

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФРАГМЕНТА ГЕНА КИСЛОЙ ВАКУОЛЯРНОЙ ИНВЕРТАЗЫ *Pain-1* У СОРТОВ И ЛИНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.)*

М.А. СЛУГИНА¹, Е.О. ШМЕЛЬКОВА¹, А.А. МЕЛЕШИН², Е.З. КОЧИЕВА¹

Экономическая эффективность сельскохозяйственного производства картофеля зависит не только от количества и качества собранного урожая, но и от условий и сроков хранения клубней, основу питательной и технической ценности которых определяет содержание крахмала. При воздействии низких температур крахмал расщепляется на редуцирующие сахара, что значительно ухудшает потребительские качества клубней. Растительные инвертазы катализируют необратимый гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Однозначно показано, что кислая вакуолярная инвертаза (*Pain-1*) играет основную роль в холодовом осахаривании клубней картофеля. Настоящая работа посвящена оценке генетического потенциала и характеристике аллельного полиморфизма гена *Pain-1*, связанного с хозяйственно важными признаками, у отечественных и зарубежных форм картофеля, которые в настоящее время активно используются в селекционных программах. В настоящей работе исследован полиморфизм 5-7-го экзона гена кислой вакуолярной инвертазы у 69 образцов сортов и линий картофеля российской и зарубежной селекции. В последовательностях выявлено 66 SNPs, из которых 25 описаны впервые (SNP₁₆₂₈, SNP₁₆₄₈, SNP₁₇₀₀, SNP₁₇₀₉, SNP₁₇₁₇, SNP₁₇₂₄, SNP₁₇₂₆, SNP₁₇₃₈, SNP₁₇₈₈, SNP₁₇₉₄, SNP₁₇₉₇, SNP₁₈₀₈, SNP₁₈₁₅, SNP₁₈₁₈, SNP₁₈₃₁, SNP₁₈₃₇, SNP₁₈₄₇, SNP₁₈₆₁, SNP₁₈₆₅, SNP₁₈₇₂, SNP₁₈₈₅, SNP₁₈₈₆, SNP₁₈₉₀, SNP₁₉₀₇, SNP₁₉₀₉). В составе исследуемого участка была найдена значимая замена SNP₁₅₄₄ (C/A), которая коррелирует с повышенным содержанием крахмала в клубнях и находится в гомозиготном состоянии у сортов казахстанской селекции Улан и Астана. Из 42 SNPs в экзонных последовательностях 27 приводили к аминокислотным заменам. У большинства образцов имелись одиночные аминокислотные замены. Максимальным числом замен (семь-восемь) характеризовались сорт Жуковский ранний и линии 165 и 162; у сорта Фрителла и линии 84 замен относительно референсной последовательности не обнаружили. Полученные данные позволяют сделать вывод о высоком полиморфизме фрагмента гена *Pain-1* у изученных образцов. В результате выявлены 78 аллельных вариантов фрагмента гена *Pain-1* (64 — специфичные, 14 — общие для нескольких образцов), что в дальнейшем может использоваться в селекции для создания сортов с повышенным содержанием крахмала.

Ключевые слова: кислая вакуолярная инвертаза, ген *Pain-1*, экзонные последовательности, полиморфизм, SNPs, аминокислотные замены, селекция картофеля, содержание крахмала в клубнях, холодовое осахаривание.

Наряду с пшеницей, кукурузой и рисом картофель (*Solanum tuberosum* L.) — одна из самых распространенных и наиболее экономически значимых мировых продовольственных, кормовых и технических культур. Эффективность производства картофеля зависит не только от количества и качества собранного урожая, но и от последующих условий его хранения, которое обычно осуществляется при низких температурах, чтобы предотвратить потерю влаги, гниение, прорастание и перенос болезней.

Питательная и технологическая ценность клубней картофеля определяется содержанием крахмала (1). У растений крахмал выполняет запасающую функцию, поскольку не создает в клетке повышенного осмотического давления, будучи химически инертным (в отличие от глюкозы и сахарозы) (2, 3). В то же время именно крахмал — «слабое звено» при хранении клубней, так как под воздействием низких температур в растительных тканях происходят существенные изменения в углеводном обмене (4), а именно активируются сахарозолитические ферменты. Это приводит к распаду крахмала на простые сахара (глюкозу и фруктозу), которые участвуют в поддержании внутриклеточного осмотического давления, тем самым

* В работе использовано оборудование ЦКП «Биоинженерия» (ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, г. Москва). Исследование выполнено в рамках КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля».

увеличивая резистентность растений к низким температурам. При температуре ниже +3 °С включается защитная реакция клубней на переохлаждение и крахмал начинает интенсивно разлагаться, что сопровождается накоплением редуцирующих сахаров (холодовое осахаривание, cold-induced sweetening) (5, 6). В результате из-за ухудшения вкусовых качеств клубней картофеля изменяются их товарные характеристики (7, 8). Кроме того, при термической обработке (приготовление отварного картофеля или картофельных чипсов) редуцирующие сахара взаимодействуют со свободными аминокислотами, приводя к изменению цвета продукта и накоплению в нем канцерогена — акриламида (9-11).

Поиск нуклеотидных и аминокислотных замен, ассоциированных с накоплением крахмала и сахаров в клубнях и отсутствием холодового осахаривания, имеет большое значение для селекционного процесса.

Небольшое семейство растительных инвертаз, к которым относятся апопластные, вакуолярные и цитоплазматические инвертазы, катализирует необратимый гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Однозначно показано, что кислая вакуолярная инвертаза, кодируемая геном *Pain-1*, играет основную роль в холодовом осахаривании клубней картофеля. Ингибирование гена *Pain-1* снижает накопление редуцирующих сахаров при низких температурах (12-16). У картофеля (*Solanum tuberosum*) ген кислой вакуолярной инвертазы идентифицирован, изучена его структура и экспрессия, а также найдены однонуклеотидные замены (SNPs), которые могут оказывать определяющее влияние на активность фермента (17, 18).

Ранее показано, что наибольшее количество полиморфных сайтов детектируется в С-терминальной области (5-й экзон—стоп-кодон), который достаточно хорошо изучен у зарубежных сортов, более того, в указанной области обнаружены SNPs, ассоциированные с количеством крахмала в клубнях (17, 19). Анализ полиморфизма этого участка у набора из 19 сортов картофеля выявил наличие девяти аллельных вариантов (20).

Поиск новых аллельных вариантов гена *Pain-1*, обуславливающего хозяйственно значимые признаки у картофеля, и оценка частоты встречаемости таких вариантов представляется важным для оптимизации селекционного процесса (21-23).

В представленном исследовании на основании анализа нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма выявлены 78 аллельных вариантов фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов и линий картофеля, которые ранее не были охарактеризованы по этому признаку, и показано наличие 42 SNPs, из которых 34 описаны впервые.

Целью работы был анализ С-терминальной области гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у 69 сортов и линий картофеля разного происхождения, которые в настоящее время используются в селекционных программах.

Методика. Аллельный полиморфизм фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* изучали у 69 образцов картофеля, включая 55 сортов отечественной и зарубежной селекции, а также у 14 линий, используемых в настоящее время в селекционных программах (Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха). Клубни проращивали в теплице при световом и температурном режиме 8/16 ч и 16/22 °С (ночь/день) с интенсивностью освещения 10-12 клк. Отобранные образцы характеризовались разным содержанием крахмала в клубнях и неодинаковой устойчивостью к абиотическим факторам.

Выделение ядерной растительной ДНК проводили на основании протокола, предложенного К. Edwards с соавт. (1991) из свежих листьев

согласно описанию (24). Для амплификации фрагмента гена *Pain-1* использовали пару праймеров IV5exF (GAAGCCTCATTTGAAGTGGAC)—IVendR (AATGTATGGGTTCCCTGGAAACCG). При проведении ПЦР готовили реакционную смесь объемом 15 мкл, которая содержала 1× буфер, включающий 50 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 50 мМ КСl, 0,1 % Tween 20 («Диалат Лтд.», Россия), 1,5 М MgCl₂, 20 мМ dNTP, 10 мкМ соответствующего праймера, 0,25 ед. Taq ДНК-полимеразы и ~ 100 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили на приборе Mastercycler gradient («Eppendorf», Германия) с использованием набора реактивов производства «Диалат Лтд.» (Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: 5 мин при 94 °С; 35 циклов: 30 с при 94 °С, 40 с при 57,5 °С и 1 мин при 72 °С. Финальная элонгация: 1 мин при 72 °С. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле (LE 2 Agarose, «Хеликон», Россия) в 1× TBE-буфере с бромистым этидием при увеличении напряженности поля от 70 до 100 В/см. Результаты документировали в системе BioDoc II («Biometra GmbH», Германия). В качестве стандарта размеров фрагментов использовали коммерческие ДНК-маркеры 1 Kb и 100 bp («Thermo Fisher Scientific», США). Амплифицированные фрагменты секвенировали с теми же праймерами на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer («Applied Biosystems», США).

Выравнивание, транслирование и анализ полиморфизма нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (25). В качестве референса использовали последовательность из базы данных NCBI (GeneID:102577489).

Результаты. Нуклеотидный полиморфизм фрагмента гена *Pain-1*. У изученных образцов был амплифицирован и секвенирован фрагмент С-терминальной области, содержащий последовательность с 5-го по 7-й экзон. Длина полученных последовательностей фрагмента гена *Pain-1* у всех анализируемых образцов не различалась и составила 707 п.н. Наиболее протяженным был 7-й экзон (199 п.н.), самым коротким — 6-й экзон (91 п.н.). Инделей в последовательностях анализируемых образцов не обнаружили, тогда как у сорта Брянский ранний в предыдущих исследованиях мы показали наличие 11-нуклеотидной делеции (CAAGCTTATAT) и моноклеотидной инсерции (Т) в 6-м интроне VI (20).

Уровень полиморфизма анализируемых последовательностей гена кислой вакуолярной инвертазы у 69 сортов и линий картофеля в среднем составил 9,33 %. Всего было выявлено 66 SNPs (42 SNPs в экзонах и 24 SNPs в интронах). Среди обнаруженных единичных нуклеотидных замен 24 SNPs локализовались в последовательностях интронов, причем в целом интронный полиморфизм оказался выше экзонного, достигая 10,16 %.

Особый интерес для изучения аллельных вариантов представляют экзонные последовательности, так как именно они кодируют аминокислоты, и изменения в экзонах в итоге может привести к функциональным изменениям белка. В анализируемых экзонных последовательностях (5-7-й экзоны) у 69 сортов и линий картофеля мы обнаружили 42 SNPs, что составило 8,91 % от общей длины исследованных экзонов. Такая степень полиморфизма в экзонах неожиданно высока в сравнении с выявленной в предыдущих исследованиях гена вакуолярной инвертазы. Так, при изучении кДНК генов-гомологов *Pain-1* у 219 образцов картофеля описаны 28 единичных точечных замен, при этом 24 SNPs были детектированы в анализируемом фрагменте (5-й экзон—7-й экзон) (17). Кроме того, нами ранее был изучен полиморфизм этого гена у набора из 19 сортов российской селекции и выявлены 25 SNPs в указанном фрагменте гена кислой вакуо-

лярной инвертазы при общей степени полиморфизма 3,53 % (20).

Последовательности 5-7-го экзонов гена *Pain-1* были проанализированы на наличие известных (17, 20) и новых, еще не выявленных у других сортов нуклеотидных замен. В результате оказалось, что среди SNPs, найденных у 69 изученных образцов сортов и линий картофеля, SNP₁₅₄₄, SNP₁₅₇₄, SNP₁₅₉₆, SNP₁₆₂₉, SNP₁₆₆₁, SNP₁₈₄₃, SNP₁₈₅₇, SNP₁₈₉₅, SNP₁₈₉₆ (обозначены согласно порядковому номеру нуклеотида на кДНК) уже описаны ранее (17, 20). В кодирующих последовательностях образцов выявили 34 нуклеотидные замены, из которых 25 не были описаны до этого времени: SNP₁₆₂₈, SNP₁₆₄₈, SNP₁₇₀₀, SNP₁₇₀₉, SNP₁₇₁₇, SNP₁₇₂₄, SNP₁₇₂₆, SNP₁₇₃₈, SNP₁₇₈₈, SNP₁₇₉₄, SNP₁₇₉₇, SNP₁₈₀₈, SNP₁₈₁₅, SNP₁₈₁₈, SNP₁₈₃₁, SNP₁₈₃₇, SNP₁₈₄₇, SNP₁₈₆₁, SNP₁₈₆₅, SNP₁₈₇₂, SNP₁₈₈₅, SNP₁₈₈₆, SNP₁₈₉₀, SNP₁₉₀₇, SNP₁₉₀₉.

Сообщалось, что определенные нуклеотидные замены в первичной последовательности *Pain-1* могут быть ассоциированы с хозяйственно ценными признаками, такими как повышенное содержание крахмала (17). В составе исследуемого участка нами была найдена значимая замена SNP₁₅₄₄ (C/A), которая коррелирует с увеличением количества крахмала в клубнях и выявлена в гомозиготном состоянии у сортов Улан и Астана. У сортов Кортни, Кураж, Елизавета, Жуковский ранний, Рябинушка, Фаворит, Вектор, Инноватор, Кузнечанка также присутствовала замена SNP₁₅₄₄, но в гетерозиготном состоянии. Ранее наличие SNP₁₅₄₄ было показано еще для одного сорта российской селекции — Брянский ранний (20).

Аллельные варианты фрагмента гена *Pain-1* у сортов и линий картофеля. Всего в анализируемом наборе из 69 образцов сортов и линий картофеля мы обнаружили 78 аллельных вариантов фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* (данные представлены в online версии статьи на сайте <http://www.agrobiology.ru>, табл. 1). При этом 64 аллельных варианта оказались уникальными, 14 — общими для нескольких образцов. Наиболее распространенными были аллельные варианты Pain-1_A62 (у 13 образцов), Pain-1_A63, Pain-1_A64 (у 6 образцов), Pain-1_A12 (у 5 образцов). Каждый из аллельных вариантов Pain-1_A1, Pain-1_A28, Pain-1_A34, Pain-1_A36, Pain-1_A37, Pain-1_A38, Pain-1_A46, Pain-1_A65 повторялся у двух образцов. Для 15 сортов (Астана, Дидар, Карассайский, Мирас, Ушконир, Огниво, Лилея, Крепыш, Хозяюшка, Валентино, Наяда, Каменский, Леди Леди Клер, Ароза, Спиридон) были выявлены сортоспецифичные аллельные варианты, уникальные для изученного набора.

Большинство из 69 анализируемых сортов и линий картофеля оказались гетерозиготными, и им соответствовали несколько аллельных вариантов. Гомозиготными по исследуемому гену были сорта Улан, Астана, Фрителла, Огниво, Лилея, Холмогорский, Крепыш, Хозяюшка, Валентино, Наяда, Каменский, Брянский деликатесный, Клер, Ароза, Дидар, Карассайский, Мирас, Ушконир, Спиридон и линия 84. Аллельный вариант Pain-1_A12, выявленный у сортов Фрителла, Чернский/1 и линий 84 и 111/1, оказался общим с последовательностью *S. tuberosum*, представленной в базе данных NCBI (GeneID:102577489) (см. <http://www.agrobiology.ru>, табл. 1).

Таким образом, в анализируемом фрагменте 5-й экзон—7-й экзон гена *Pain-1* у 69 образцов сортов и линий картофеля выявлено 78 аллельных вариантов (см. <http://www.agrobiology.ru>, табл. 1), что указывает на высокую степень полиморфизма. Ранее для полноразмерной кодирующей последовательности гена кислой вакуолярной инвертазы было описано только 11 аллельных вариантов (17) и 9 аллельных вариантов обнаружили у 19 сортов российской, белорусской и казахстанской селекции (20).

Анализ полиморфизма аминокислотных последователь-

ностей. Нуклеотидные последовательности экзонов были транслированы и проведен анализ предполагаемой аминокислотной последовательности белка. Кислая вакуолярная инвертаза картофеля состоит из 639 а.о. Длина доступной для анализа последовательности, которую кодирует фрагмент 5-й экзон—стоп-кодон, составила 156 а.о., что соответствует аминокислотным позициям в белке с 484-й по 639-ю. В качестве референсной нами была выбрана последовательность β-фруктозидазы картофеля *S. tuberosum* из базы данных NCBI GenBank (NP_001274993.1).

Всего в исследуемых последовательностях было выявлено 27 сайтов замещений аминокислотных остатков (данные представлены в online версии статьи на сайте <http://www.agrobiology.ru>, табл. 2). При этом для большинства образцов оказалось характерно наличие одиночных аминокислотных замен. Вместе с тем у некоторых образцов мы обнаружили одинаковые наборы аминокислотных замен — единообразные аминокислотные паттерны. Так, общим аминокислотным паттерном характеризовались восемь сортов картофеля (Манифест, Арсена, Метеор, Лига, Бриз, Весна белая, Колобок и Зольский). Еще один общий аминокислотный паттерн был присущ для сортов Ароза, Крепыш, Дидар, Карасайский, Мирас и Каменский (см. <http://www.agrobiology.ru>, табл. 2).

Наибольшее число аминокислотных замен мы обнаружили у сорта Жуковский ранний (8 замен) и линий 165 (8 замен) и 162 (7 замен). Подавляющее большинство образцов имели 3-5 замен. Отсутствие аминокислотных замен в сравнении с референсной последовательностью было показано для сорта Фрителла и линии 84 (см. <http://www.agrobiology.ru>, табл. 2).

Анализируемые образцы картофеля разделились на три типа: первый тип — гомозиготные и, как следствие, имеющие один вариант аминокислотной последовательности (Улан, Астана, Фрителла, Огниво, Лилея, Холмогорский, Крепыш, Хозяюшка, Валентино, Наяда, Каменский, Брянский деликатесный, Леди Леди Клер, Ароза, Дидар, Карасайский, Мирас, Ушкониер, Спиридон, линия 84); второй тип — образцы с гетерозиготным состоянием нуклеотидных последовательностей, в которых выявленные SNPs не приводят к замещению аминокислотных остатков и изменению аминокислотной последовательности (сорта Башкирский и Очарование, линии 27 и 58); наконец, третий тип — сорта и линии, гетерозиготные по нуклеотидным последовательностям, у которых разные аллели гена кодируют неодинаковые аминокислотные последовательности (оставшиеся 34 сорта и 11 линий картофеля).

Ранее при анализе замен по конкретным аминокислотным сайтам было показано присутствие только двух вариантов аминокислотных остатков (17). В настоящей работе для подавляющего большинства выявленных полиморфных сайтов тоже было характерно наличие только двух вариантов аминокислотных остатков. Например, по положению 515 у всех изученных сортов и линий находился либо остаток треонина (Т), либо остаток лизина (К) (см. <http://www.agrobiology.ru>, табл. 2). Однако для двух сайтов в аминокислотной последовательности белка (аминокислотные остатки 629-й и 639-й) мы обнаружили наличие трех вариантов замен. Так, в положении 629 у сортов Ред Скарлет, Янтарь, Башкирский, Спиридон, Елизавета, Жуковский ранний и линии 9 находился глицин (G), у сорта Валентино — серин (S), у всех остальных сортов и линий — аланин (А). У сортов Фрителла, Чернский, Ред Скарлет, Красавчик, Холмогорский, Ньютон, Аладин, Надежда, Фаворит, Астана и линий 84, 58, 111, 152, 141, 7, 46, 162 632-м аминокислотным остатком в белке Rain-1 был аргинин (R), у сортов Лилея, Огниво, Янтарь, Ароза, Крепыш, Дидар, Карасайский, Мирас, Ка-

менский, Хозяюшка, Ушконира, Кортни, Елизавета, Кураж, Рябинушка, Вектор — пролин (P), у сортов Брянский деликатесный, Очарование, Клер, Наяда, Башкирский, Спиридон, Леди Розета и линии 27 — глутамин (Q). У остальных образцов аминокислотные остатки варьировали в зависимости от аллеля (см. <http://www.agrobiology.ru>, табл. 2).

Как уже отмечалось, наиболее важна замена SNP₁₅₄₄, которая приводит к замещению треонина лизином (T515K). При этом присутствие лизинового остатка коррелирует с высоким содержанием крахмала (17). Среди проанализированных образцов эту замену выявили у сортов казахстанской селекции Улан и Астана, а также в гетерозиготном состоянии у сортов Кузнечанка, Силеневый туман, Кортни, Елизавета, Кураж, Инноватор, Рябинушка, Жуковский ранний, Вектор и Фаворит.

Итак, нами проведен анализ нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы у 69 сортов и линий картофеля, которые ранее по этому признаку не исследовались. Показано наличие 42 SNPs, из которых 34 сайта описаны впервые. Представленные данные свидетельствуют о высокой степени полиморфизма фрагмента гена у изученных образцов. Выявлено наличие 78 аллельных вариантов фрагмента гена *Pain-1*, что в дальнейшем может использоваться в селекции для создания сортов с повышенным содержанием крахмала.

¹ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,
119071 Россия, г. Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2,
e-mail: shmelkoffa@gmail.com, ekochieva@yandex.ru, mashinmail@mail.ru ✉;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства
им. А.Г. Лорха,

140051 Россия, Московская обл., Люберецкий р-н, пос. Коренево-1,
ул. Лорха, 23,
e-mail: a-mela@mail.ru

Поступила в редакцию
2 октября 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 1, pp. 132-139

ALLELE DIVERSITY FOR ACID VACUOLAR INVERTASE GENE *Pain-1* FRAGMENT IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) VARIETIES AND LINES

M.A. Slugina¹, E.O. Shmelkova¹, A.A. Meleshin², E.Z. Kochieva¹

¹Research Center of Biotechnology RAS, Federal Agency for Scientific Organizations, 33/2, Leninskii prospect, Moscow, 119071 Russia, e-mail shmelkoffa@gmail.com, ekochieva@yandex.ru, mashinmail@mail.ru (✉ corresponding author);

²Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Farming, Federal Agency for Scientific Organizations, 23, ul. Lorkha, pos. Korenevo-1, Lyubertsy Region, Moscow Province, 140051 Russia, e-mail a-mela@mail.ru

ORCID:

Slugina M.A. orcid.org/0000-0003-1281-3837

Meleshin A.A. orcid.org/0000-0002-6018-3676

Shmelkova E.O. orcid.org/0000-0002-1046-7742

Kochieva E.Z. orcid.org/0000-0002-6091-0765

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Experiments were carried out using equipment of Bioengineering Center (Research Center of Biotechnology RAS)

Supported financially by the Complex Research Program for potato breeding and seed production

Received October 2, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.132eng

Abstract

The economic efficiency of potato production depends not only on the yield quantity and quality, but also on the tuber storage conditions. The tuber nutritional and technical value is determined by the starch content. Under the cold stress, the starch degrades into reducing sugars (cold-sweetening), which significantly reduces the tuber quality. Plant invertases catalyze irreversible hydrolysis of sucrose into glucose and fructose. Nowadays it is definitely known that vacuolar acid invertase (*Pain-1*) plays a major role in the cold induced sweetening of potato tubers. In the present work genetic diversity and allelic polymorphism of *Pain-1* gene associated with important agronomical traits of potato tubers is characterized. Gene fragment (exon 5—exon 7) polymorphism was analyzed in 69 cultivars and lines of Russian and foreign breeding origin. In the *Pain-1* nucleotide sequences, 66 SNPs were identified, of which 25 SNPs (SNP₁₆₂₈, SNP₁₆₄₈, SNP₁₇₀₀, SNP₁₇₀₉,

SNP₁₇₁₇, SNP₁₇₂₄, SNP₁₇₂₆, SNP₁₇₃₈, SNP₁₇₈₈, SNP₁₇₉₄, SNP₁₇₉₇, SNP₁₈₀₈, SNP₁₈₁₅, SNP₁₈₁₈, SNP₁₈₃₁, SNP₁₈₃₇, SNP₁₈₄₇, SNP₁₈₆₁, SNP₁₈₆₅, SNP₁₈₇₂, SNP₁₈₈₅, SNP₁₈₈₆, SNP₁₈₉₀, SNP₁₉₀₇, SNP₁₉₀₉) were described for the first time. The studied fragment contains a significant replacement for SNP1544 (C/A) which correlates with an increased starch content in the tubers and is homozygous in the Kazakhstani varieties Ulan and Astana. In the exons, 27 out of 42 SNPs led to amino acid substitutions. Most accessions had single amino acid substitutions. The maximum substitution number (seven to eight) characterized the Zhukovskii ranii variety and the lines 165 and 162. No substitutions were observed in the Frittella variety and the line 84. Therefore, the common level of gene fragment polymorphism in the analyzed potato accessions was shown to be rather high. Among the analyzed sequences, 78 allelic variants were described, including 64 specific variants and 14 variants common for several accessions. The obtained data may be helpful in potato breeding for an increase in starch content.

Keywords: acid vacuolar invertase, *Pain-1*, exons, polymorphism, SNPs, amino acid substitution, potato breeding, starch content in tubers, cold-induced sweetening.

REFERENCES

1. Van Harselaar J., Lorenz J., Senning M., Sonnewald U., Sonnewald S. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics*, 2017, 18: 37 (doi: 10.1186/s12864-016-3381-z).
2. Avigad G. Sucrose and other disaccharides. In: *Encyclopedia of plant physiology*. T.A. Loewus, W. Tanner (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, 1982.
3. Martin C., Smith A. Starch biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 971-985 (doi: 10.1105/tpc.7.7.971).
4. Bertoft E., Seetharaman K. Starch structure. In: *Starch: origins, structure and metabolism*. I.J. Tetlow (ed.). Society for Experimental Biology, London, 2002.
5. Ye J., Shakya R., Shrestha P., Rommens C. Tuber-specific silencing of the acid invertase gene substantially lowers the acrylamide-forming potential of potato. *J. Agr. Food Chem.*, 2010, 58(23): 12162-12167 (doi: 10.1021/jf1032262).
6. Wiberley-Bradford A., Busse J., Bethke P. Temperature-dependent regulation of sugar metabolism in wild-type and low-invertase transgenic chipping potatoes during and after cooling for low-temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 115: 60-71 (doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.12.020).
7. Liu X., Song B., Zhang H., Li X.Q., Xie C., Liu J. Cloning and molecular characterization of putative invertase inhibitor genes and their possible contributions to cold-induced sweetening of potato tubers. *Mol. Genet. Genomics*, 2010, 284: 147-159 (doi: 10.1007/s00438-010-0554-3).
8. Rausch T., Greiner S. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1696: 253-261 (doi: 10.1016/j.bbapap.2003.09.017).
9. Cheng S., Su Z., Xie C., Liu J. Effects of variation in activities of starch-sugar metabolic enzymes on reducing sugar accumulation and processing quality of potato tubers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 3: 1904-1910.
10. Halford N., Curtis T., Muttucumaru N., Postles J., Elmore J., Mottram D. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *J. Exp. Bot.*, 2012, 63(8): 2841-2851 (doi: 10.1093/jxb/ers011).
11. Shepherd L., Bradshaw J., Dale M., McNicol J., Pont S., Mottram D., Davies H. Variation in acrylamide producing potential in potato: segregation of the trait in a breeding population. *Food Chem.*, 2010, 123: 568-573 (doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.070).
12. Liu X., Zhang C., Ou Y., Lin Y., Song B., Xie C., Liu J., Li X.Q. Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, StvacINV1, regulates cold-induced sweetening of tubers. *Mol. Genet. Genomics*, 2011, 286(2): 109-118 (doi: 10.1007/s00438-011-0632-1).
13. Wu L., Bhaskar P.B., Busse J., Zhang R., Bethke P.C., Jiang J. Developing cold-chipping potato varieties by silencing the vacuolar invertase gene. *Crop Sci.*, 2011, 51: 981-990 (doi: 10.2135/cropsci2010.08.0473).
14. Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebu R., Davison S., Ray E.E., Daulhac A., Coffman A., Yabandith A., Retterath A., Haun W., Baltes N.J., Mathis L., Voytas D.F., Zhang F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.*, 2016, 14(1): 169-176 (doi: 10.1111/pbi.12370).
15. Bhaskar P., Wu L., Busse J., Whitty B., Hamernik A., Jansky S., Buell C., Bethke P., Jiang J. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiol.*, 2010, 154(2): 939-948 (doi: 10.1104/pp.110.162545).
16. Xin Z., Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell & Environment*, 2000, 23: 893-902 (doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x).
17. Draffehn A., Meller S., Li L., Gebhardt C. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. *BMC Plant Biol.*, 2010, 10: 271 (doi: 10.1186/1471-2229-10-271).

18. Slugina M.A., Snigir' E.A., Ryzhova N.N., Kochieva E.Z. *Molekulyarnaya biologiya*, 2013, 47(2): 243-250 (doi: 10.7868/S0026898413020146) (in Russ.).
19. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. TAI vacuolar invertase orthologs: the inter-specific variability in tomato plants (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Mol. Genet. Genomics*, 2017, 292(5): 1123-1138 (doi: 10.1007/s00438-017-1336-y).
20. Slugina M.A., Kochieva E.Z. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*, 2014, 18: 718-723 (in Russ.).
21. Li L., Tacke E., Hofferbert H., Lübeck J., Strahwald J., Draffehn A. Validation of candidate gene markers for marker-assisted selection of potato cultivars with improved tuber quality. *Theor. Appl. Genet.*, 2013, 126(4): 1039-1052 (doi: 10.1007/s00122-012-2035-z).
22. Liu X., Cheng S., Liu J., Ou Y., Song B., Zhang C., Lin Y., Li X., Xie C. The potato protease inhibitor gene, *St-Inh*, plays roles in the cold-induced sweetening of potato tubers by modulating invertase activity. *Postharvest Biol. Tec.*, 2013, 86: 265-271 (doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.07.001).
23. Bahaji A., Li J., Sánchez-Lypez B., Baroja-Fernández E., Mucoz F., Ovecka M., Almagro G., Montero M., Ezquer I., Etxeberria E., Pozueta-Romero J. Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. *Biotechnol. Adv.*, 2014, 32(1): 87-106 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.06.006).
24. Kochieva E.Z., Suprunova T.P. *Genetika*, 1999, 35: 1194-1197 (in Russ.).
25. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, 33(7): 1870-1874 (doi: 10.1093/molbev/msw054).