточно большого числа генов *KPI-A* из различных сортов культурного картофеля (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) и некоторого числа сортов томатов (*Solanum lycopersicum*), информации об аллельном разнообразии этих генов в других видах рода *Solanum* нет. Посредством клонирования, амплификации, секвенирования и последующего анализа в нашей работе впервые установлены консенсусные последовательности фрагментов генов *KPI-A* из растений подрода *Potatoe* секция *Petota* (*Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* – пять генов и *Solanum stoloniferum* – два гена) и из подрода *Solanum* (*Solanum nigrum* – пять генов). Все эти последовательности и последовательности генов представителей секции *Petota* (культурного картофеля *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) и секции *Etuberosum* (*S. palustre*) сходны на 97–100%. Межвидовая вариабельность этих генов не превышает внутривидовую, за исключением последовательностей из *S. lycopersicum*, а распределение высоковариабельных и консервативных областей в кодирующей зрелой белок области генов одинаково у генов всех вышеперечисленных видов. В то же время, при использовании тех же праймеров на ДНК *Solanum dulcamara*, *S. lycopersicum* и *Mandragora officinarum* не обнаруживаются идентичных последовательностей гомологичных генов. Филогенетический анализ по гену *KPI-A* показал, что последовательности из *S. lycopersicum* образуют независимый от прочих изученных видов кластер, тогда как *S. nigrum* попадает в кластер, единый с видами sect. *Etuberosum* и *Petota*, и перечисленные виды не образуют видоспецифичных субкластеров. Несмотря на то, что растения *S. nigrum* устойчивы ко всем известным расам оомицета *Phytophthora infestans*, возбудителя наиболее опасного заболевания пасленовых, последовательности аминокислот, кодируемые генами *KPI-A* из генома этого вида практически или вовсе не отличаются от белков этой же группы, которые характерны для поражаемых *P. infestans* растений культурного картофеля.

**Ключевые слова:** ингибиторы протеиназ типа Кунитца, sect. *Petota*, *Solanum nigrum*, пасленовые, ген *KPI-A*.

POLYMORPHISM OF *KPI-A* GENES FROM PLANTS OF THE SUBGENUS *Potatoe* (sect. *Petota*, *Estolonifera* AND *Lycopersicum*) AND SUBGENUS *Solanum*, by A. A. Krinitsina<sup>1, 2</sup>, N. V. Melnikova<sup>3</sup>, M. S. Belenikin<sup>3, 5</sup>, P. Poltronieri<sup>4</sup>, A. Santino<sup>4</sup>, A. V. Kudryavtseva<sup>3</sup>, A.M. Savilova<sup>6</sup>, A. S. Speranskaya<sup>1, 3\*</sup>  
<sup>1</sup>Biology Department, Moscow State University, Moscow, Russia 119234, \*e-mail: hannadt@mail.ru;  
<sup>2</sup>Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 127550 Russia; <sup>3</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; <sup>4</sup>National Research Council of Italy, Lecce, 73100 Italy; <sup>5</sup>Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia; <sup>6</sup>Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Federal Medical and Bio-

\* Эл. почта: hannadt@mail.ru

logical Agency, Moscow, 119435 Russia). Kunitz-type proteinase inhibitor proteins of group A (KPI-A) are involved in the protection of potato plants from pathogens and pests. Although sequences of large number of the *KPI-A* genes from different species of cultivated potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) and a few genes from tomato (*Solanum lycopersicum*) are known to date, information about the allelic diversity of these genes in other species of the genus *Solanum* is lacking. In our work, the consensus sequences of the *KPI-A* genes were established in two species of subgenus *Potatoe* sect. *Petota* (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* – 5 genes and *Solanum stoloniferum* – 2 genes) and in the subgenus *Solanum* (*Solanum nigrum* – 5 genes) by amplification, cloning, sequencing and subsequent analysis. The determined sequences of *KPI-A* genes were 97–100% identical to known sequences of the cultivated potato of sect. *Petota* (cultivated potato *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) and sect. *Etuberosum* (*S. palustre*). The interspecific variability of these genes did not exceed the intraspecific variability for all studied species except *Solanum lycopersicum*. The distribution of highly variable and conserved sequences in the mature protein-encoding regions was uniform for all investigated *KPI-A* genes. However, our attempts to amplify the homologous genes using the same primers and the genomes of *Solanum dulcamarum*, *Solanum lycopersicum* and *Mandragora officinarum* resulted in no product formation. Phylogenetic analysis of *KPI-A* diversity showed that the sequences of the *S. lycopersicum* form independent cluster, whereas *KPI-A* of *S. nigrum* and species of sect. *Etuberosum* and sect. *Petota* are closely related and do not form species-specific subclusters. Although *Solanum nigrum* is resistant to all known races of economically one of the most important diseases of solanaceous plants oomycete *Phytophthora infestans* aminoacid sequences encoding by *KPI-A* genes from its genome have nearly or absolutely no differences to the same from genomes of cultivated potatoes involved by *P. infestans*.

**Keywords:** Kunitz-type proteinase inhibitors, sect. *Petota*, *Solanum nigrum*, *Solanaceae*, *KPI-A* genes.

**DOI:** 10.7868/S0026898413030063

В геноме культурного картофеля содержатся гены, кодирующие белки, относящиеся к семейству соевого ингибитора трипсина Кунитца (KPI). Гены *KPI* не имеют интронов и кодируют белки, состоящие из примерно 210 аминокислот, из которых 185 приходится на зрелый белок. На основании сходства N- и C-концевых аминокислотных последовательностей выделяют пять групп белков KPI (группы А, В, С, М и К) [1–3], три из которых – А, В и С – наиболее изучены [1, 2]. Как стало ясно из анализа транскриптомов и последовательностей кДНК [1–8] различных сортов картофеля, каждая из перечисленных выше групп кодируется несколькими генами. Анализ ВАС-клонов, содержащих геномные последовательности из картофеля диплоидной линии Р6/210, показал, что геном содержит, по меньшей мере, четыре гена *KPI* группы А (*KPI-A*), расположенных в непосредственной близости друг от друга [9]. Секвенирование генома картофеля, предпринятое группой PGSC [10; <http://solgenomics.net>] также свидетельствует о том, что в нем имеется несколько генов *KPI-A*, хотя точное их число, по-прежнему, не известно [9, 10].

Некоторые белки *KPI-A* из картофеля могут подавлять активность ряда сериновых и аспартатных протеиназ [11–13], хотя о свойствах большинства белков, кодируемых геном *KPI-A* из растений семейства пасленовых, можно судить лишь по аналогии с уже известными [1, 3, 7, 13–19]. Несмотря на то, что, возможно, известны не все физиологические функции белков *KPI-A*, очевидно, что они участвуют в защите растений от патогенных микроорганизмов и вредителей [2, 9, 12, 17, 18]. При ранении растения или после воздействия

метилжасмоновой кислоты в листьях и побегах также индуцируется мРНК *KPI-A* [1, 13, 20, 21].

Кроме генов картофеля, известны последовательности гена *KPI-A* из некоторых других видов растений семейства пасленовых. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *KPI-A* (база данных NCBI) из различных сортов культурного картофеля показывает, что уровень их сходства составляет 88–99%. В то же время, гомологичные *KPI-A* последовательности из томата (база данных NCBI; геном *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 [22, <http://solgenomics.net>], а также и транскриптом *S. lycopersicum* cv. MicroTom [19, <http://www.pgb.kazusa.or.jp/kaftom>]), сходны с последовательностями *KPI-A* из не клубеносного вида *Solanum palustre* и из культурного картофеля в среднем на 80–88% (хотя уровень гомологии по нескольким последовательностям из сортов Kurag, Р6/210 и Danshaku достигает 91–94%). При этом сходство последовательностей *KPI-A* из *S. palustre* и *S. tuberosum* составляет 95–100% (см. также табл. 1).

Единственная известная последовательность *KPI* из паслена черного [AF283464] практически идентична (98% сходства) геномной последовательности Sbr-KPI-A6 [FJ969212] из *S. palustre* и на 95% сходна с последовательностью кДНК [X53470] из *S. tuberosum* cv. Ulster. При этом важно отметить, что паслен черный относится к подроду *Solanum*, тогда как три других перечисленных вида – к подроду *Potatoe*. Таким образом, в филогенетическом отношении паслен черный отстоит от культурного картофеля дальше, чем томат и, следовательно, можно было бы ожидать, что обнаруженные в геноме *S. nigrum* последовательности

*KPI-A* окажутся гораздо менее сходными с уже известными из культурного картофеля, томата и *S. palustre* и, потенциально, они могли бы обладать новыми защитными свойствами.

Представляло интерес исследовать полиморфизм кодирующих зрелые белки *KPI-A* областей генов в геномах тех видов, которые относятся к различным филогенетическим ветвям рода *Solanum*. Для этой цели из подрода *Potatoe* были выбраны представители секции *Petota* – *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* (Juz. a. Bukasov) Hawkes (syn. *Solanum andigenum* Juz. a. Bukasov), *Solanum stoloniferum* Schltdl.a.Bouche и *Solanum dulcamara* L. Из подрода *Solanum* изучили гены паслена черного, поскольку, как сказано выше, информация о генах *KPI-A* этого вида ограничивается только единственной последовательностью кДНК.

Филогенетические исследования в настоящее время обычно базируются на исследованиях разных генов, различных молекулярных и морфологических наборов данных. В настоящей работе мы ставили целью исследовать полиморфизм генов *KPI-A*, имея в виду побочный поиск генов, обладающих потенциально новыми в отношении фитопатогенов свойствами, поскольку известно, что вид паслен черный устойчив ко всем известным расам оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Vary [23]. Полученные нами данные могут быть также использованы в исследованиях эволюционных взаимоотношений между различными видами данного рода.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали геномную ДНК, выделенную из побегов растений (по одному образцу каждого вида) методом, описанным ранее [24]. Растения видов *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* (Juz.a.Bukasov) Hawkes и *Solanum stoloniferum* Schltdl.a.Bouche получены из коллекции Института картофелеводства НАН Беларуси РУП (Республика Беларусь) и поддерживаются в культуре *in vitro* на базе лаборатории биологии развития растений биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Растения *Solanum nigrum* L. собраны в окрестностях г. Пушкино (Московской области) и в окрестностях г. Бугульма (Республика Татарстан) летом 2007 г., *Solanum dulcamara* L. – на территории внутреннего двора МГУ (Москва) летом 2007 г., *Mandragora officinarum* L. – на средиземноморском побережье (Турция) летом 2007 г.

**Праймеры**, использованных для клонирования фрагментов генов *KPI* группы А, конструировали на основании анализа уже известных последовательностей генов этой группы [3, 4] и базы данных NCBI: *KPI-A1* 5' (gggagctcaacctaccagtgatctc-ct) 3'; *KPI-A2* 5' (ggaagcttactagactctctggaataagac) 3'.

Синтез праймеров производила компания “Синтол” (Россия).

**ПЦР проводили** на амплификаторе Терцик-2 МС16 (“ДНК-технология”, Москва) с использованием *Taq*-ДНК-полимеразы (“Имтек”, Москва). Геномную ДНК вносили в реакционную смесь до конечной концентрации 0.01 мкг/мкл при концентрации dNTP – 200 мкМ, MgCl<sub>2</sub> – 2.5 мМ и каждого праймера – 0.3 пмоль/мкл.

Условия проведения ПЦР: 1 стадия (1 цикл) – 94°C, 1 мин; 2 стадия (5 циклов) – 94°C, 30 с; 56°C, 10 с; 72°C, 10 с; 3 стадия (25 циклов) – 94°C, 5 с; 60°C, 5 с; 72°C, 30 с.

**Аmplифицированные фрагменты** (600–650 п.н.) клонировали в векторе pGEM-T-Easy согласно протоколу производителя (“Promega”, США). Последовательности секвенировали на автоматическом анализаторе “AbiPrism 3200” (“Applied Biosystems”, США) с использованием стандартных праймеров T7 и sp6 (“Promega”) и описанных выше уникальных праймеров *KPI-A1* и *KPI-A2* (“Синтол”).

**Последовательности нуклеотидов** амплифицированных фрагментов генов реконструировали с помощью программы BioEdit 7.0.1 [www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html]. Обработку полученных данных и кластерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили, используя пакет программ MEGA 3.1 [www.megasoftware.net].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Амплификация фрагментов генома с использованием праймеров *KPI-A1* и *KPI-A2* и ДНК растений *S. tuberosum* ssp. *andigenum* (Sand), *S. stoloniferum* (Sst), *S. lycopersicum* (Slyc), *S. dulcamara* (Sd), *S. nigrum* (Пушино) (SnP), *S. nigrum* (Татарстан) (SnT) и *Mandragora officinarum* (Mn) показала, что продукт предполагаемого размера (650 п.н.) обнаруживается только в геномах Sand, Sst, SnP и SnT. После амплификации геномной ДНК *S. dulcamara* и *S. nigrum* (Татарстан) обнаружен также фрагмент длиной 750 п.н.

**Таблица 1.** Сходство последовательностей генов *KPI-A* из *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, *S. lycopersicum* и *S. palustre* (в %)

Вид	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. palustre</i>
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	88–99		
<i>S. lycopersicum</i>	85–88 (как правило) до 94 (иногда)	99–100	
<i>S. palustre</i>	93–100	85–87	95–99

При варьировании параметров ПЦР результаты не отличаются.

Продукты амплификации ПЦР с использованием в качестве матрицы геномов *Sand*, *Sst*, *SnP* и *SnT* клонировали, затем клоны, несущие вставки длиной 650 п.н. (*Sand-AA-*, *Sst-AA-*, и *SnPA-* с различными порядковыми номерами), секвенировали. Всего секвенировано 17 клонов *Sand-AA-*, 15 клонов *Sst-AA-*, 16 клонов *SnPA-* и четыре клон *SnTA-*. Помимо этого секвенировали 18 клонов из *S. nigrum*, несущих вставки длиной 750 п.н. (*SnTA(750)-*).

Показано, что среди *SnPA(750)-* последовательностей гомологичных генам ингибиторов протеиназ типа Кунитца (любой из известных групп) нет, поэтому эти клоны исключены из дальнейшего анализа, а клонирование и секвенирование последовательностей *SdA(750)-* не проводилось.

Последовательности вставок клонов *Sand-AA-*, *Sst-AA-*, *SnPA-* и *SnTA-* подразделяли методом кластерного анализа (UPGMA) на группы и далее сравнивали нуклеотидные последовательности вставок каждого из индивидуальных клонов с целью отследить возможные ошибки *Taq*-ДНК-полимеразы и секвенирования. При этом предполагалось, что две полностью идентичные вставки являются копиями одного действительно существующего гена. Единичные нуклеотидные замены, не имеющие повторностей в других клонках, расценивали как возможную ошибку, и последовательности, содержащие такие замены, как отдельные гены не рассматривались.

Таким образом, мы определяли последовательности фрагментов только тех генов, которые, несомненно, имеются в геномах изучаемых организмов. Задача установить их общее число и внутривидовую вариабельность не ставилась, в том числе, по-

тому, что они могут представлять аллельные состояния одного гена.

Окончательно установленные фрагменты генов из изученных нами видов представляют собой консенсусные последовательности, структура которых была установлена на основании сравнения от двух (полностью идентичных) до одиннадцати (полностью идентичных либо различающихся единичными, не повторяющимися нуклеотидными заменами) копий. Таким путем установлены консенсусные последовательности фрагментов девяти генов (названия и номер доступа в NCBI см. в табл. 2). Кроме этого, последовательность одного из клонов из *spp. andigenum*, не имеющая дубликата, значительно отличается от прочих (сходство 92%) последовательностей из того же вида и, без сомнения, представляет собой копию еще одного гена, который назван *Sand-KPI-A5* [GQ162 116].

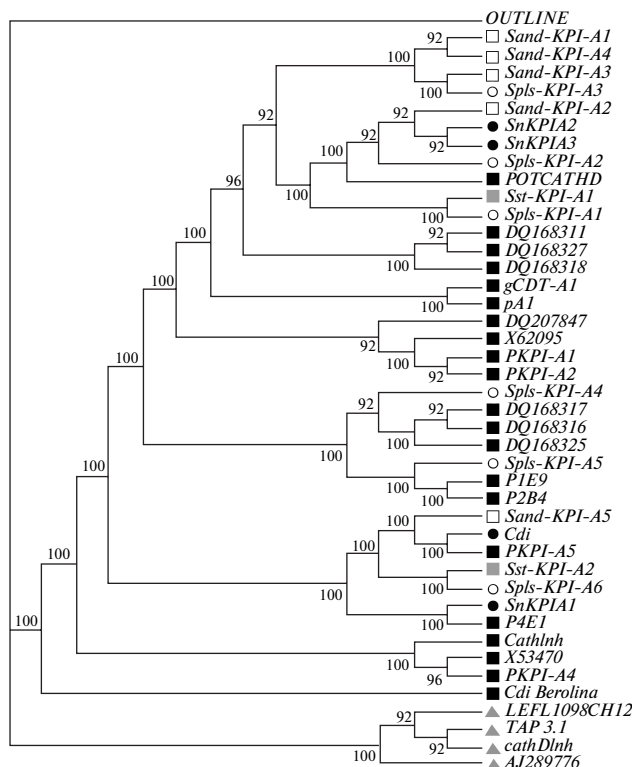
Следует отметить, что последовательность [JQ815390, GenBank] содержит сдвиг рамки считывания и, таким образом, *SnKPIA3* представляет собой псевдоген.

Установленные нами последовательности на 97–100% сходны (т.е. практически идентичны) с известными последовательностями из культурного картофеля. Межвидовая вариабельность генов из исследованных в данной работе видов, за исключением гена томата, не превышает внутривидовую, а распределение высоковариабельных, умеренновариабельных и консервативных областей в кодирующей зрелый белок области генов, установленное ранее [23], оказалось одинаковым у генов из всех вышеперечисленных видов.

Сравнение последовательностей, кодирующих ингибиторы протеиназ типа Кунитца группы А, в дикорастущих видах картофеля с известными последовательностями из различных сортов культурного картофеля, а также с последовательно-

**Таблица 2.** Название генов и число клонов, на основании которых реконструированы последовательности

Вид	Название, присвоенное консенсусным последовательностям	Число клонов, на основании которых была реконструирована последовательность гена	Номер доступа в NCBI
<i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	<i>Sand-KPI-A1</i>	4	GQ162112
	<i>Sand-KPI-A2</i>	4	GQ162113
	<i>Sand-KPI-A3</i>	2	GQ162114
	<i>Sand-KPI-A4</i>	6	GQ162115
	<i>Sand-KPI-A5</i>	1	GQ162116
<i>Solanum stoloniferum</i>	<i>Sst-KPI-A1</i>	11	FJ969213
	<i>Sst-KPI-A2</i>	4	FJ969214
<i>Solanum nigrum</i> (Пушино)	<i>SnKPIA1</i>	8	JQ815388
	<i>SnKPIA2</i>	2	JQ815389
	<i>SnKPIA3</i>	6	JQ815390
<i>Solanum nigrum</i> (Татарстан)	<i>SnKPIA4</i>	3	



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей KPI-A, сконструированное методом МР (Maximum Parsimony). Числа в узлах ветвей (bootstraps) — индексы поддержки каждого узла (1000-кратная повторность). Акронимы последовательностей, использованных для построения филогенетического дерева: *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* сорт “Superior” — POTCATHD [M96257]; линия “AM 80/5793” — CathInh [X74985]; сорт “Provita” — PIE9 [AF490593], P2B4 [AY083349], P4E1 [AY083348]; сорт “Danshaku” gCDT-A1 [D17331], POTPIA-pA1 [D17328]; сорт “Berolina” — Cdi Berolina [X67843]; сорт “Kuras” — [DQ168311], [DQ168317], [DQ168316], [DQ168318], [DQ207847], [DQ207847], [DQ168325], [DQ168327]; сорт “Ulster” — PI8 [X53470], PI13 [X62095]; сорт “Истринский” — PKPI-A1 [JN983808], PKPI-A2 [JN983812], PKPI-A4 [JN983809], PKPI-A5 [JN983810]. *S. andigenum* ssp. *andigenum* — Sand-KPI-A1 [GQ162112] Sand-KPI-A2 [GQ162113], Sand-KPI-A3 [GQ162114], Sand-KPI-A4 [GQ162115], Sand-KPI-A5 [GQ162116]; *S. stoloniferum* — Sst-KPI-A1 [FJ969213], Sst-KPI-A2 [FJ969214]; *S. palustre* — Spls-KPI-A1 [FJ969207], Spls-KPI-A2 [FJ969208], Spls-KPI-A3 [FJ969209], Spls-KPI-A4 [FJ969210], Spls-KPI-A5 [FJ969211], Spls-KPI-A6 [FJ969212]; *S. nigrum* — Cdi [AF283464]; SnKPIA1 [JQ815388], SnKPIA2 [JQ815389], SnKPIA3 [JQ815390]. *S. lycopersicum* сорт “Micro-Tom” — LEFL1098CH12 [AK247341]; сорт “Rutgers” — TAP 3.1 [X73986], cultivar “VFN-8” — cathDInh [AJ295638], cultivar — “Moneymaker” — [AJ289776].

Последовательности из разных видов обозначены маркерами: черные квадраты — *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*; белые квадраты — *S. andigenum* ssp. *andigenum*; серые квадраты — *S. stoloniferum*; белые кружки — *S. palustre*; черные кружки — *S. nigrum*; серые треугольники — *S. lycopersicum*.

стями из таких видов, как паслен черный и томат, путем построения филогенетического дерева показывает, что перечисленные виды, за исключением томата, не образуют видоспецифичных кластеров (рис. 1). Исключение составляют последовательности KPI-A из томата.

У современных исследователей растений семейства пасленовых нет единого мнения относительно того, как именно следует классифицировать растения рода *Solanum* [23, 25–29]. В частности, предлагают на основании данных RAPD-анализа исключить растения секции *Dulcamara* из подрода *Potatoe* [27]. Таксономия группы видов, относящихся к подроду *Solanum*, несмотря на ряд исследований последних лет, также точно не установлена [23].

Томаты выделяли в отдельный род *Lycopersicon* достаточно долго. Затем, ряд исследований с использованием методов молекулярной биологии показал, что томаты и картофель близко родственны филогенетически, поэтому в настоящее время томаты включают в род *Solanum* [25, 28–33]. Тем не менее, авторы обзора [25] полагают, что помещение томатов в род *Solanum* все же остается спорным.

В настоящее время *S. lycopersicum* L. (syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) относят как к секции *Petota* (subsect. *Lycopersicon* ser. *Neolycopersicon*) [база данных GRIN (Germplasm Resources Information Network) <http://www.ars-grin.gov>], так и к отдельной секции *Lycopersicon* [34, 35]. Неклубненосный вид *S. palustre* Poepp. ex Schldt. (syn. *Solanum brevifidens* Phil.) также относят или к секции *Petota*

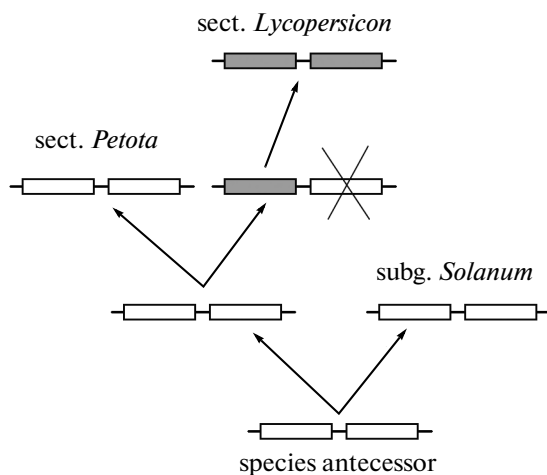


Рис. 2. Гипотетические представления о формировании современного разнообразия вариантов генов *KPI-A* в геномах растений рода *Solanum*.

(subsect. *Estolonifera*) (база данных GRIN), или к отдельной секции *Etuberosum* [35]. Однако даже те исследователи, склонные относить *S. lycopersicum*, *S. palustre* и *S. tuberosum* к разным секциям (*Lycopersicon*, *Etuberosum* и *Petota* соответственно), также указывают со всей определенностью на тот факт, что эволюционно эти виды ближе друг другу (они относятся к подроду *Potatoe*), чем к паслену черному *S. nigrum* L. (подрод *Solanum*).

Несмотря на то, что паслен черный относится к другому подроду, нежели прочие перечисленные в настоящей работе виды, тем не менее, в его геноме имеются гены *KPI-A*, практически идентичные последовательностям из картофеля (*ssp. tuberosum* и *ssp. andigenum*), *S. stoloniferum* и *S. palustre* (97–100%), тогда как сходство последовательностей *KPI-A* томата и перечисленных видов не превышает 94%. Таким образом, можно утверждать, что данные сравнения последовательностей *KPI-A* из изученных видов не совпадают с общепринятой филогенией рода *Solanum*.

Хотелось бы отметить, что наличие в геноме паслена черного последовательностей *KPI-A*, очень сходных с последовательностями из других видов секций *Petota* и *Etuberosum*, при отсутствии таких последовательностей в томате, можно было бы объяснить возможной контаминацией в процессе эксперимента. Однако это исключено, поскольку амплификацию и клонирование последовательностей из геномов (Sand), (Sst) и (SnP), (SnT) производили независимо в двух территориально удаленных лабораториях. Помимо этого, в базе данных NCBI представлена последовательность из генома паслена черного [AF283464], полученная и секвенированная независимой группой исследователей, и эта последовательность практически идентична установленным нами последовательностям (до 99%). Таким образом, на-

ши результаты достоверны; несмотря на то, что паслен черный устойчив ко всем известным расам *P. infestans* [23], и можно утверждать, что белки, кодируемые генами *KPI-A*, практически или вовсе не отличаются от белков этой же группы, которые встречаются в поражаемых *P. infestans* растениях культурного картофеля, а также белков дикорастущих видов, относящихся к секции *Petota*.

Наблюдающиеся сложности и несоответствия между результатами дифференцировки секции *Petota* на филогенетические группы различными исследователями, как полагают некоторые авторы, являются следствием не методологических проблем, а отражением реальной биологической ситуации. По-видимому, многие виды этой секции являются результатом политомии, которая сопровождалась быстрым расселением видов и высоким уровнем межвидовой гибридизации [26].

Наблюдающееся сходство генов *KPI-A* между видами, относящимися к секциям *Etuberosum*, *Petota* и генами паслена черного, при меньшем их сходстве с генами томата, может являться следствием их паралоогического происхождения с последующей эволюцией одной и элиминацией второй, предковой, копии гена (см. рис. 2).

В настоящее время, благодаря развитию современных молекулярно-биологических технологий, исследования филогении организмов какой-либо систематической группы зачастую основываются на множественных данных, касающихся полиморфизма и эволюции различных генов или областей геномов. Хотя принцип выбора наилучшего метода объединения этих данных с целью построения комплексной филогении пока что не решен, новая информация об эволюции конкретных генов, в частности *KPI-A*, вносит дополнительный вклад в построение филогенетических взаимоотношений исследуемой группы организмов.

Работа получила финансовую поддержку Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 гг.” (ГК № 16.552.11.7034) и Программы фундаментальных исследований Президиума Российской академии наук “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”, 2012 г.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. 1994. A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiol.* **35**, 303–312.
- Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. 2003. Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol. Genet. Genomics.* **269**, 526–534.
- Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jorgensen M., Welinder K.G. 2006. Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *FEBS J.* **273**, 3569–3584.
- Gruden K., Strukelj B., Ravnkar M., Poljsak-Prijatelj M., Mavrie I., Brzin J., Pundecar J., Kregar I. 1997. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterisation and immunocytochemical localisation studies. *Plant Mol. Biol.* **34**, 317–323.
- Stiekema W.J., Heidekamp F., Dirkse W.G., van Beckum J., Haan P., ten Bosch C., Louwerse J.D. 1988. Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **11**, 255–269.
- Strukelj B., Pungercar J., Ritonja A., Krizaj I., Gubensek F., Kregar I., Turk V. 1990. Nucleotide and deduced amino acid sequence of an aspartic proteinase inhibitor homologue from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Nucl. Acids Res.* **18**, 4605
- Hannapel D.J. 1993. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 22-kilodalton cathepsin D inhibitor protein of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.* **101**, 703–704.
- Herbers K., Prat S., Willmitzer L. 1994. Cloning and characterization of a cathepsin D inhibitor gene from *Solanum tuberosum* L. *Plant Mol. Biol.* **26**, 73–83.
- Odeny D.A., Stich B., Gebhardt C. 2010. Physical organization of mixed protease inhibitor gene clusters, coordinated expression and association with resistance to late blight at the StKI locus on potato chromosome III. *Plant Cell Environ.* **33**, 2149–2161.
- The potato genome sequencing Consortium. 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature.* **475**, 189–195.
- Mares M., Meloun B., Pavlik M., Kostka V., Baudys M. 1989. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* **251**, 94–98.
- Heibges A., Salamini F., Gebhardt C. 2003. Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol. Genet. Genomics.* **269**, 535–541.
- Lison P., Rodrigo I., Conejero V. 2006. A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol.* **142**, 1329–1339.
- Ritonja A., Krizaj I., Mesko P., Kopitar M., Lucovnik P., Strukelj B., Pungercar J., Buttle D.J., Barrett A.J., Turk V. 1990. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* **267**, 13–15.
- Strukelj B., Pungercar J., Mesko P., Barlic-Maganja D., Gubensek F., Kregar I., Turk V. 1992. Characterization of aspartic proteinase inhibitors from potato at the gene, cDNA and protein levels. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **373**, 477–482.
- Suh S.G., Peterson J.E., Stiekema W.J., Hannapel D.J. 1990. Purification and characterization of the 22-kilodalton potato tuber proteins. *Plant Physiol.* **94**, 40–45.
- Werner R., Guitton M.C., Muhlbach H.P. 1993. Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. *Plant Physiol.* **103**, 1473.
- Brenner E.D., Lambert K.N., Kaloshian I., Williamson V.M. 1998. Characterization of LeMir, a Root-Knot Nematode-Induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol.* **118**, 237–247.
- Aoki K., Yano K., Suzuki A., et al. 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics.* **11**, 210.
- Hildmann T., Ebneith M., Peña-Cortes H., Sanchez-Serrano J.J., Willmitzer L., Prat S. 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell.* **4**, 1157–1170.
- Kreft S., Ravnkar M., Mesko P., Pungercar J., Umek A., Kregar I., Strukelj B. 1997. Jasmonic acid inducible aspartic proteinase inhibitors from potato. *Phytochemistry.* **44**, 1001–1006.
- Barone A., Chiusano M.L., Ercolano M.R., Giuliano G., Grandillo S., Frusciante L. Structural and functional genomics of tomato. 2008. *Int. J. Plant Genomics.* **2008**, 820 274.
- Poczai P., Hyvonen J. 2011. On the origin of *Solanum nigrum*: can networks help? *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1171–1185.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1349.
- Peralta I.E., Spooner D.M. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Tomo.* **28**, 45–54.
- Jacobs M.M., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G., Visser M., Mank R., Sengers M., Hoekstra R., Vosman B. 2008. AFLP analysis reveals a lack of phylogenetic structure within *Solanum* section Petota. *BMC Evol. Biol.* **8**, 145.
- Poczai P., Teller J., Szabo I. 2008. Analysis of phylogenetic relationships in the genus *Solanum* (Solanaceae)

- as revealed by RAPD markers. *Plant Syst. Evol.* **275**, 59–67.
28. Spooner D.M., Anderson G.J., Jansen R.K. 1993. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *Am. J. Bot.* **80**, 676–688.
29. Bohs L., Olmstead R.G. 1997. Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Syst. Bot.* **22**, 5–17.
30. Olmstead R.G., Sweere J. A., Spangler R.E., Bohs L., Palmer J.D. 1999. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: *Solanaceae IV*. Eds Nee M., Symon D.E., Lester R.N., Jessop J.P. Kew: Royal Botanical Gardens, pp. 111–137.
31. Peralta I.E., Spooner D.M. 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am. J. Bot.* **88**, 1888–1902.
32. Marshall J.A., Knapp S., Davey M.R., Power J.B., Cocking E.C., Bennett M.D., Cox A.V. 2001. Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicon* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. *Theor. Appl. Genet.* **103**, 1216–1222.
33. Spooner D.M., Peralta I., Knapp S. 2005. Comparison of AFLPs with other markers from phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon.* **54**, 43–61.
34. Darwin S.C., Knapp S., Peralta I.E. 2003. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Syst. Biodivers.* **1**, 29–53.
35. Rodriguez F., Wu F., Ane C., Tanksley S., Spooner D.M. 2009. Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? *BMC Evol Biol.* **9**, 191.