

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ  
БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН)

*На правах рукописи*

Быкова  
Анастасия Владимировна

**Структурно-функциональная характеристика генов, определяющих  
устойчивость картофеля к холодовому стрессу**

Специальность: 1.5.7. Генетика

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Кочиева Елена Зауровна

**Москва – 2026**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Крахмал. Метаболизм крахмала в запасующих органах и гены его контролирующие. ....	8
1.2. Картофельный крахмал: структура и свойства. ....	17
1.3. Холодовый стресс и холодовое осахаривание клубней картофеля. ....	21
1.4. Основные ферменты метаболизма крахмала и их участие в стрессовом ответе. ....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	53
2.1. Растительный материал. ....	53
2.2. Выделение ДНК, РНК и синтез кДНК. ....	54
2.3. Биохимический анализ. ....	55
2.4. Транскриптомный анализ. ....	56
2.5. Экспрессионный анализ. ....	57
2.6. Амплификация, клонирование и секвенирование.....	57
2.7. Статистический анализ. ....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. ....	59
3.1. Анализ транскриптомных изменений в клубнях картофеля при длительном воздействии холодового стресса.....	59
3.2. Изменение содержания углеводов (крахмала, редуцирующих сахаров) и динамики экспрессии генов углеводного обмена в клубнях сортов картофеля при длительном холодовом хранении.....	67
3.3. Определение паттернов экспрессии генов углеводного обмена в клубнях пяти сортов картофеля при длительном холодовом хранении. ....	68
3.4. Структурно-функциональная характеристика гена ингибитора амилаз клубнеобразующих видов картофеля. ....	73
3.5. Определение содержания углеводов и анализ экспрессии гена $\alpha$ -амилазы <i>StAmy23</i> в органах и тканях растений сортов картофеля.....	86
3.6. Изменение синтеза вторичных метаболитов и экспрессии генов, их кодирующих, у картофеля в условиях холодового стресса.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	147

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**АБК** – абсцизовая кислота

**ПЦР/PCR** – полимеразная цепная реакция

**РВ-ПЦР** – ПЦР в реальном времени

**ТФ** – транскрипционный фактор

**АТФ** – аденозинтрифосфат

**CIS** – холодовое осахаривание (cold-induced sweetening)

**RFLP** – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism)

**AFLP** – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphism)

**QTL** – локус количественного признака

**LTP** – белки-переносчики липидов (Lipid Transfer Proteins)

**SNP** – однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism)

**SWIN** – клеточная инвертаза (cell wall invertase)

**DEG** – дифференциально экспрессируемые гены (Differential Expressed Genes)

**п.н.** – пара нуклеотидов

**т.п.н.** – тысяч пар нуклеотидов

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Картофель *Solanum tuberosum* L. – широко культивируемая продовольственная культура. Наличие крахмала в клубнях картофеля определяет его использование в качестве пищевой, кормовой и технической культуры. Хранение клубней картофеля при низких температурах является неотъемлемой частью послеуборочной обработки культуры для продления срока хранения, уменьшения прорастания и гниения. В условиях РФ клубни обычно хранятся в картофелехранилищах при температуре 3-5°C до 6-8 месяцев, что определяется временем сбора клубней (сентябрь-октябрь) и посадки в следующем сезоне (апрель-май). При этом такой длительный холодовый стресс вызывает накопление редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) в клубнях, называемое холодовым осахариванием (CIS), что значительно ухудшает товарные и питательные свойства клубней картофеля (Chen et al., 2012; Zhang et al., 2017). Большинство исследований изменений в клубнях картофеля при действии низких температур по продолжительности не превышало трех месяцев (Menendez et al., 2002; Lin et al., 2019; Егорова и др., 2023; Zhang et al., 2024; Cui et al., 2025). Однако исследований молекулярно-генетических изменений, которые происходят в клубнях при более длительном хранении, соответствующем по длительности хранению в картофелехранилище, практически не проводилось. Отдельный интерес также представляет изучение влияния кратковременного холодового стресса на молодые растения картофеля, что часто происходит во время весенних возвратных похолоданий. Поэтому понимание молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе влияния холодового стресса, является важной научной и практической задачей. В связи с этим структурно-функциональный анализ генов, определяющих устойчивость картофеля к холодовому стрессу, крайне актуальный.

**Целью работы** является комплексное исследование молекулярных механизмов адаптации картофеля к холодовому стрессу, включая структурно-функциональный анализ генов углеводного обмена и биосинтеза вторичных метаболитов (каротиноиды, антоцианы). Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- провести транскрипционный анализ для определения основных групп генов, изменяющих экспрессию в клубнях картофеля в ответ на длительное холодовое воздействие (+3°C, 7 месяцев);
- определить изменения содержания углеводов (крахмала, сахаров) и вторичных метаболитов (каротиноиды, антоцианы) в клубнях различных сортов картофеля при длительном низкотемпературном стрессе;

- определить изменения профилей экспрессии генов углеводного обмена и биосинтеза вторичных метаболитов в клубнях и листьях сортов картофеля в ответ на длительный и кратковременный температурный стресс; установить возможные корреляции между содержанием углеводов и экспрессией генов углеводного обмена;
- провести структурно-функциональную характеристику генов амилаз, их ингибиторов, а также генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов у видов и сортов картофеля.

**Научная новизна** работы заключается в том, что:

- впервые был проведен транскриптомный анализ клубней картофеля при длительном холодовом стрессе (+3°C, 3,5 и 6,5 месяцев);
- впервые было определено изменение содержания основных углеводов (крахмал, сахара) и вторичных метаболитов (каротиноиды, антоцианы) в клубнях картофеля при длительном холодовом стрессе (+3°C, 4 и 7 месяцев);
- впервые были определены паттерны экспрессии основных генов метаболизма крахмала и биосинтеза каротиноидов и антоцианов в клубнях и листьях картофеля при кратковременном (+3°C, 48ч) и длительном холодовом стрессе (+3°C, 4 и 7 месяцев);
- впервые были охарактеризованы гены  $\alpha$ -амилаз и ингибиторов амилаз, генов фитоинсинтаз и генов биосинтеза антоцианов у видов и сортов картофеля.

**Теоретическая и практическая значимость** работы. Определены содержание углеводов, каротиноидов и антоцианов в клубнях и листьях картофеля при воздействии холодового стресса, особенности транскрипции генов углеводного обмена и биосинтеза вторичных метаболитов при стрессовом воздействии, дана их структурно-функциональная характеристика у видов и сортов картофеля. Результаты работы позволяют прояснить механизмы адаптации картофеля к холодовому стрессу и могут стать основой создания молекулярных маркеров, определяющих устойчивость сортов к холодовому осахариванию. Выявленные аллельные варианты (комбинации SNPs) гена *StAI* могут быть использованы для молекулярной паспортизации сортов картофеля.

**Методология и методы исследования.** Методология исследования основана на традиционных и современных методиках. В работе использованы следующие методы:

- методы биохимического анализа (спектрофотометрия: содержание крахмала, глюкозы, сахарозы, фруктозы, каротиноидов, антоцианов);
- методы молекулярного анализа (выделение ДНК (согласно Puchooa et al., 2004 с дополнительной депротеинизацией), выделение РНК/кДНК (RNeasy® Plant Mini Kit; RNase Free DNase I Set), ПЦР и ПЦР в реальном времени, клонирование (вектор pDrive Cloning Vector), приготовление библиотек для транскриптомного анализа (NEBNext® mRNA Library Prep), секвенирование по Сэнгеру);

- биоинформатические методы (программа MEGA 7.0 (выравнивание последовательностей, структурный и филогенетический анализ генов и белков), программа PROVEAN (предсказание влияния аминокислотных замещений), программа GraphPad Prism v. 8.02 (обработка результатов ПЦР-РВ), программа Phyre2 (предсказание вторичных/третичных структур белка), базы данных NCBI-CDD, UniProt, MEME 7.0.26 (анализ доменов, сайтов и мотивов белка), базы данных PlantCARE, PLACE (поиск регуляторных элементов).

**Положения, выносимые за защиту:**

- при длительном холодовом воздействии наиболее существенные изменения транскрипционной активности генов в клубнях картофеля происходят в период первых 3,5 месяцев;
- гены унипортеров SWEET (*SWEET 10*, *12* и *15*), глюкан эндо-1,3-β-глюкозидаз 8 и 13, α-галактозидазы 3 (*AGAL3*), галактуронозил трансферазы 8 (*GAUT8*), фруктозо-1,6-бифосфатазы (*FBPase*), фосфоглюканфосфатазы (*DSP4*) участвуют в ответе на холодовой стресс в клубнях картофеля;
- последовательности гена ингибитора амилаз *AI* у образцов дикорастущих видов и сортов картофеля высоко вариабельны;
- транскрипция всех трех генов фитоинсинтаз *StPSY* активируется в листьях картофеля в ответ на кратковременный холодовой стресс;
- уровень транскриптов 16 генов биосинтеза каротиноидов в клубнях сортов картофеля в динамике длительного холодового стресса резко снижается в период первых 3,5 месяцев стресса, что коррелирует с изменением содержания каротиноидов.

**Апробация результатов работы.** Результаты работы представлены на V и VI Вавиловской международной конференции (Санкт-Петербург, 2022, 2024), 26- и 28-ой Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2023, 2025), VII и VIII международных научных конференциях PlantGen (Казань, 2023, Новосибирск, 2025), VIII съезде ВГиС (Саратов, 2024), научно-практической конференции «ГЕНЕТИКА 2025» (Москва, 2025).

**Публикации результатов исследований.** Результаты работы опубликованы в 7 научных статьях, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК РФ. Работа выполнена при поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).

**Личный вклад соискателя.** Результаты получены лично соискателем или при его непосредственном участии. Соискателем самостоятельно были проанализированы литературные данные по тематике проводимого исследования, проведены лабораторные исследования и обработка полученных результатов. Совместно с научным руководителем осуществлялась постановка целей и задач и планирование эксперимента.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 156 страницах, включая 4 таблицы и 44 рисунка. Состоит из введения, основной части, заключения, приложений, списка литературы (включает 310 источников).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Крахмал. Метаболизм крахмала в запасующих органах и гены его контролирующие.

Крахмал представляет собой нерастворимый неструктурированный углевод, состоящий из полимеров  $\alpha$ -глюкозы. Крахмал является основным запасующим углеводом растений и синтезируется всеми зелеными растениями для накопления энергии, вырабатываемой в процессе фотосинтеза. С точки зрения физиологии важно, что в случае крахмала энергия накапливается в осмотически инертной форме (Cenci et al., 2014). Являясь основным полисахаридом для хранения, крахмал накапливается преимущественно в клубнях, корнях и семенах растений важных сельскохозяйственных культур, используемых во всем мире в качестве основных продуктов питания (Tester et al., 2004). В зависимости от биологических функций, крахмал часто подразделяют на два типа: крахмал временного хранения, так называемый транзиторный (transitory starch) и запасной или резервный крахмал (storage starch). Транзиторный крахмал синтезируется в клетках фотосинтезирующих тканей в световой период и разлагается в темновую фазу для поддержания клеточного метаболизма. Запасной крахмал синтезируется и накапливается в нефотосинтетических тканях (Cenci et al., 2014; Сергеева и др., 2022). Ремобилизация крахмала происходит во время прорастания, роста всходов и т.п., когда фотосинтез не может удовлетворить потребность в энергии в углеводах для биосинтеза других молекул. Запасной крахмал составляет до 70% сухого веса зерен злаков и корней кассавы *Manihot esculenta* Crantz (Lafiandra et al., 2014). Именно запасной крахмал употребляется в пищу человеком и используется в промышленных целях (Tester et al., 2004).

Функционально крахмал можно рассматривать как полисахарид, синтезированный способом, обеспечивающим его достаточно быстрое и эффективное расщепление. С этой точки зрения биосинтез крахмальных гранул представляет своеобразный баланс между эффективной упаковкой глюкановых цепей и возможностью быстрого разрушения этих структур при разложении (Pfister and Zeeman, 2016). У зерновых, бобовых и клубневых/корнеплодных культурах, таких как картофель, гранулы крахмала синтезируются внутри амилопластов в клетках эндосперма (зерновые культуры), семядолей (бобовые культуры) или паренхимы (клубневые и корнеплодные культуры). Размер и количество крахмальных гранул в амилопластах зависит от вида растения, в то время как размер самого амилопласта зависит от количества хранимого крахмала, который в свою очередь зависит от типа ткани или органа растения (de Pater et al., 2006; Shapter et al., 2008). В запасующих органах во время роста клеток амилопласт остается



неповрежденным, однако, как только зерно или клубень начинают прорастать, мембрана разрушается и ферменты, ответственные за распад крахмала, остаются иммобилизованными на поверхности гранул для начала процесса гидролиза (Shewry and Morell, 2001; Evers and Millar, 2002; Shannon et al., 2009).

Биосинтез крахмала в картофеле предполагает скоординированное действие нескольких классов ферментов и субстратов. С начала XXI века с использованием современных молекулярных и биоинформационных методов были сформированы представления о генных и белковых сетях, определяющих пути метаболизма крахмала не только у модельных видов растений, но и у значимых сельскохозяйственных культур, как однодольных, так и двудольных, в том числе и картофеля *S. tuberosum* (Pfister and Zeeman, 2016; Van Harsselaere et al., 2017; López-González et al., 2019; Tong et al., 2023; Li et al., 2024; Shirani-Bidabadi et al., 2024 и др.)

Было показано, что у растений метаболизм крахмала, включающий биосинтез и распад, проходит по аналогичному пути с участием сходного набора гомологичных генов и ферментов, вне зависимости от вида растений и отличия скорее минорные. Как результат этих исследований, например, у картофеля *S. tuberosum* было идентифицировано и картировано более 75 генов, ассоциированных с метаболизмом крахмала, включая крахмалсинтазы, крахмал-деветвящие и крахмал-разветвляющие и ферменты (Слугина и др., 2018; Li et al., 2024; Ahmad et al., 2024). Роль в метаболизме крахмала ряда ключевых ферментов, таких как АДФ-глюкозопирофосфорилаза, некоторых крахмалсинтаз и крахмал-разветвляющих ферментов, описана достаточно детально (Tetlow et al., 2004; Tetlow and Bertoft, 2020), другие гены и белки охарактеризованы неполно, особенно мало известно о регуляторных белках и механизмах регулирования биосинтеза (Сергеева и др., 2022; Ahmad et al., 2024).

### 1.1.1. Биосинтез крахмала.

Биосинтез крахмала представляет собой сложный и строго регулируемый процесс, для которого необходима правильно скоординированная активность множества ферментов. Процесс синтеза крахмала можно разделить на несколько последовательных этапов, включающих: транспорт сахарозы в запасующие ткани, прайминг молекулы сахарозы и начало синтеза крахмальных цепей и их удлинение, разветвление и окончание формирования гранулы крахмала и последующее фосфорилирование крахмальных цепей.

*Активация сахара и регулирование синтеза.* Биосинтез крахмала в запасующих тканях растений начинается с транспортировки сахарозы из мест синтеза — хлоропластов листьев, в органы хранения. После синтеза (в процессе фотосинтеза) сахароза выступает в

качестве основного транспортного сахара, эффективно перемещаясь через симпласт или апопласт в ткани запасующих органов или для дальнейшего расщепления (Zeeman et al., 2010; Bertoft and Blennow, 2016; Слугина и др., 2018). В клетки клубня сахароза попадает по апопласту и в межклетниках гидролизуется апопластными инвертазами клеточной стенки (CWIN) с образованием глюкозы и фруктозы, которые далее попадают в цитоплазму клетки запасующих органов с помощью гексозотранспортеров (Glc/H<sup>+</sup> symporter) (Ruan, 2014) (рис. 1). В случае симпластного пути для доставки сахарозы в клетки используются сахарозотранспортеры семейства унипортеров SWEET. Далее с помощью сахарозолитических ферментов в сахарозосинтазы SUS/SuSy и инвертазы CIN происходит распад до фруктозы и УДФ-глюкозы (Сергеева и др., 2022). На сегодняшний день полностью не доказано, что происходит с образовавшейся УДФ-глюкозой. Она, предположительно, может сразу преобразоваться в глюкозо-1-фосфат G1P, или сначала преобразуется в глюкозо-6-фосфат G6P и далее в виде G6P с использованием триозо-6-фосфатного транслокатора переносится в амилопласт (Bahaji et al., 2014; Сергеева и др., 2022) (рис. 1).

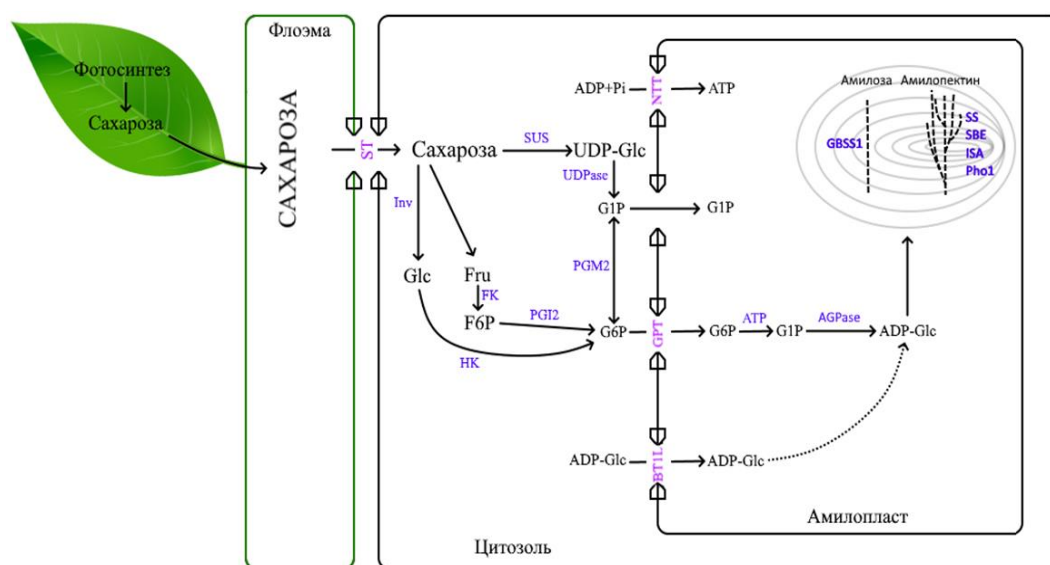


Рисунок 1 – Схема синтеза крахмала в запасующих органах (клубнях) картофеля. Углеводы: Glc – глюкоза, Fru – фруктоза, G1P – глюкозо-1-фосфат, F6P – фруктозо-6-фосфат, G6P – глюкозо-6-фосфат, ADP-Glc – АДФ-глюкоза, UDP-Glc – УДФ-глюкоза, *Транспортерные белки*: ST – транспортер сахарозы, NTT – АТФ-АДФ антипортер, GPT – транслокатор глюкозо-6-фосфата, BT1L – Brittle1-подобный транспортер. *Ферменты*: SUS – сахарозосинтаза, Inv – инвертаза, FK – фруктокиназа, HK – гексокиназа, PGI – фосфоглюкоизомераза, UDPase – УДФ-глюкозопирофосфорилаза, PGM – фосфоглюкомутаза, ATP – аденозин-три-фосфат, AGPase – АДФ-глюкозопирофосфорилаза, GBSS – гранулосвязанная крахмалсинтаза, SS – крахмалсинтаза, SBE – крахмалветвящий фермент, ISA – изоамилаза, PHO – α-глицанфосфорилаза (основываясь на Bahaji et al., 2014, Сергеева и др., 2022).

Перенос G1P и G6P в амилопласт осуществляют белки GPT1 и GPT2 - специальные транслокаторы глюкозо-6-фосфата (рис. 1). Так как биосинтез крахмала зависит от АТФ, то важную роль также играют его белки-транслокаторы NTT1 и NTT2 (Tjaden et al., 1998; Andersson et al., 2018). Также, на основании полученных данных, было выдвинуто предположение о возможном дополнительном пути импорта гексозы в амилопласты клубней картофеля, включающем прямой транспорт (G1P), аналогично таковому у *Arabidopsis thaliana* L., хотя конкретный белок-переносчик в случае *S. tuberosum* идентифицирован не был (Malinova et al., 2020).

Первой реакцией биосинтеза крахмала в амилопласте является образование ферментом АДФ-глюкозопирофосфорилазой (AGPase) из глюкозо-1-фосфата и АТФ АДФ-глюкозы (ADP-Glc) (Ball and Morell, 2003). Образующийся пирофосфат PP<sub>i</sub> расщепляется пирофосфатазой (PPase), что положительно влияет на накопление крахмала в клубнях (George et al., 2010).

*Синтез цепей амилозы и амилопектина.* В синтезе крахмальных цепей участвуют крахмалсинтазы (SSs), крахмалветвящие (SBEs) и крахмал деветвящие ферменты (SDBEs) (Сергеева и др., 2022). Данные белки в большинстве своем представлены различными изоформами с одинаковой или сходными функциями (Pfister and Zeeman, 2016).

Удлинение крахмальных цепей происходит в результате действия ферментов крахмалсинтаз SSs, которые кодируются, по меньшей мере, шестью классами гомологичных генов (SS1-6). Сахарозосинтазы можно разделить на два типа, исходя из их функций в синтезе крахмальных цепей. Грануло связанные крахмалсинтазы GBSS катализируют синтез длинных цепей амилозы, а синтез коротких цепей амилопектина осуществляют крахмалсинтазы SS (soluble starch synthases) (Pfister and Zeeman, 2016, Сергеева и др., 2022). В качестве субстрата крахмалсинтазы используют ADP-Glc, продуцируемый AGPase, и катализируют образование новых гликозидных связей путем переноса глюкозных фрагментов ADP-Glc на невосстанавливающий конец существующей  $\alpha$ -1,4-глюкановой цепи.

На сегодняшний момент не совсем понятен механизм инициации образования гранулы крахмала. Как было показано при исследовании первой стадии образования крахмальной гранулы, начальной точкой роста являются мальтоолигосахариды, и образование крахмальной гранулы катализируются растворимыми SS (SS4, SS5, SS6) (Mérida and Fettke, 2021). В удлинении цепей наиболее значимыми являются ферменты SS1, SS2 и SS3 (Pfister and Zeeman, 2016). Также было показано, что связь между молекулами ADP-Glc, SS-белками и растущей крахмальной гранулой осуществляется с

помощью специальных направляющих белков PTST1 и PTST2, которые, как показано для арабидопсиса, также вовлечены в инициацию формирования гранул (Seung et al., 2017).

Поскольку крахмалсинтазы SS непрерывно удлиняют цепи амилозы и амилопектина, другая группа – крахмалветвящие ферменты SBE гидролизуют  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи, образуемые белками SS и вводят боковые ответвления, повышающие разветвленность крахмальной молекулы. SBE3 преимущественно синтезирует длинные боковые цепи амилопектина, а SBE2 – короткие, что в конечном итоге приводит к формированию сложной разветвленной структуры из линейной (Tetlow and Bertoft, 2020).

*Разветвление и окончание созревания крахмальной гранулы.* Ключевым этапом в остановке синтеза и в формировании крахмальных гранул является преобразование разветвленных глюканов амилозы и амилопектина в формы, пригодные для кристаллизации. Этот этап осуществляется с помощью третьей группы белков биосинтеза крахмала – крахмал деветвящих ферментов DBE (=SDBE) (Pfister and Zeeman, 2016).

Крахмал деветвящие ферменты ISAs катализируют гидролиз  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей амилопектина, тем самым снимают избыточное ветвление крахмальной гранулы. У *S. tuberosum* было выявлено несколько изоформ StISA1, StISA2, StISA3, которые могут образовывать гетеромультимерные комплексы и ускорять формирование кристаллических структур амилопектина (Hussain et al., 2003).

До конца роль DBE ферментов (к которым помимо изоамилаз относят и пуллиназы, участвующие в распаде крахмала) не определена. В биосинтезе амилопектина участвуют два типа DBE - изоамилаза (ISA) и пуллуланаза (PUL). Подавление активности ISA приводит к образованию сильно разветвленных амилопектинов, что свидетельствует об их жизненно важной роли в формировании правильной структуры амилопектина и крахмальной гранулы (Bustos et al., 2004). Предполагается, что именно PUL обеспечивает удаление неправильно расположенных ветвей амилопектина. В недавнем исследовании подчеркивалась важность PUL для снижения содержания амилопектина путем разветвления, что приводит к увеличению содержания амилозы в клубнях картофеля при холодовом стрессе (Thakur et al., 2021; Castellanos et al., 2023). Предполагается, что DBE участвуют в синтезе крахмала, выполняя "очищающую" роль, убирая из стромы растворимый глюкан, который не прикреплен к грануле, а также активность DBE может быть связана с удалением неправильно расположенных ответвлений амилопектина, образующихся на поверхности растущих крахмальных гранул, которые могли бы препятствовать формированию гранулы (Tetlow et al., 2004; Castellanos et al., 2023).

*Фосфорилирование крахмала.* Крахмалфосфорилазы ( $\alpha$ -гликан фосфорилазы) катализируют перенос глюкозильных звеньев с Glc-1-P на невосстанавливающий конец  $\alpha$ -

1,4-связанных гликановых цепей (Pfister and Zeeman, 2016). Направление реакции (биосинтез или фосфороллиз) зависит от относительных концентраций субстратов и продуктов в конкретном клеточном компартменте. В настоящее время идентифицированы два типа крахмалфосфоорилаз растений: *PHO1* и *PHO2*, которые локализуются в пластиде и цитозоле соответственно. Различные исследования показали, что только *PHO1* участвует в накоплении крахмала в запасующих органах многих видов растений путем поддержания запасов пластидиального мальтодекстрина (Nakamura et al., 2017, Merida and Fettke, 2021; Shoaib et al., 2021). Предполагается, что у арабидопсиса PHS1, гомолог *Pho1*, является частью основного набора ферментов, участвующих в образовании крахмальных гранул (Merida and Fettke, 2021). Показано, что *PHO1* может образовывать комплексы с несколькими SS и SBE белками, тем самым влияя на синтез крахмала в эндосперме зерна некоторых злаков (Tetlow et al., 2008; Nakamura et al., 2017). Считается, что *PHO1* действует на поверхности гранул, где он фосфоролитически изменяет структуру крахмала (Tetlow et al., 2004; Jeon et al., 2010). Мутанты риса *Oriza sativa* L. *pho1* имели зерна со сморщенным эндоспермом и белесой сердцевинкой из-за более мелких гранул крахмала и более высокую долю коротких цепей глюкоана (Jeon et al., 2010). Также показана роль *PHO1* в клубнях батата и картофеля, особенно при холодовом стрессе (Fettke et al., 2012). Предполагается, что при холодовом стрессе в клубнях картофеля в условиях пониженных температур высокая каталитическая активность *PHO1* обеспечивает дополнительный фосфоорилазный путь биосинтеза крахмала (Fettke et al., 2012; Slugina et al., 2020; Merida and Fettke, 2021).

### 1.1.2. Деградация крахмала.

Разложение крахмала является частью общего процесса метаболизма крахмала, который в разной степени происходит во всех крахмалсодержащих пластидах. Деградация крахмала обеспечивает растение углеводами и энергией, необходимые для его роста и развития, что особенно важно в случае крахмала запасующих органов, таких как семена или клубни. Было показано, что растения с пониженной способностью к деградациии крахмала имеют сниженные темпы роста (Smith et al., 2005). Как и в случае с процессом биосинтеза крахмала, описанного выше, большинство ферментов, участвующих в процессе разложения крахмала известны, но детали их функционирования и регулирования изучены недостаточно.

Выделяют два основных этапа деградациии крахмала в амилопластах: инициация разложения и расщепление амилопектина до коротких линейных мальто-олигосахаридов, которые расщепляются затем до моносахаридов мальтозы, глюкозы и мальтотриозы.

Основными ферментами крахмального гидролиза в запасющих органах являются амилазы, крахмал фосфорилазы Pho, гликан-водные дикиназы GWD/PWD, фосфогликанфосфатазы (LSF, SEX) (Smith et al., 2005; Streb and Zeeman, 2012; Сергеева и др., 2022) (рис. 2).

Поскольку амилазы, основные ферменты, расщепляющий крахмал, не в состоянии непосредственно воздействовать на упорядоченную полукристаллическую поверхность крахмальных гранул, инициация распада крахмала затруднена. Поэтому инициация деградации гранул начинается с фосфорилирования глюкозных остатков амилозных и амилопектиновых цепей, в результате чего крахмальная гранула становится более рыхлой за счет повышенной гидрофильности, делая их более доступными для воздействия амилаз.

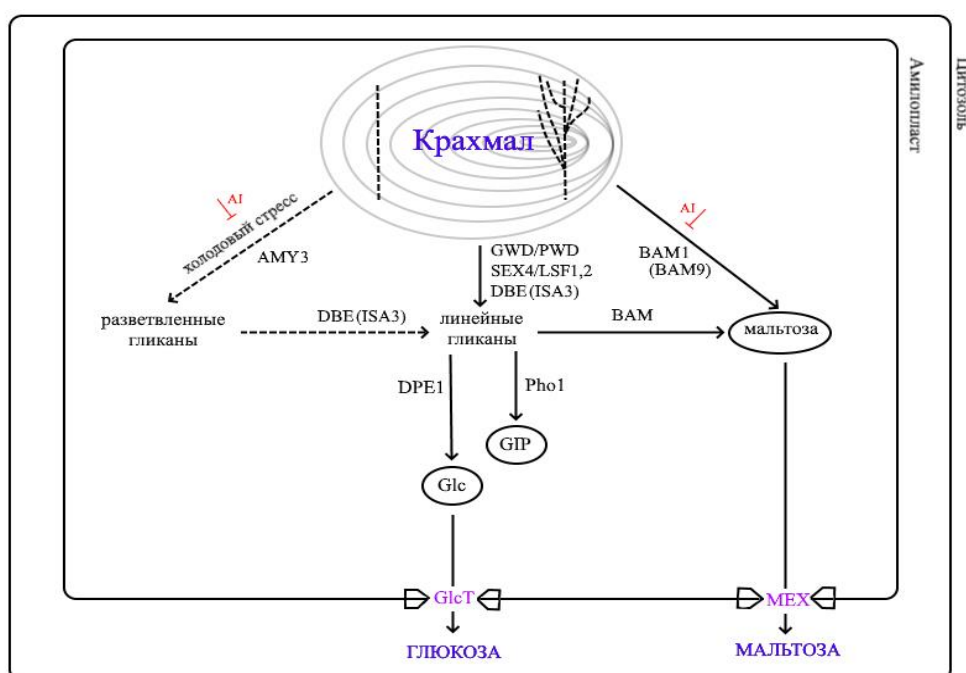


Рисунок 2 – Схема гидролиза крахмала в клубнях картофеля.

Glc – глюкоза, G1P – глюкозо-1-фосфат, AMY –  $\alpha$ -амилаза, BAM –  $\beta$ -амилаза, AI – ингибитор амилаз, GWD/PWD – гликан-водные дикиназы, SEX/LSF – фосфогликанфосфатазы, ISA – изоамилаза, DPE – 4- $\alpha$ -гликанотрансфераза, MEX – мальтозо- и GlcT – глюкозотранспортеры.

Гидролиз гранулы начинают водные дикиназы GWD и PWD путем фосфорилирования по С6- и С3-положениям поверхностных глюканов, переводя их в более растворимое состояние. Это крайне важно для крахмал гидролаз, прежде всего  $\beta$ -амилаз (BAM). Более того, было доказано, что фосфорилирование поверхностных глюканов гранулы с помощью GWD повышает ферментативную активность BAM-белков (Monroe, 2020). Другая дикиназа, фосфогликан-водная дикиназа PWD, фосфорилирует исключительно С3-позиции глюкозильного звена в амилопектине. Аналогично было

показано, что снижение экспрессии гена *StGWD* картофеля коррелирует со снижением разложения крахмала в клубнях при холодовом стрессе. Это свидетельствует о главенствующей роли именно фосфорилирования белком GWD в распаде крахмала, по крайней мере, в клубнях и листьях картофеля (Orzechowski et al., 2021; Li et al., 2024).

На следующей стадии деградации крахмальных гранул происходит расщепление полисахаридных цепей. После активации дикиназами GWD и PWD, преобразующими структуру амилопектина и амилозы, амилазы катализируют их распад до линейных мальтоолигосахаридов. Хотя крахмал может разрушаться двумя путями — гидролитическим и фосфоролитическим, доминирующим механизмом считается гидролиз, осуществляемый ферментами амилазного комплекса (Zeeman et al., 2010). Амилазы являются 1,4- $\alpha$ -D-глюканогидролазами и гидролизуют крахмал с образованием мальтоолигосахаров (глюкоза, мальтоза, декстрин). Выделяют экзо- ( $\beta$ -) и эндо- ( $\alpha$ -) амилазы. Экзоамилазы гидролизуют невосстанавливающий конец крахмальной цепи, в то время как эндоамилазы гидролизуют гликозидные связи внутри молекулы крахмала (Kamon et al., 2015).  $\alpha$  – амилазы (AMY) действует как на амилозу, так и на амилопектин и произвольно отсекают  $\alpha$ -1,4-цепь внутри сахарной цепи без различия субстрата.  $\beta$ -амилазы приводят к гидролизу  $\alpha$ -1,4-звена крахмала, расположенному рядом с невосстанавливаемым концом  $\alpha$ -глюкана, в результате чего единственным низкомолекулярным продуктом гидролиза является мальтоза. Оба фермента не могут действовать на  $\alpha$ -1,6 цепи (Yu et al., 2005; Derde et al., 2012). Исследование геномов различных растений показало, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы представлены большим числом функционально различных изоформ, включающих как структурные гены с гидролазной функцией, так и регуляторные гены (Duan et al., 2013; Vatansever et al., 2016; Van Harsselaar et al., 2017; Yue et al., 2019; Yang et al., 2023). Так, показано, что белки AMY3 могут быть ответственны за расщепление всех форм связанного с пластидами крахмала, как в хлоропластах, так и в запасующих органах. AMY2 (AMY23 у *S. tuberosum*), возможно, могут быть связаны с гидролизом крахмала в запасующих органах в ответ на низкие температуры, а AMY1 участвуют в расщеплении внеклеточного крахмала (Stanley et al., 2002; Hou et al., 2017). Было показано, что AMY3, как эндоамилаза, может расщеплять крахмальные цепи внутри точек разветвления, высвобождая ряд линейных и разветвленных мальтоолигосахаридов (Streb and Zeeman, 2012; Seung et al., 2013).

ВАМ-белки изучены достаточно слабо. В настоящее время показано, что в гидролизе крахмала участвуют, прежде всего, ферменты ВАМ1 и ВАМ3 (Fulton et al., 2008). Для белков ВАМ1 и ВАМ9 (ВАМ4) показано участие в гидролизе крахмала

клубней картофеля при холодовом стрессе (Hou et al., 2017; Monroe and Storm, 2018; Thalmann et al., 2019).

Точки разветвления гидролизуются крахмал-деветвящими ферментами ISA3 и лимитирующей декстриназой LDA, преимущественно удаляющими внешние цепи амилопектина, ранее укороченные BAM (Hussain et al., 2003; Takashima et al., 2007).

Одновременно с тем как картофельная гранула подвергается гидролизу амилазами, происходит ее дефосфорилирование, что повышает доступ к внутренним частям гранулы, увеличивая растворимость. Этот процесс осуществляют фосфогликанфосфатазами двух типов: SEX4 (Starch Excess) и LSF2 (LIKE SEX FOUR2), где SEX4 преимущественно гидролизует С6-фосфат крахмальных гранул, в то время как LSF2 обладает строгой специфичностью к С3-фосфату (Santelia et al., 2011). В случае картофеля было показано, что ингибирование генов *StSEX4* или *StLSF2* уменьшало гидролиз крахмала в листьях трансгенных растений, но не изменяло количество крахмала в клубнях, хотя и приводило к уменьшению размера крахмальных гранул (Samodien et al., 2018). Также было показано, что LSF1, энзиматически нефункциональный гомолог LSF2, выступает в качестве своеобразного каркаса, помогая  $\beta$ -амилазам BAM связываться с поверхностью гранул крахмала, возможно, в местах фосфорилирования глюкана (Schreier et al., 2019).

Ферменты, участвующие в фосфорилировании и дефосфорилировании глюкана, работают синергически с глюкангидролазами. Эксперименты *in vitro* показали, что деградация крахмала ISA3 и BAM3 стимулируется активностью GWD, но также и то, что активность GWD стимулируется  $\beta$ -амилолизом (Edner et al., 2007). Также в экспериментах *in vitro* показано, что в циклах фосфорилирования/дефосфорилирования глюкана SEX4 усиливает деградацию крахмала ферментами ISA3 и BAM3 (Kötting et al., 2009).

Продуктом действия амилаз являются различные мальтоолигосахариды (МОС) и фермент  $\alpha$ -d-глюканотрансфераза DPE1 (диспропорционирующий фермент). DPE1 участвует главным образом в разложении крахмала, перенося мальтозные звенья от одного 1,4- $\alpha$ -d-глюкана к другому и, изменяя распределение молекул МОС по размерам, потенциально создает подходящие субстраты для других ферментов метаболизма крахмала. Создание более крупных молекул МОС из небольших молекул обеспечивает субстраты для ферментов, разрушающих крахмал, таких как крахмалфосфорилаза и  $\beta$ -амилаза, которые действуют преимущественно или исключительно на более крупные молекулы МОС. Снижение активности DPE1 в растениях трансгенного картофеля заметно не изменяет содержание крахмала в клубнях, однако происходит задержка прорастания клубней и роста побегов. Это свидетельствует о том, что крахмал в таких растениях



мобилизуется менее эффективно, что согласуется с предположением о том, что фермент DPE играет определенную роль в расщеплении крахмала (Takaha et al., 1998).

Таким образом, кратко деградацию крахмала можно свести к следующим этапам:  $\alpha$ -гликан-водная дикиназа GWD и фосфогликан-водная дикиназа PWD фосфорилируют глюкозные звенья в положениях C6 и C3 соответственно, и тем самым солюбилизируют поверхность гранул. BAM1 расщепляет линейные цепи на мальтозу с помощью LSF1, который, как предполагается, способствует прикреплению  $\beta$ -амилаз к крахмальной грануле. Расщепление коротких цепей, не расщепленных BAMs, осуществляется ISA3 и LDA, в то время как фосфатные группы, которые препятствуют действию BAM, удаляются с помощью LSF2 и SEX4. AMY3 высвобождает множество разветвленных и линейных глюкоанов. BAM9/BAM4 способствует/регулирует процесс распада с помощью пока неизвестного механизма (рис. 2).

В результате разложения крахмала в амилопластах клетках запасяющих органов образуются мальтоза, глюкоза и мальтотриоза, которые используя мальтозотранспортеры MEX и глюкозотранспортеры GlcT, перемещаются в цитозоль для дальнейшего использования растением, в случае картофеля при прорастании глазков клубня.

## 1.2. Картофельный крахмал: структура и свойства.

Среди сельскохозяйственных культур картофель имеет особое значение, поскольку он может накапливать необычно большое количество крахмала, причем клубни картофеля иногда содержат более половины своего сухого веса в виде крахмала (Bertoft and Blennow, 2016). В целом, свежие клубни картофеля содержат около 20% сухого вещества, 60-80% из которого составляет крахмал (Bertoft and Blennow, 2016). Таким образом, картофель представляет собой важный источник крахмала, спрос на производство которого ежегодно растет. Ожидается, что к 2027 году мировой рынок картофельного крахмала достигнет 7,36 миллиарда долларов, а среднегодовой темп роста составит 4,17% (Markets, 2023).

*Гранулы крахмала.* Гранулы крахмала картофеля различны по форме и размерам. Они имеют круглую, овальную, эллиптическую и неправильную форму, которая отличается от гранул крахмала зерновых культур, таких как кукуруза, пшеница и рис, которые обычно имеют сферическую или многогранную форму (Wang et al., 2016). Гранулы картофельного крахмала крупнее гранул зернового крахмала и имеют достаточно большой диапазон размеров (5-100 мкм) (Neeraj et al., 2021). Помимо разнообразия форм и размеров на свойства крахмала влияет внутренняя структура крахмальных гранул. Гранулы крахмала в основном состоят из двух полимеров глюкоана: амилозы и

амилопектина. Именно они и определяют уникальные структурные и физико-химические свойства крахмала (рис. 3).

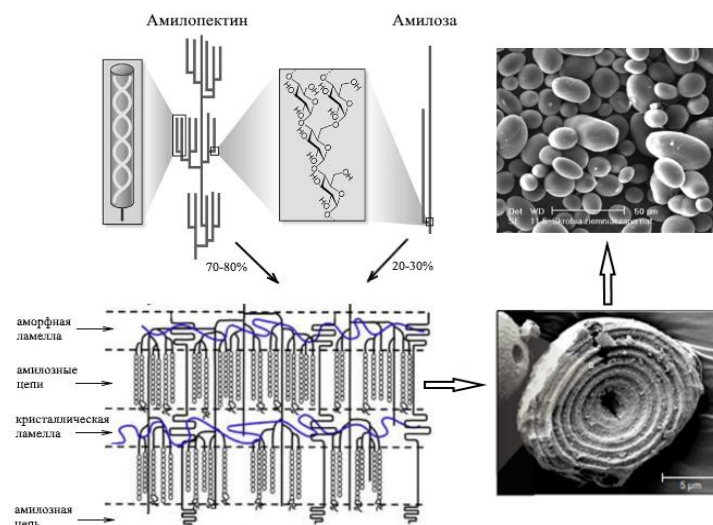


Рисунок 3 – Молекулярная структура крахмальных гранул (по Szymońska et al., 2009; Seung and Smith, 2019; Diaz-Baca and Fatehi, 2024). На картинках справа изображения гранул крахмала, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа.

Амилоза в основном состоит из линейных цепочек  $\alpha$ -1,4-связанных глюкозных звеньев с некоторыми случайными ответвлениями. Амилопектин содержит  $\alpha$ -1,4-связанные глюкозные соединения, которые образуют как протяженные цепи, так и сильно разветвленные  $\alpha$ -1,6-связи (Zeeman et al., 2010). Основным компонентом крахмала в целом является амилопектин (70-80% по массе) (Noda et al., 2005). На разветвленные  $\alpha$ -(1,6)связи приходится 4-6%, что делает амилопектин сильно разветвленным. Другим компонентом крахмала является амилоза (20-30% по массе). Молекула амилозы значительно меньше амилопектина и, по сути, представляет собой линейный полимер со средней молекулярной массой 160 000 и состоящий из цепочек по 2000-5000 остатков (Vamadevan and Bertoft, 2015). Выделяют два типа - линейную и разветвленную амилозу (рис. 3).

Помимо полисахаридов, картофельный крахмал содержит небольшое количество неуглеводных компонентов. Так, менее 0,5% гранул составляют белки, которые, по-видимому, в основном участвуют в синтезе крахмала (Yusuph et al., 2003). Липиды практически отсутствуют в крахмале картофеля и некоторых других крахмалов клубней и корнеплодов, но присутствуют в составе крахмалов злаков (Hoover, 2001). Картофельный крахмал содержит фосфор в форме фосфата, ковалентно связанного с амилопектиновыми цепями, что влияет на свойства картофельного крахмала (Bertoft, 2017).

Степень упорядоченности внутри кристаллических областей, влияющей на расположение и взаимодействие двойных спиралей внутри гранул определяется относительной кристаллическостью, которая у сортов картофеля может колебаться от 20,8

до 36,3% (Cho and Kang, 2020). Картофельный крахмал преимущественно имеет кристаллическую форму с ячеистой структурой, повышающую его способность связывать воду. Липиды внутри гранул положительно влияют на стабильность структуры, также улучшая ее функциональные свойства (Wang et al., 2020).

Несмотря на большое разнообразие размеров и форм крахмальных гранул разных растений, их внутренняя организация удивительно схожа. В клубне картофеля, как и у других растений, гранулы крахмала находятся в амилопластах клеток. Их рост стимулируется образованием своеобразных «колец роста», внутри которых гранулы организованы в чередующиеся аморфные и полукристаллические слои, что отражает своеобразный ритмичный процесс биосинтеза крахмала (Zeeman et al., 2010; Yang et al., 2018). Толщина колец составляет 100-400 нм. Считается, что физическое состояние амилозы является аморфным, и поэтому она содержится в аморфных частях гранул. Однако она не отделена от амилопектина и было показано, что амилоза химически сшивается с амилопектином, и, следовательно, эти два компонента находятся бок о бок внутри гранул. Точная структура амилозы в гранулах из разных растений может отличаться и зависит от содержания амилозы в гранулах (Kozlov et al., 2007). Основным компонентом полукристаллических колец является амилопектин, который, благодаря своим сравнительно коротким цепочкам, способствует образованию характерных скоплений тонких чередующихся кристаллических и аморфных пластинок (рис. 3). Аморфные пластинки содержат большую часть разветвленной внутренней структуры кластеров коротких цепочек, тогда как внешние цепочки кластеров образуют левосторонние двойные спирали. Показано, что компоненты в сердцевине картофельных гранул ориентированы лишь частично, но сильно ориентированы к периферии, что способствует очень компактной структуре поверхности гранул. Напротив, гранулы крахмала злаков ориентированы слабо, если вообще ориентированы (Tong et al., 2023).

Параллельные боковые цепи, расположенные рядом с линейной амилозой, распределены в полукристаллической матрице, образованной амилопектином, и эта организация лежит в основе полукристаллической структуры крахмала (рис. 3). Таким образом, соотношение амилозы и амилопектина оказывает существенное влияние на внешний вид и структуру гранул крахмала, а также влияет на качество органов для хранения урожая, производство пищевых продуктов и их промышленное применение.

Крахмал клубней картофеля состоит из популяции гранул различного размера: крупных, средних и маленьких и разброс их размеров достаточно широк от 1 мкм до 100 мкм (Burke, 2023). При этом средний размер гранул колеблется от 1 до 20 мкм для мелких и от 20 до 110 мкм для крупных гранул. В то же время для кукурузы размер гранул

крахмала колеблется от 1 до 7 мкм для мелких гранул и от 15 до 20 мкм для крупных гранул (Singh et al., 2016). Было показано, что размер гранул крахмала может влиять на растворимость в воде, способность к набуханию и реологические свойства, которые важны для определения функциональности крахмала в пищевых продуктах (Xie et al., 2024). Так было обнаружено, что пластидная фосфорилаза крахмала (Pho1a) непосредственно отвечает за нормальный размер гранул и их вязкость, а процесс образования и размер гранул регулируется гетеро-мультимерной изоамилазой (StISA1/StISA2) (Bustos et al., 2004; Sharma et al., 2023).

Как было упомянуто выше, крахмальные гранулы состоят из цепей амилопектина и амилозы. Амилопектин является основным компонентом крахмала картофеля, составляя 70-80% от общей массы, и определяет кристалличность и уникальную зернистую структуру крахмальных гранул. Амилопектин представляет собой упорядоченный разветвленный полимер, состоящий из 10 000-100 000  $\alpha$ -1,4-связанных звеньев D-глюкозы с  $\alpha$ -1,6 точками ответвления через каждые 20-25 единиц глюкозы, что приводит к формированию сильно разветвленной структуры (5-6%). Это приводит к образованию тандемно-кластерной структуры, представляющей собой совокупность повторяющихся сильно и слабо разветвленных участков. Сильно и слабо разветвленные области образуют аморфные и кристаллические пластинки (рис. 3). Выделяют несколько типов образуемых кристаллических структур (А, В, С). Картофельному амилопектину присущи кристаллические структуры В-типа.  $\alpha$ -1,6-разветвленные связи придают амилопектину более сложную трехмерную структуру по сравнению с линейной амилозой. Внутри гранул амилопектин собирается в характерные пластинчатые кольца роста диаметром от 20 до 500 нм, отходящие от центрального бугорка (Bertoft and Blennow, 2016; Bertoft, 2017).

Содержание амилопектина может достаточно сильно различаться у разных генотипов картофеля. Так, в большинстве сортов картофеля амилопектин обычно составляет 63,4-88,6% крахмала, в то время как некоторые сорта могут содержать до 100% амилопектина (Tong et al., 2023). В некоторых трансгенных линиях с подавленной активностью обоих изоформ разветвляющего фермента SBE содержание амилопектина может снижаться до 28% (Schwall et al., 2000).

Второй компонент крахмала – амилоза – составляет около 20-30% картофельного крахмала и состоит в основном из длинных линейных цепочек  $\alpha$ -1,4-связанных молекул глюкозы, которые характеризуются низкой степенью разветвленности. Амилозная цепь состоит из 500-20000  $\alpha$ -1,4-связанных глюкозных звеньев и образует спираль посредством внутримолекулярных водородных связей и содержит несколько  $\alpha$ -1,6-связанных точек ответвления (менее 1%) (рис. 3). Количество разветвлений в пересчете на одну молекулу

амилозы в среднем составляет только от 7 до 12. Амилоза образует спиральные комплексы, которые могут быть либо неупорядоченные и аморфные, либо структурированные в виде пластин и кристаллитов (Bertoft and Blennow, 2016). У сортов картофеля *S.tuberosum* содержание амилозы различается довольно значительно (от 0 до 3% амилозы и до 40-87% в клубнях SBE-редактированных линий (Zhao et al., 2021; Zhong et al., 2022)). Недавние исследования выявили значительное влияние на структуру амилозы генотипа и внешней среды, при этом у семи сортов картофеля, выращенных в разных местах, наблюдались не только межсортовые различия, но и внутрисортовые (Ahmed et al., 2019). Также содержание амилозы в крахмале клубней зависит от воздействия холода во время хранения (Jansky and Fajardo, 2014).

Как было упомянуто выше, помимо амилозы и амилопектина крахмал клубней картофеля также содержит такие компоненты как липиды, белки и минеральные вещества. Несмотря на то, что их содержание невелико, они влияют на функциональность и технологические характеристики крахмала. Содержание липидов (фосфолипиды и свободные жирные кислоты) в крахмале картофеля не превышает 0,08%. Эти липиды могут образовывать сложные крахмал–липидные и крахмал–липидно-белковые комплексы, изменяя физические свойства крахмала (Wang et al., 2020). Белки в картофельном крахмале (<1,18% от сухого веса) в основном являются ферментами, участвующими в метаболизме крахмала. Они играют существенную роль в формировании структуры крахмальных гранул (Shen et al., 2022). Также для функциональности крахмала значение имеют минеральные вещества, особенно фосфор. Общее содержание минеральных веществ колеблется от 0,21% до 1,3%, из которых 0,05–0,08% приходится на фосфор, химически связанный с амилопектином примерно по одной фосфатной группе на 200-300 единиц глюкозы (Tong et al., 2023). Недавно было обнаружено, что более высокое содержание крахмал-фосфатного моноэфира коррелирует с более длинными цепями амилопектина, что приводит к менее упорядоченной и более гибкой структуре крахмальных гранул и снижает кристалличность крахмала (Ding et al., 2023).

### **1.3. Холодовый стресс и холодовое осахаривание клубней картофеля.**

Клубни картофеля в РФ обычно хранят в картофелехранилищах при пониженных температурах (обычно +2-4°C) (Зейрук и др., 2019). Хранение при пониженных температурах уменьшает прорастание, потерю влаги и ингибирует деятельность фитопатогенов, но при этом ускоряет превращение крахмала в сахара, включая сахарозу и редуцирующие сахара. Это явление известно как холодовое осахаривание, вызванное охлаждением (cold-induced sweetening, CIS). Высокое содержание сахаров в клубнях не

только ухудшает вкусовые свойства, но также значительно снижает качество производимых чипсов. Физиологические и биохимические процессы вызывающие CIS были достаточно детально изучены, и было показано, что на накопление резистентных сахаров в клубнях при низкотемпературном хранении влияют деградация крахмала, гексогенез, включая образование и разложение сахарозы, а также гликолиз и анаэробное дыхание (Copp et al., 2000; McKenzie et al., 2005).

Сахара, которые накапливаются при низкотемпературном хранении клубней, образуются из крахмала. Именно разложение крахмала считается основным источником накопления редуцирующих сахаров и сахарозы в клубнях при CIS. Разложение крахмала происходит в амилопластах в результате фосфоролитической и гидролитической реакций и, как считается, требует согласованного действия нескольких ферментов и начинается в первую очередь под действием крахмалфосфорилазы в сочетании с амилазами, которые играют важную вспомогательную роль в отщеплении фрагментов крахмальной цепи. Образующиеся гексозофосфаты под действием сахарозо-фосфатсинтаз превращаются в сахарозу и затем инвертазы гидролизуют ее до глюкозы и фруктозы (Sowokinos 2001; Chen et al., 2012).

Помимо изучения биохимических и физиологических процессов, определяющих CIS, были начаты работы по выявлению генов и соответствующих ферментов, которые могут участвовать в этом процессе (рис. 4) (Zhang et al., 2017).

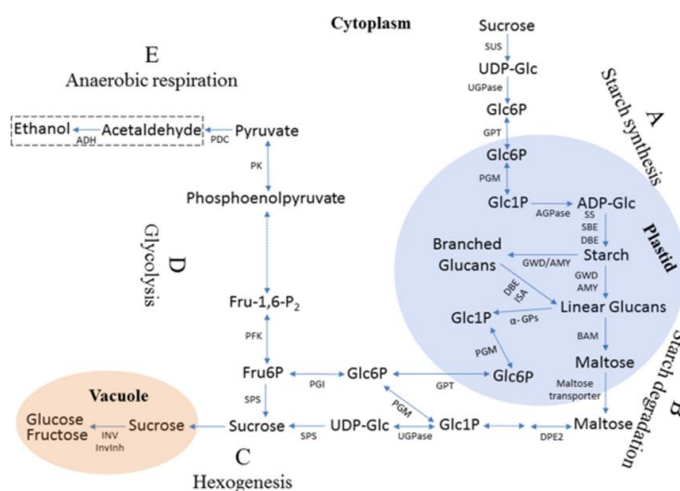


Рисунок 4 – Углеводные пути в клубнях картофеля: (A) синтез крахмала, (B) распад крахмала, (C) гексогенез, (D) гликолиз, (E) анаэробное дыхание (Zhang et al., 2017).

Первые работы в этом направлении были получены в результате дифференциального скрининга 25 тысяч клонов кДНК библиотеки сорта Сатурна при инкубировании клубней до 28 дней при +4°C, что привело к идентификации 16 индуцированных холодом фрагментов (неаннотированных) (van Berkel et al., 1994).

Первая молекулярная карта с 85 локусами была построена у диплоидного картофеля на основе анализа 69 генов, связанных с метаболизмом и транспортом углеводов (Chen et al., 2001). Для выявления QTL, определяющих контроль CIS, были исследованы 189 клубней двух популяций диплоидного картофеля H94A и H94C после хранения при +4°C в течение трех месяцев (Menendez et al., 2002).

В результате генотипирования с использованием RFLP- и AFLP-маркеров были выявлены 26 локусов генов-кандидатов, связанных с синтезом крахмала. Было выделено восемь значимых QTL-кандидатов, которые включали гены сахарозосинтазы *Sus3*, двух апопластических инвертаз *Inv-ap*, ADP-глюкозу пироглутамата фосфорилаз и *Sut1* транспортера сахарозы. При этом фенотипическая дисперсия, объясняемая отдельными локусами-кандидатами, связанными с QTL, составила >10%. Так, например, *Sus3* объясняет до 15,1 и 13,3% фенотипической дисперсии глюкозы и фруктозы соответственно (Menendez et al., 2002). Полученные результаты позволили предположить, что генетическая вариабельность CIS может определяться аллельными вариантами ферментов, участвующих в метаболизме углеводов.

С использованием генных чипов было идентифицировано 1854 дифференциально экспрессируемых зондов для выявления генов, изменяющих свою активность в ответ на холодовой стресс в растущих клубнях (Bagnaresi et al., 2008). Однако данное исследование в основном сосредоточено на холодовых реакциях у одного генотипа, чувствительного к CIS, а генетическая основа различий в чувствительности к CIS среди разных генотипов не была исследована. Впоследствии эти исследования были дополнены транскриптомными данными по дифференциальной экспрессии генов у CIS-устойчивого образца *Solanum berthaultii* Hawkes и CIS-восприимчивого сорта *S. tuberosum* при стимуляции холодом (до 3 месяцев при +4°C и +20°C) (Chen et al., 2012). Анализ их паттернов экспрессии показал, что помимо генов, связанных с деградацией крахмала, также решающее значение CIS устойчивости могут иметь гены, участвующие в разложении сахарозы и гликолизе (Chen et al., 2012). При этом было показано, что экспрессионные паттерны многих ДЭГ (DEG, Differential Expressed Genes) в клубнях образцов, контрастных по CIS, были разными, особенно у генов, связанных с образованием редуцирующих сахаров и гликолизом, что указывает на различные регуляторные механизмы ответа на холодовой стресс между CIS-устойчивыми и неустойчивыми генотипами, что может иметь решающее значение понимания формирования CIS и холодоустойчивости у картофеля.

В настоящее время накоплено достаточно данных о конкретных генах, определяющих устойчивость картофеля к холодовому стрессу и опосредованному этим стрессом холодовому осахариванию. В зависимости от того, в каком метаболическом

процессе (биосинтез сахарозы, разложение сахарозы, гликолиз, дыхание) они участвуют, их можно разделить на несколько групп.

Так было показано, что *биосинтез сахарозы* в клубнях картофеля после сбора урожая катализируется сочетанием двух ферментов: UDP-глюкозопирофосфорилазы (UGPase) и сахарозофосфатсинтазы (SPS) (Baldwin et al., 2011). Данные анализа молекулярных маркеров с использованием метода ассоциативного картирования позволили предположить, что аллель *ugpB* ассоциирован с CIS-устойчивостью (Baldwin et al., 2011). Эти данные указывают на то, что разные аллельные варианты UGPase могут играть различную роль в CIS. Для гена, кодирующего SPS, было показано, что снижение его экспрессии на 70-80% приводит к снижению (на 10-40%) содержания растворимых сахаров в трансгенных клубнях, хранящихся при +4°C (Krause et al., 1998). Ранее проведенное исследование показало, что накопление сахарозы в клубнях картофеля при хранении в холодильнике вызвано повышенной скоростью синтеза сахарозы и активацией сахарозофосфатсинтазы SPS (Hill et al., 1996).

На холодо- и CIS- устойчивость в клубнях оказывают влияние прежде всего гены растворимых кислых инвертаз INV, которые осуществляют *гидролиз сахарозы* до глюкозы и фруктозы в вакуоли (Bhaskar et al., 2010). Результатом нокаута гена инвертазы *INV* методом геномного редактирования стало снижение в клубнях содержания редуцирующих сахаров, которые хранились при температуре +4°C в течение 14 и 30 дней (Clasen et al., 2016; Егорова и др., 2023). Кроме того активность кислой инвертазы при холодовом стрессе посттранскрипционно может модулироваться с помощью ингибитора инвертазы IHIV (Liu et al., 2013; McKenzie et al., 2013).

*Дыхание* клубней картофеля замедляется с понижением температуры хранения в определенном диапазоне, но при этом выявляются различия между клубнями с разной устойчивостью к CIS (Blenkinsop et al., 2003). Также у CIS-устойчивого сорта в сравнении с неустойчивым был идентифицирован дополнительный изофермент алкогольдегидрогеназы ADH, что свидетельствует о том, что анаэробные дыхательные ферменты тоже могут оказывать влияние на CIS (Copp et al., 2000; Pinhero et al., 2007).

Так как редуцирующие сахара при холодовом стрессе в клубнях образуются в результате гидролиза крахмала, то, ожидаемо, на CIS и уровень редуцирующих сахаров оказывают влияние ферменты, вовлеченные как в синтез, так и распад крахмала. Прежде всего, это белки, осуществляющие распад цепей крахмала. Считается, что к основным ферментам, гидролизующим крахмал до редуцирующих сахаров, относятся, в первую очередь, амилазы, инвертазы, гликан-водные дикиназы, гликан-фосфорилазы и фосфогликанфосфатазы (Streb and Zeeman, 2012; Сергеева и др., 2022).



Известно, что гликан-водные дикиназы GWD и PWD действуют совместно, фосфорилируя крахмальные цепи вблизи точек разветвления, и тем самым являются важными ферментами деградации крахмальных гранул, обеспечивая доступ к субстрату  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазам (Compart et al., 2023). Ранее было показано, что QTL, включающий ген *GWD*, связан с цветом чипсов, то есть может регулировать содержание редуцирующих сахаров в клубнях при хранении (Douches and Freyre, 1994). Несмотря на значимость этих белков, о функции PWD в клубнях картофеля практически не сообщалось.

Другой фермент, влияющий на распад крахмала на холоду – кислая вакуолярная инвертаза VINV (*PAIN-1*, *StInv*). Во время CIS при гидролизе крахмала происходит образование сахарозы, и часть ее транспортируется в вакуоль, где распадается до глюкозы и фруктозы. Этот этап в основном контролируется вакуолярной кислой инвертазой (VINV), и существует тесная связь между активностью VINV и накоплением восстанавливающих сахаров во время холодового хранения (Matsuura-Endo et al., 2004). Было предпринято несколько попыток контролировать CIS либо путем манипулирования активностью VINV (Agarwal et al., 2003), либо путем снижения уровней транскрипции гена *VInv* (Zrenner et al., 1996; Chi et al., 2008; Bhaskar et al., 2010).

Анализ клубней 24 сортов картофеля после хранения при +4°C в течение месяца показал большие различия (в 50 раз) в активности кислой вакуолярной инвертазы *StVInv/PAIN1*. Однако не было выявлено корреляции между уровнем активности инвертазы и накоплением восстанавливающих сахаров, при этом выявлена высокая корреляция между активностью фермента и соотношением гексоза/сахароза. Исследование собранных и хранящихся в холоде клубней показал, что соотношение гексозы/сахарозы снижалось с уменьшением активности инвертазы, но общее количество растворимых сахаров существенно не менялось (Zrenner et al., 1996). Анализ клубней трансгенных растений сорта Desire с антисмысловым ингибированием гена *StINV1/PAIN1* выявил, что в условиях холода снижение активности растворимой кислой инвертазы приводит к снижению содержания гексоз и повышению содержания сахарозы по сравнению с контрольным клубнями: ингибирование *VInv* снизило активность инвертазы в клубнях, хранящихся в холоде, на целых 92%, но активность гексоз клубней снизилась лишь на 43% (Zrenner et al., 1996). На основе этих данных было выдвинуто предположение, что инвертазы вероятно не контролируют общее количество растворимых сахаров в хранящихся в холоде клубнях картофеля, но участвуют в регуляции в них соотношения гексозы к сахарозе. Таким образом, было показано, что CIS не эффективно контролировался кислой вакуолярной инвертазой. Это привело к двум возможным гипотезам. Одна из гипотез, объясняющих данный факт, заключалась в том, что

активность VINV или транскрипция гена *VInv-Pain-1* были лишь частично подавлены в этих экспериментах и полное подавление экспрессии гена все же нивелирует CIS.

В последнее время с помощью различных систем геномного редактирования показано, что выключение *VInv* может эффективно влиять на CIS в клубнях *S.tuberosum* (Chi et al., 2008; Zhu et al., 2014; Wiberley-Bradford and Bethke, 2018). Так было показано, что полное подавление экспрессии гена *VInv* кислой вакуолярной инвертазы картофеля предотвращает снижение накопления сахара в хранящихся на холоду клубнях и картофельные чипсы, полученные из этих линий, показали 15-кратное снижение акриламида и были светлыми даже при хранении клубней при температуре +4°C (Bhaskar et al., 2010). Редактирование гена *VInv* в картофеле с использованием CRISPR/Cas9 привело к значительному снижению экспрессии и более низкой ферментативной активности *VInv*, что уменьшило образование сахаров при хранении на холоде и предотвращало холодовое осахаривание картофеля (Yasmeen et al., 2022). Данные qRT-PCR показали, что в отредактированных растениях картофеля экспрессия мРНК гена *VInv* была снижена в 90 раз по сравнению с контрольными растениями. Анализ редуцирующих сахаров выявил пятикратное снижение их количества в клубнях трансгенных линий (Yasmeen et al., 2022). Аналогично были получены линии с уменьшенным на 95-99% накоплением редуцирующих сахаров после хранения при +4°C в течение 4 месяцев в результате CRISPR/Cas9 редактирования гена *VInv* у сортов Atlantic и Desiree (Ly et al., 2023). Для выключения *VInv* в сорте Ranger Russe был использован TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) метод редактирования, в результате чего некоторые отредактированные линии имели следовые уровни редуцирующих сахаров в клубнях, а чипсы имели светлую окраску и содержали пониженные уровни акриламида (Clasen et al., 2016). Кроме того, необходимо отметить, что изменение активности инвертаз, как и других генов углеводного обмена, может быть связано с посттранскрипционной регуляцией, как, например, было показано на примере кислой вакуолярной инвертазы *VInv* (Xu et al., 2009; McKenzie et al., 2013; Datir, 2021).

Было показано, что регулировать CIS могут также ингибиторы инвертаз *StINH* (Xu et al., 2009; Liu et al., 2013). Профиль экспрессии *St-INH* в различных органах растений картофеля и хранящихся клубнях показал, что экспрессия гена была самой высокой в клубнях и была сильно подавлена низкими температурами. Этот паттерн экспрессии был противоположен снижению накопления сахара в клубнях, хранящихся в холоде, что подтверждает возможное участие *St-INH* в CIS у картофеля (Slugina et al., 2020). Для преодоления накопления гексоз, вызванного холодом, гены ингибитора инвертазы были сверхэкспрессированы в трансгенных растениях картофеля. Эктопическая

сверхэкспрессия ингибитора вакуолярной инвертазы табака привела к снижению накопления восстанавливающих сахаров в трансгенных растениях, тем самым предотвратив CIS картофельных клубней (Greiner et al., 1999). Были идентифицированы изоформы ингибитора инвертазы StInvInh2A и StInvInh2B, которые специфически ингибировали активность VInv1 в клубнях картофеля (Liu et al., 2013). Обе изоформы были сверхэкспрессированы в CIS-чувствительных сортах картофеля или репрессированы с использованием метода RNAi-сайленсинга в CIS-устойчивых генотипах, что привело к ингибированию инвертазы и уменьшению CIS (Liu et al., 2013).

Были изучены паттерны экспрессии генов *INH1* и *INH2* клубней холодочувствительных и устойчивых сортов картофеля, хранящихся в холоде. Было показано, что индукция мРНК *INH2* в клубнях картофеля, хранящихся в холоде, способствовала устойчивости к CIS и включала сплайсинг гибридных вариантов мРНК генов ингибиторов (Brummell et al., 2011).

Другая группа ферментов, влияющих на хранение клубней картофеля при пониженных температурах, представлена ферментами, контролирующими синтез крахмала в клубнях *S. tuberosum*. Так известно, что АДФ-глюкоза является субстратом для синтеза крахмала и белок аденозиндифосфат-глюкозопирофосфорилаза AGPase может стимулировать синтез крахмала и снижать накопление редуцирующих сахаров. При анализе генов, влияющих на содержание сахаров в клубнях картофеля в процессе хранения при низких положительных температурах, было показано, что две субъединицы AGPase a и AGPase b отвечают за 12,5 и 13,3% содержания сахара (Menéndez et al., 2002). Кроме того, повышенная экспрессия гена *AGPaseS* приводила к более высокой активности AGP-азы и более низкому накоплению редуцирующих сахаров в клубнях картофеля при холодовом хранении, в то время как подавление активности AGPaseS в картофеле приводило к противоположному эффекту (Song et al., 2005). Полученные данные также показали, что корреляция между транскриптами гена и активностью AGP-азы была незначительной, что позволяет предположить, что также может иметь место посттранскрипционное изменение активности фермента (Tiessen et al., 2002).

Было показано, что на устойчивость клубней картофеля к холодовому стрессу влияет соотношение амилозы и амилопектина в крахмале, поскольку скорость гидролиза амилопектина и амилозы различна. Ферменты сахарозосинтазы SS (I-IV) и GBSS влияют на структуру и содержание в крахмальных зернах амилопектина и амилозы и могут влиять на накопление редуцирующих сахаров, изменяя скорость разложения крахмала в клубнях при холодовом стрессе, но механизмы этого процесса до конца не ясны.

Синтез амилопектина требует активности ферментов, расщепляющих крахмал: SBE и DBE. Структура амилопектина, ключевого компонента крахмала, определяет количество синтезируемого крахмала в растениях. В картофеле есть два класса разветвляющих ферментов SBEI и SBEII. Исследования полиморфизмов в генах этих белков показали, что SBEI и SBEII были в значительной степени связаны со степенью фосфорилирования крахмальных цепей в клубнях картофеля, а при холодовом стрессе содержание фосфатов и накопление редуцирующих сахаров в клубнях положительно коррелировало (Carpenter et al., 2015). Это позволило предположить, что белки SBE могут регулировать накопление глюкозы и фруктозы на холоду путем изменения фосфорилирования в клубнях. Предположительно на уровень CIS могут влиять и другие ферменты, также воздействующие на степень разветвления цепей крахмала, понижающие степень его ветвления, такие как DBE. Они могут влиять на накопление сахаров при холодовом стрессе, изменяя содержание амилопектина в клубнях. Однако эта гипотеза нуждается в подтверждении.

Поскольку поддержание качества клубней при хранении связано с многочисленными проблемами, необходима разработка диагностических биомаркеров, предсказывающих степень холодового осахаривания клубней картофеля, которые можно применять к широкому спектру генотипов и которые могут быть легко и дешево интегрированы в существующие методики управления хранением и могли быть использованы селекции CIS-устойчивых сортов. В связи с этим было проведено достаточно интересное исследование по выявлению корреляций между экспрессией генов после сбора урожая с уровнем глюкозы в клубнях после хранения при пониженных температурах для того, чтобы определить уровни экспрессии генов и потенциал образования резистентных сахаров в процессе холодового хранения (Neilson et al., 2017).

Было проанализировано 12 сортов и селекционных линий, которые показали разное количество глюкозы при сборе урожая перед хранением на холоде: у сорта Shepody было самое высокое содержание глюкозы, а у линии 15323-04 - самое низкое. Было обнаружено, что относительные различия в уровнях глюкозы между анализируемыми образцами меняются после хранения при +4°C в течение трех месяцев без выявления какой-либо зависимости и однозначно было определено, что уровни глюкозы перед хранением не являются хорошим предиктором CIS. 73 гена были протестированы на корреляцию между экспрессией генов до хранения в холодильнике и концентрацией глюкозы после 3 месяцев хранения на холоде. Для 12 сортов было показано, что уровень их экспрессии до хранения при +4°C положительно коррелировал с уровнем глюкозы после хранения. Тем самым, уровни экспрессии этих генов до закладки на холодовое

хранение могли быть маркерами уровней редуцирующих сахаров после хранения и предикторами образования CIS. Отдельный интерес представляют предполагаемый ген-переносчик ауксина *Lax* и гены, кодирующие белки семейства RING finger и F-box, участвующие в посттранскрипционной регуляции, и уровень экспрессии которых показал высокую корреляцию с содержанием глюкозы после хранения. Ген, для которого показана тесная связь с CIS-устойчивостью, *SbRFP1*, кодирующий белок RING finger (Zhang et al., 2013). Белки RING finger участвуют в ряде физиологических процессов, включая реакцию на холодостресс. В картофеле повышенная экспрессия *SbRFP1* приводила к более высокому накоплению редуцирующих сахаров, в то время как пониженная снижала их накопление (Zhang et al., 2013).

Однако, что интересно, в исследовании по зависимости уровня экспрессии с уровнем глюкозы не было обнаружено корреляции с экспрессией генов, метаболизма крахмала или сахаров перед хранением на холоду (Neilson et al., 2017). Это может быть связано с посттранскрипционной регуляцией генов углеводного обмена, как, например, было показано на примере кислой вакуолярной инвертазы *VInv* (McKenzie et al., 2013). Экспрессия мРНК *VInv* как в линиях дикого типа, так и в линиях с RNAi нокдауном гена не была связана с активностью *VInv* при длительном холодострессе (Wiberley-Bradford et al., 2014), и было показано, что регулировать его активность могут, скорее всего, ингибиторы протеаз *VInv* (Xu et al., 2009; Liu et al., 2013).

Помимо генов кислых вакуолярных инвертаз отдельный интерес представляют другие ферменты, влияющие на превращение крахмала в редуцирующие сахара в амилопластах клубней, такие как амилазы, которые представлены семействами  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз. Для обоих семейств было показано, что активность и  $\alpha$ -амилазы, и  $\beta$ -амилазы картофеля повышается во время холодостресса. Всего в геноме картофеля было идентифицировано до 20 генов  $\alpha$ -амилаз (Duan and Jin, 2024). Проведенные исследования показали, что в клубнях при холодострессе экспрессируются два гена  $\alpha$ -амилазы – *StAmy1* и *StAmy23*. При этом активность  $\alpha$ -амилазы в первую очередь зависит от *StAmy23* (Zhang et al., 2014b). У клубней трансгенных растений картофеля, в которых был ингибирован белок *StAmy23* задерживалось прорастание, как результат снижения скорости разложения крахмала. Подавление активности *StAmy23* задерживало прорастание клубней на 1-2 недели по сравнению с контролем. Это сопровождалось снижением в клубнях у хранившихся при температуре +8°C трансгенных растений с ингибированным *StAmy23* содержания редуцирующих сахаров и повышением мальтоолигосахаридов в кожуре клубней и под почковым глазком клубней картофеля с дефицитом. Изменение содержания растворимых сахаров сопровождается

незначительным изменением структуры фитогликогена и размера гранул крахмала (Hou et al., 2019). Все это позволяет предположить, что StAmy23 может играть важную роль в гидролизе крахмала во время CIS картофеля.

Всего было идентифицировано в геноме *S. tuberosum* семь генов  $\beta$ -амилаз и исследована связь паттернов экспрессии этих генов с активностью как белка, так и с содержанием моносахаридов. В первую очередь в клубнях картофеля активность  $\beta$ -амилазы связана с StBAM1 и StBAM9 и показана их роль, как основных амилаз, в накоплении редуцирующих сахаров в клубнях, хранящихся при низких температурах (Zhang et al., 2014a). Однако, как было показано, StBAM9 сам не проявляет ферментативной активности, но может играть роль в деградации крахмала, которая зависит от других белков, которые взаимодействуют с StBAM9 (Zhang et al., 2014b). Пониженная транскрипция гена  $\beta$ -амилазы StBAM3 приводила к повышенному синтезу крахмала в листьях картофеля, однако, его роль в клубнях до конца не определена.

Таким образом, в клубнях *S. tuberosum* в условиях холодового стресса, роль и механизмы различных генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз в разложении крахмала и накоплении редуцирующих сахаров могут быть различными. В настоящее время до конца не выяснены функции каждого из генов амилаз, их взаимодействия, а также возможные различия в экспрессии этих генов в зависимости от длительности холодового стресса.

#### **1.4. Основные ферменты метаболизма крахмала и их участие в стрессовом ответе.**

##### **1.4.1. Амилазы.**

Обмен крахмала в растениях контролируется рядом ферментов, среди которых амилазы играют важную роль в регуляции деградации крахмала. Амилазы являются 1,4- $\alpha$ -D-глюканогидролазами и представляют собой группу ферментов, гидролизующих крахмал, с образованием простых сахаров, таких как фруктоза, мальтоза, глюкоза и декстринов. Существует два типа амилаз: экзо-амилазы и эндо-амилазы. Экзоамилазы могут расщеплять невосстанавливающий конец крахмала, в то время как эндоамилазы гидролизуют связи внутри молекулы крахмала (Kamon et al., 2015).

Амилазы растений можно разделить на три основных подкласса:  $\alpha$ -амилазы (AMY) (ЕС 3.2.1.1),  $\beta$ -амилазы (BAM) (ЕС 3.2.1.2) и  $\gamma$ -амилазы (или глюкоамилазы ЕС 3.2.1.3).  $\alpha$ -амилазы достаточно широко распространены как у низших, так и у высших растений.  $\alpha$ -амилазы по механизму действия являются преимущественно эндоферментами, в то время как  $\beta$ -амилазы исключительно экзоферменты. Амилазы действуют как на амилозу, так и на амилопектин и произвольно отсекают  $\alpha$ -1,4-цепь внутри сахарной цепи без различия субстрата, но не могут действовать на  $\alpha$ -1,6 цепи.

$\beta$ -амилазы отличаются от  $\alpha$ -амилаз тем, что являются исключительно экзо-амилазами и с невосстанавливающего конца цепи  $\alpha$ -1,4-глюкана последовательно отщепляют звенья мальтозы. В случае неразветвленных субстратов, таких как амилоза, молекулы субстрата могут полностью разлагаться  $\beta$ -амилазами на мальтозу и небольшое количество глюкозы.

$\gamma$ -амилазы (глюкоамилазы) — экзонуклеазы, расщепляющие не только  $\alpha(1\rightarrow4)$ , но и  $\alpha(1\rightarrow6)$  гликозидные связи с невосстанавливающего конца молекул крахмала, в результате чего образуется D-глюкоза в качестве единственного продукта гидролиза. При этом глюкоамилаза способна также катализировать реакцию, обратную обычной реакции гидролиза, с получением, в основном, мальтозы и изомальтозы (Socol et al., 2006). Все это отличает глюкоамилазу от  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз и делает ее единственным ферментом, способным полностью гидролизовать крахмал до глюкозы.

Наиболее функционально значимыми и исследованными у растений являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы. Амилазы AMY и BAM принадлежат к суперсемейству гликозидгидролаз GH 13 и GH 14, соответственно. Оба типа амилаз обладают сходными механизмами действия, хотя субстраты и продукты различаются в регуляции деградации крахмала. Основные каталитические домены AMY и BAM у разных организмов имеют сходный каталитический домен, который считается наиболее древней и наиболее часто встречающейся структурой этих белков и кроме того подтверждающий происхождение обоих типов генов от общего предкового гена (Höcker et al., 2001). Белки амилаз растений имеют сходную третичную структуру из одного (AMY,  $\gamma$ -амилазы) или двух (BAM) доменов. Основной каталитический домен всех амилаз представлен  $(\beta/\alpha)8$ -цилиндрическим ядром (также называемым TIM barrel). У  $\alpha$ -амилаз он включает восемь  $\alpha$ -спиралей, расположенных снаружи, которые окружают восемь параллельных  $\beta$ -спиралей внутри на N-конце, и, вероятно, является характерной особенностью ферментов AMY. У  $\alpha$ -амилаз основной домен содержит три высоко консервативных ключевых каталитических аминокислотных остатка Asp-Glu-Asp.  $\beta$ -амилазы также формируют каноническое  $(\beta/\alpha)8$ -цилиндрическое ядро с критическими для ферментативной активности двумя высоко консервативными остатками Glu, действующими как донор протонов и нуклеофил (Т, У).

Белки AMY и BAM при гидролизе крахмала потенциально могут приводить к образованию мальтозы - одного из основных метаболитов и осмолитов клеток растений. В ряде исследований было показано, что транскрипция генов обоих ферментов регулируются сложной регуляторной сетью, которая включает в себя свет, фитогормоны, сахара и стрессовые факторы (Kaplan et al., 2006; Doyle et al., 2007).

### 1.4.1.1. Строение и функции $\alpha$ -амилаз.

$\alpha$ -амилаза (ЕС 3.2.1.1) – принадлежит к классу  $\alpha$ -1,4-глюкан-4-глюканогидролаз, присутствующему у высших животных, растений и микроорганизмов, играет ключевую роль в углеводном обмене. Фермент катализирует гидролиз  $\alpha$ -1,4-глюкозидных связей в крахмале и родственных ему  $\alpha$ -глюканах, в результате чего крахмал в процессе распада превращается в олигосахариды, которые далее гидролизуются до фруктозы и глюкозы (Mobini-Dehkordi and Javan, 2012). Характерной особенностью большинства  $\alpha$ -амилаз является связь с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  в качестве необходимого кофактора, который используется ферментом и как стабилизирующий, и как активирующий фактор.

Большинство  $\alpha$ -амилаз известны как эндоамилазы и хаотически гидролизуют полимер крахмала, сохраняя при этом его аномерную конфигурацию. Кроме того, к  $\alpha$ -амилазам относятся экзо-амилазы, которые могут отщеплять специфический мальтозный дисахарид от конца крахмальной цепи (Derde et al., 2012).

На примере ячменя *Hordeum vulgare* L. методом рентгеновской кристаллографии была определена белковая структура растительной амилазы.  $\alpha$ -амилаза имеет трехмерную структуру, которая помогает ей связываться с субстратом и делает ее высокоспецифичной в своей активности. Молекула  $\alpha$ -амилазы состоит из одной полипептидной цепи, которая содержит 512 аминокислот (молекулярная масса 57,6 кДа) (Sahni and Goel, 2015). В структуре  $\alpha$ -амилазы выделяют три консервативных домена: домен А является основным каталитическим доменом, характерным для всех АМУ ферментов. Он включает расположенный на N-конце ( $\beta/\alpha$ ) 8-цилиндрический домен (TIM barrel), который состоит из восьми  $\alpha$ -спиралей снаружи, окружающих восемь параллельных  $\beta$ -спиралей внутри (рис. 5). Этот домен содержит аминокислотные остатки активного центра, а также те, которые участвуют в связывании лиганда (Yang et al., 2023).

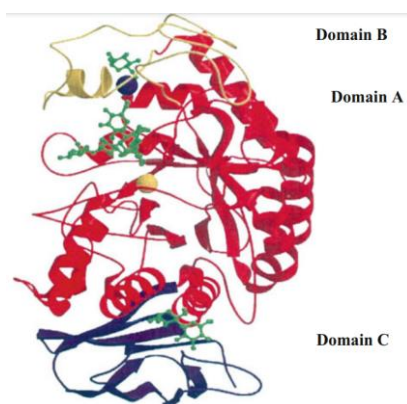


Рисунок 5 – Третичная структура  $\alpha$ -амилазы ячменя HvAMY-1, Отдельные домены окрашены: каталитический А домен ( $\beta/\alpha$ )8-цилиндрический (красным), домен В — (желтым), домен С — (синим), полисахарид- зеленым (Rayan, 2004).



Домен А составляет больше двух третей всего белка (286 а.о у *H.vulgare*) (Sahni and Goel., 2015). Каталитический центр включает три ключевых аминокислотных остатка Asp-Glu-Asp (Yang et al., 2023). Участок связывания крахмальных гранул SBS1, включающий два остатка Trp, расположен на  $\alpha$ -спирали центрального  $\beta/\alpha$ -цилиндра и крайне консервативен у всех  $\alpha$ -амилаз, за исключением белков подсемейства AMY2, для которых характерен специфический участок связывания крахмала (SBS2) (Ju et al., 2019).

Домен В имеет глобулярную форму и встроен в домен А в виде протяженной петли, вставленной между  $\beta$ -цепью и  $\alpha$ -спиралью домена А. Домен В образует полость, с которой связаны ионы кальция  $\text{Ca}^{2+}$ . Были выявлены аминокислотные остатки, являющиеся лигандами для всех трех ионов кальция (Sahni and Goel, 2015). Третий домен С образует отдельную глобулярную единицу, состоящую исключительно из  $\beta$ -листа, функция которого неизвестна (Seddigh and Darab, 2015).

Гены  $\alpha$ -амилазы AMY1, AMY2 и AMY3 выявлены у представителей всех высших растений. При этом, все три амилазы локализуются в разных компартментах клетки. Так, AMY1 локализуется в апопласте и других внеклеточных компартментах, AMY2 - в цитозоле и AMY3 - в пластидах (Kitajima et al., 2009; Mitsui et al., 2018). В настоящее время выделяют шесть подсемейств  $\alpha$ -амилаз растений AMY1-6. Деление на подсемейства основано на различиях в строении нуклеотидных и белковых последовательностей, наличии специфических функциональных мотивов и сайтов. Однако в связи с тем, что часто гены амилаз различных видов растений назывались не на основании гомологии, а по мере их описания, то возникла огромная путаница в названиях и в определении их в конкретные подгруппы. Ранее выделялись AMYA и AMYB типы белков. В настоящее время их относят к подтипам AMYA=(AMY1 и AMY2) и AMYB=AMY3 (Ju et al., 2019).

AMY1, AMY2 и AMY3 относятся к секреторным белкам и включают на N-конце сигнальные пептиды длиной 24-27 а.о. (Kitajima et al., 2009; Mitsui et al., 2018). В подавляющем большинстве случаев в N-концевых областях генов  $\alpha$ -амилазы у высших растений выявляют две категории сигнальных пептидов: секреторные сигналы и транзитные пептиды. Сигнальные пептиды необходимы для транспортировки белка в различные компартменты клетки и, таким образом,  $\alpha$ -амилазы с различными сигналами предполагают их разное субклеточное расположение для гидролиза крахмала (Stanley et al., 2002).

Как и говорилось ранее, все три амилазы функционируют в разных клеточных компартментах: в апопласте (AMY1), в цитозоле (AMY3) и пластидах (AMY3) (Stanley et al., 2002). Предполагается, что все три основных семейства генов  $\alpha$ -амилазы выполняют разные функции.  $\alpha$ -амилазы подсемейства AMY1 участвуют в расщеплении

внеклеточного крахмала.  $\alpha$ -амилазы второго подсемейства AMY2 локализируются в цитозоле и могут быть связаны с накоплением сахаров в ответ на действие холодового стресса.  $\alpha$ -амилазы третьего семейства AMY3 могут быть ферментами, ответственными за разложение всех форм пластид-связанного крахмала, то есть как синтезируемого в дневную фазу фотосинтеза, так и запасного крахмала (Stanley et al., 2002). Гипотетически, наличие множества дивергентных изоформ позволяет растительным организмам использовать различные категории крахмалоподобных полисахаридов в самых разнообразных условиях окружающей среды.

В отличие от белков, AMY-гены охарактеризованы у крайне ограниченного количества видов высших растений (Stanley et al., 2002) и до недавнего времени исследования генов AMY были сосредоточены на злаковых культурах, таких как пшеница, ячмень и рис, так как было показано, что гены  $\alpha$ -амилаз играют важную роль в прорастании семян и созревании зерна, влияя на урожайность. Часто проводили анализ либо какого-то одного гена, либо нескольких генов одного подсемейств. При этом в геноме исследованных растений было найдено разное количество генов, относящихся к разным подсемействам (Ju et al., 2019). Кроме того, часто даже близкородственные виды могут иметь не только разное количество генов одного семейства, но также различаться количеством подсемейств AMY, представленных в геноме (Ju et al., 2019; Yang et al., 2023).

Как правило, гены AMY1 и AMY2 относятся к подсемействам, специфичным для однодольных. Ранее у двудольных растений были определены гены AMY1-типа, такие как гены арабидопсиса *AtAMY1* и картофеля *StAmy1*, которые на самом деле принадлежат к подсемейству генов AMY3. В настоящее время данные филогенетического анализа генов/белков 6 подсемейств  $\alpha$ -амилаз свидетельствуют о двух эволюционных линиях, группирующих эти подсемейства в два кластера: первый включает гены более представительных подсемейств AMY1, AMY2 и AMY3, другой – гены описанные гораздо позднее подсемейств AMY4, AMY5 и AMY6. Было установлено, что большинство генов  $\alpha$ -амилаз однодольных растений могут быть объединены в два подсемейства (AMY1 и AMY2) (Huang et al., 1992), в то время как гены двудольных растений делятся на три подсемейства (AMY1, AMY2 и AMY3). Согласно результатам филогенетического анализа предполагается, что эволюция AMY3 произошла после расхождение двудольных и однодольных растений (Ju et al., 2019).

В настоящее время наиболее детально охарактеризованы гены амилаз крайне ограниченного количества растений (арабидопсис, кассава *M. esculenta*, чайный куст

*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, яблоня *Malus domestica* (Suckow) Borkh., картофель *S. tuberosum*) (Ju et al., 2019; Stanley et al., 2002; Yang et al., 2023; Duan et al., 2024).

В результате проведенного в 2024 году анализа генома картофеля *S. tuberosum* было идентифицировано 20 генов *StAMY* (рис. 6) (Duan et al., 2024). Размеры генных последовательностей значительно варьировали (2,2-19 т.п.н.) из-за различия в интронных последовательностях, в то время как размер кодирующих последовательностей отличался не так сильно (1185-3999 п.н.) (рис. 6). Между группами белков *StAMY* (например, *StAMY2* и *StAMY3*, *StAMY5*, *StAMY6* и *StAMY7*) наблюдалось высокое сходство последовательностей и тесные эволюционные связи. Однако, анализ структуры генов показал, что многие из них демонстрируют различия в экзон-интронной структуре, что приводит к различиям в функции и паттернам экспрессии (рис. 6Б). Филогенетический анализ показал, что белки арабидопсиса, чая, кассавы и картофеля были схожими, что позволяет предположить, что представители каждой ветви, возможно, произошли от общего предка (Yue et al., 2019; Yang et al., 2023; Duan et al., 2024).

У исследованных к данному моменту семейств *AMY* были выявлены значительные различия в экзон/интронной структуре генов  $\alpha$ -амилаз различных подсемейств, что было ожидаемо, но также обнаружены и различия у генов одного семейства (рис. 6). Интересно, что каждое подсемейство  $\alpha$ -амилазных генов имеет характерную структуру интронов, которых может быть от двух до одиннадцати и, как оказалось, при относительной консервативности экзонных последовательностей, интроны во всех трех семействах характеризовались высокой вариабельностью (Stanley et al., 2002; Yang et al., 2023; Duan et al., 2024).

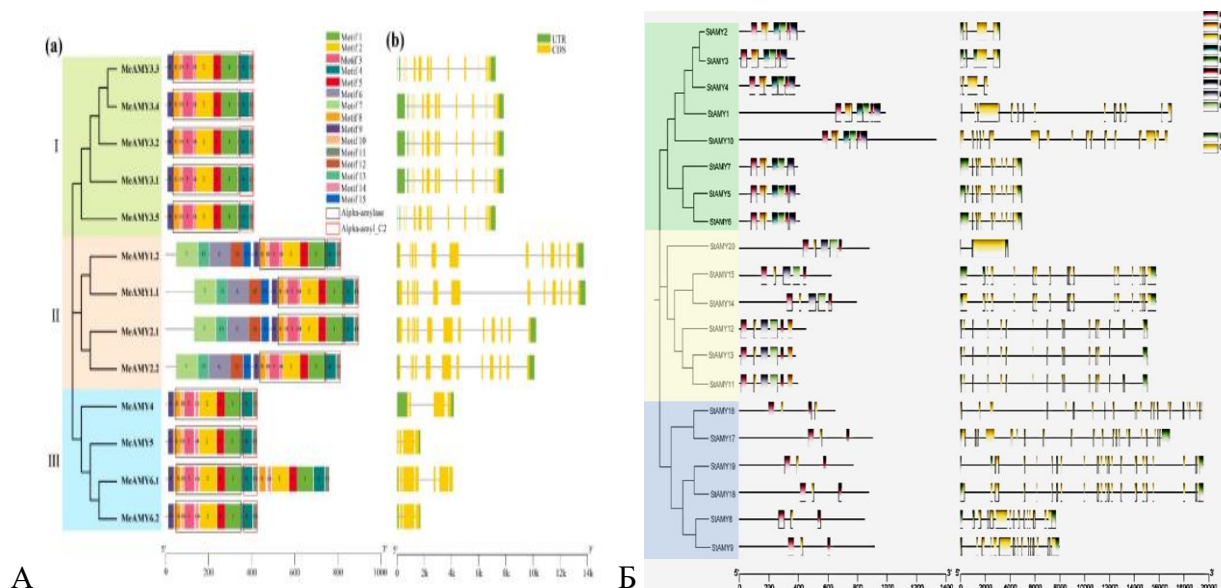


Рисунок 6 – Генная структура, консервативные мотивы и домены семейств MeAMY кассавы (А) и StAMY картофеля (Б) (Yang et al., 2023; Duan et al., 2024).

У риса было идентифицировано около 10 изоформ, кодируемых разными генами апопластных  $\alpha$ -амилаз, при этом структура у всех генов была одинакова, за исключением потери второго из трех интронов в одном подсемействе (Huang et al., 1990). За исключением мотивов каталитического домена, состав консервативных мотивов в белковых последовательностях MeAMY и StAMY был разным (Yang et al., 2023; Duan et al., 2024). Некоторые мотивы существовали только у небольшого числа членов семейства генов и эти различия могут быть связаны с функциональной дифференциацией семейств MeAMY и StAMY в ходе эволюции. Кроме того, для генов кассавы и картофеля был показан альтернативный сплайсинг, который может привести к функциональной и транскрипционной дифференциации. Для генов MeAMY3 были выявлены различия в 5'UTR области, приводящие к различным паттернам экспрессии (Yang et al., 2023).

С помощью qRT-PCR были определены тканеспецифичные профили экспрессии генов-амилаз и, как было показано, большинство из них транскрибировались в корнях, стеблях, листьях, цветках и семенах. При этом различные подсемейства  $\alpha$ -амилазных генов отличаются специфичностью экспрессии. Так, амилазы злаков, особенно те, которые кодируются генами *AMY1*, *AMY2* и *AMY3*, активно экспрессируются во время прорастания семян или развития зерна (Whan et al., 2014). Интересно, что у риса также наблюдается разница в уровнях экспрессии между *OsAMY1* и *OsAMY2*, при этом у риса четыре дублированных паралога *OsAMY3* имеют более разнообразные профили экспрессии, чем у других видов злаков с одной или двумя копиями. Как было показано для растений *C. sinensis*, гены *CsAMY* активно транскрибировались в семенах, стеблях и корнях; экспрессия в стеблях, листьях и цветках была гораздо ниже (Yue et al., 2019). Гены *StAMY8*, *StAMY9*, *StAMY12* и *StAMY20* картофеля специфически экспрессировались в зрелых клубнях, а *StAMY4*, *STAMY18*, *StAMY19* в листьях. Интересно, что ген *StAMY3* не экспрессировался ни в одной из анализируемых тканей картофеля (Duan et al., 2024).

Существование большого числа изоформ, которые кодируются различными генами *AMY*, может говорить о том, что их функция в гидролизе крахмала может быть ткане- и органоспецифичной. В прорастающих семенах злаков *AMY* представляют собой типичные молекулы секреторного белка, которые синтезируются в специализированных тканях (эпителий щитинки и алейроновый слой) и впоследствии секретируются в крахмалистый эндосперм. Были обнаружены изоформы *AMY4* в тканях, которые подвергаются апоптозу во время развития зерновки (Radchuk et al., 2009).

Было выдвинуто предположение, что все три основных семейства генов  $\alpha$ -амилаз растений играют различную роль. Белки семейства *AMY1* участвуют в расщеплении внеклеточного крахмала, например, в эндосперме злаковых зерен и, возможно, в

апопласте зараженных вирусом листьев. Амилазы семейства AMY2, возможно, играют определенную роль в цитозоле и могут быть связаны с накоплением сахаров в ответ на низкие температуры. Белки AMY3 могут быть ответственны за расщепление всех форм связанного с пластидами крахмала, то есть и за суточный крахмал, и за запасной крахмал. Возможно, что представители других семейств  $\alpha$ -амилазы вовлечены в процессы, на сегодняшний день не описанные, однако, генов основных трех семейств достаточно для обеспечения всех фундаментальных процессов метаболизма крахмала (Stanley et al., 2002).

Большое количество цис-регуляторных элементов в промоторных последовательностях генов  $\alpha$ -амилаз говорит об участии этих генов в механизмах стрессоустойчивости. Метаболиты углеводов в листьях растений выделяют растворимые сахара, которые могут действовать как осмопротекторы и таким образом, поддерживая водный баланс в клетках, растения могут адаптироваться к стрессу (Lv et al., 2020). Так, во время стресса, вызванного засухой, общая ферментативная активность  $\alpha$ -амилаз в листьях и стеблях кассавы повышалась, что приводило к более высокому содержанию растворимых сахаров и более низкому содержанию крахмала в корнях, стеблях и листьях кассавы, чем в норме. Но при этом с повышением уровня водного стресса, активность амилазы в корнях кассавы снижалась (Yang et al., 2023). Аналогичные явления были показаны для табака (*Nicotiana tabacum* L.) и рапса (*Brassica napus* L.) (Lv et al., 2020; Peng et al., 2014). Предполагается, что гены подсемейства AMY3 участвуют в общей реакции растений на акклиматизацию к холоду, которая включает увеличение содержания растворимых сахаров в цитозоле и  $\alpha$ -амилаза может играть роль в расщеплении полисахаридов, накапливающихся в цитозоле в условиях пониженных температур.

Активность  $\alpha$ -амилазы также была обнаружена в листьях ячменя, испытывающих водный стресс, а также в плодах яблони, созревших при воздействии низких температур (Jacobsen et al., 1986; Wegrzyn et al., 2000). В случае генов  $\alpha$ -амилаз *C. sinensis* было показано, что экспрессия как генов *CsAMY1*, так и *CsAMY2* повышается в ответ на солевой, холодовый и гормональный (ABA) стрессы (Yang et al., 2023). Аналогичная тенденция наблюдалась у винограда (Rubio et al., 2014).

В случае картофеля гены *StAMY3*, *StAMY4*, *StAMY8* и *StAMY12* демонстрировали повышение транскрипции в ответ на тепловой стресс, а у *StAMY6*, *StAMY14*, *StAMY16*, *StAMY17*, *StAMY19* и *StAMY20* были понижены, что позволяет предположить, что эти гены играют положительную роль в реакции на тепловой и солевой стрессы. Помимо этого, активность генов *StAMY5*, *StAMY11* и *StAMY15* была значительно повышена в ответ на обработку маннитолом, что говорит об их активной роли в реакции на засуху (Duan et al., 2024).

В случае *S. tuberosum* и устойчивости клубней картофеля к холодовому стрессу и холодовому осахариванию особый интерес представляют два гена  $\alpha$ -амилаз – *StAmy1* и *StAmy23*, для которых была показана транскрипция в клубнях, но только *StAmy23* мог индуцироваться низкой температурой (Zhang et al., 2014). Было показано, что *StAmy23* разрушает цитозольный фитогликоген в клубнях, подвергшихся холодовому осахариванию (Hou et al., 2017). Транскрипция гена *StAmy23* была показана только в проростках клубней картофеля, хранившихся в течение 19 недель при пониженных температурах (+8°C). Анализ корреляций паттернов экспрессии этих генов с содержанием редуцирующих сахаров показал важность  $\alpha$ -амилаз, прежде всего *StAmy23*, в разложении крахмала в клубнях в условиях холодового стресса (Zhang et al., 2014b). У трансгенных растений картофеля, у которых ген *StAmy23* был ингибирован методом РНК-интерференции, прорастание клубней задерживалось в результате снижения скорости разложения крахмала. Кроме того, по сравнению с нетрансформированным контролем, в трансгенных клубнях, хранившихся при температуре +8°C в течение двух недель, наблюдалось значительное снижение накопления гексоз (Ferreira, 2012), что позволило предположить, что *StAmy23* играет одну из основных ролей в гидролизе крахмала в клубнях во время холодового стресса.

В совокупности имеющиеся данные однозначно указывают на активную вовлеченность генов *AMY* в реакции на стресс, однако, несмотря на показанную значимость, гены исследованы недостаточно, особенно у картофеля.

#### 1.4.1.2. Строение и функции $\beta$ -амилаз.

$\beta$ -амилазы (BAM) (EC 3.2.1.2, GH 14) были открыты и описаны гораздо позже  $\alpha$ -амилаз и в настоящее время изучены значительно хуже. Понимание роли  $\beta$ -амилазы в растениях значительно расширилось в последние десятилетия, тогда как до этого белки BAM считались незаменимыми запасными белками (Monroe and Storm, 2018). В настоящее время показана важная роль этих ферментов как в деградации крахмала, так и в регуляции генов, связанных с крахмальным метаболизмом (Streb and Zeeman, 2012).

$\beta$ -амилазы являются инвертирующими экзоамилазами, тем самым они существенно отличаются от  $\alpha$ -амилаз как по механизму действия, так и по специфичности гидролиза молекул крахмала (экзо- или эндодействующего) (Chia et al., 2004). Было показано, что действие  $\beta$ -амилаз приводит к гидролизу  $\alpha$ -1,4-звена крахмала, расположенного рядом с невозстанавливаемым концом  $\alpha$ -глюкана, в результате чего единственным низкомолекулярным продуктом гидролиза является мальтоза (4-O- $\alpha$ -D-глюкопиранозил- $\beta$ -D-глюкопираноза) в  $\beta$ -конфигурации. BAM не может приводить к гидролизу  $\alpha$ -1,6 связи.

В том случае когда амилопектин крахмала подвергается действию  $\beta$ -амилазы,  $\alpha$ -1,4 цепи глюкозана в сильно разветвленной молекуле просто сокращаются от конца цепи до  $\alpha$ -1,6 точек разветвления. При этом гидролиз полностью прекращается за четыре звена глюкозы перед точками разветвления, образуется мальтоза и высокомолекулярный разветвленный декстрин (Monroe and Storm, 2018).

Как было упомянуто выше,  $\beta$ -амилазы имеют сходную с  $\alpha$ -амилазами белковую структуру. В настоящее время трехмерная структура  $\beta$ -амилаз растений была определена для ячменя *H. vulgare*, сои *Glicine max* L. и батата *Ipomoea batatas* (L.) Lam (Mikami et al., 1999). При этом все известные на данный момент белки ВАМ обладают одинаковой структурой каталитического домена, что, с одной стороны, указывает на то, что такая топология домена является оптимальной для распознавания субстрата, с другой – об общности происхождения и что ВАМ-гены растений произошли от симбиотических бактерий (Vajravijayan et al., 2018).

Как было показано, трехмерная структура  $\beta$ -амилазы состоит из двух доменов: большого домена А (а.о. 1-417) и малого домена В (а.о. 418-516). Каталитический центр этого фермента представлен короткими петлями, расположенными между  $\beta$ -листами и  $\alpha$ -спиралями и образует характерную для всех амилаз  $(\beta/\alpha)_8$ -цилиндрическую структуру. Каталитический центр образует карман, в центре которого два остатка Glu186 и Glu380 (у большинства исследованных белков растений), которые действуют в качестве донора протонов и нуклеофила (Kang et al., 2004). Домен В обладает крахмалосвязывающей активностью. Считается, что ферменты ВАМ связываются с амилозой цепью случайным образом, но могут также последовательно катализировать выработку мальтозы после первоначального связывания с субстратом (Kaplan et al., 2006).

Массовое секвенирование растительных геномов позволило более детально определить семейство ВАМ-генов, однако, так же как и в случае генов АМУ, относительно подробный анализ семейства проводился лишь нескольких видов, таких как арабидопсис, чайный куст и кассава. Кроме того, еще одной большой проблемой в исследовании генов  $\beta$ -амилаз разных видов растений является различное обозначение ВАМ-генов у различных растений: так, например, *AtBAM1* арабидопсиса ортологичен *PpBAM6* персика *Prunus persica* L., *GmBAM5* сои, *VvBAM3* винограда *Vitis vinifera* L., а также *GhBAM4*, *GhDFM18*, *GhBAM35*, *GhBAM40* хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. (Yue et al., 2019). Однако в последнее время при идентификации генов ВАМ их стараются обозначать по ортологу арабидопсиса, что несколько облегчает сравнение. В связи с этим описание структуры, функций и локализации  $\beta$ -амилаз будет основано на семействе ВАМ *A. thaliana*.

Исследования генов *BAM* в геномах арабидопсиса, тополя, киноа, ячменя, кассавы, хлопчатника, банана, картофеля, кукурузы, просо, риса показали, что они принадлежат к мультигенным семействам. Генное семейство  $\beta$ -амилаз немногих детально исследованных растений включает 8-34 членов (Mason-Gamer, 2005; Vogel et al., 2010; Koide et al., 2011; Gong et al., 2013; Peng et al., 2014; Wang et al., 2016; Vatansever et al., 2016; Monroe and Storm, 2018; Yue et al., 2019; Zhang et al., 2021; Yang et al., 2023). У арабидопсиса было описано девять членов семейства *AtBAM1-AtBAM9*, у картофеля – 10. Было показано, что все генные последовательности *BAM* относительно небольшие, они разнообразны по структуре и функциям, включая кодирующие каталитические и некаталитические домены и мотивы (Yue et al., 2019; Thalmann et al., 2019).

Филогенетические деревья, построенные по данным известных белковых последовательностей *BAM* растений, позволяет группировать их в четыре основных кластера, различающиеся достаточно существенно (Fulton et al., 2008; Peng et al., 2014; Yue et al., 2019). Кластер I включает *BAM4* и *BAM5*; кластер II – *BAM1*, *BAM3* и *BAM6*; кластер III включает только *BAM9* – наиболее дивергентного члена семейства; а *BAM2*, *BAM7* и *BAM8* принадлежат к группе IV. При этом, хотя многочисленные белковые последовательности *BAM* были разделены на четыре группы, белки однодольных растений (рис, кукуруза, сорго) формируют отдельные подгруппы, что может говорить о ранней дивергенции однодольных и двудольных. Интересно, что у генов *BAM* кассавы был выявлен альтернативный сплайсинг: *MeBAM6.1* и *MeBAM6.2* представляли собой альтернативный сплайсинг одного и того же гена в результате транскрипции с альтернативных промоторов, а *MeBAM10.1-MeBAM10.3* имели одинаковые консервативные мотивы и имели альтернативные терминаторы (Yang et al., 2023).

Транскрипция генов *BAM* регулируется многими факторами, включающими свет, фитогормоны, сахара (Маео et al., 2001; Kaplan et al., 2006). Но прежде всего гены *BAM* активно участвуют в реакции растений на многочисленные неблагоприятные условия окружающей среды. Об этом также свидетельствует большое количество цис-активных элементов, связанных преимущественно с реакциями на абиотические стрессы, в том числе на холод, в регуляторных последовательностях гена. В регуляторных последовательностях генов  $\beta$ -амилаз *GhBAM* хлопчатника содержится 803 *cis*-элемента, связанных с гормонами. Кроме того, почти все гены *BAM*, так же как и *AMY*-гены, содержали множество MYB- и MYC-элементов и на многих растениях, таких как арабидопсис, рис, кукуруза, кассава, банан и чай показано, что транскрипция генов метаболизма крахмала регулируется данными ТФ (транскрипционный фактор) (Lu et al., 2002; Lv et al. 2017; Xiao et al., 2017; Fan et al., 2018, Yue et al., 2019, Yang et al., 2023).



Проведенный анализ белковых последовательностей показал, что белки ВАМ имеют сходный состав мотивов (рис. 7А).

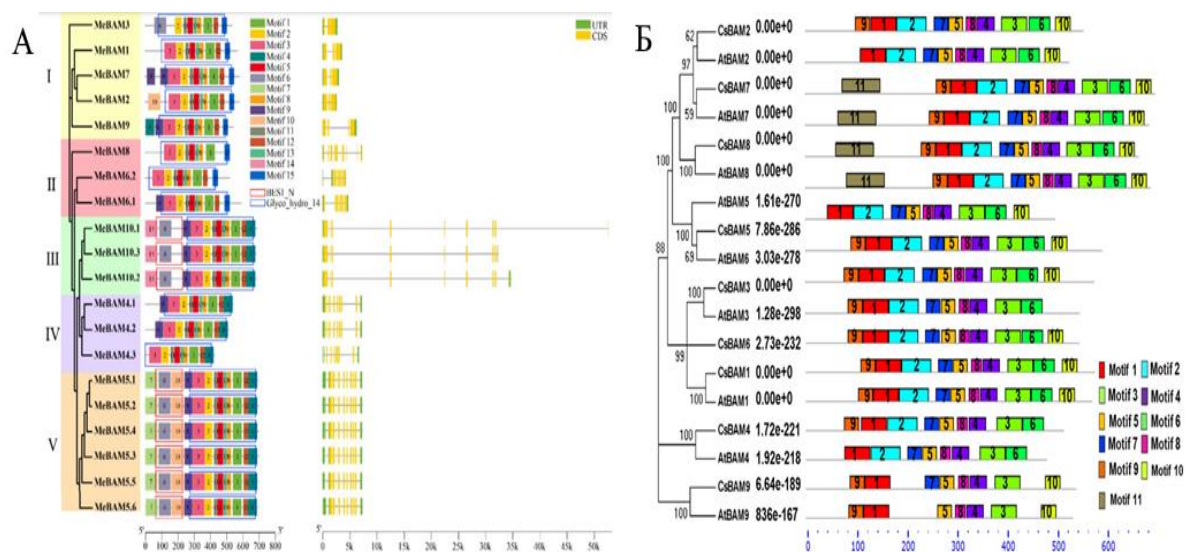


Рисунок 7 – Анализ семейств генов ВАМ (эволюционное дерево, консервативные мотивы и домены семейства ВАМ, генная структура). А – MeVAM (кассава, *M. esculenta*) (Yang et al., 2023). Б – AtVAM (арабидопсис) и CsVAM (чай, *C. sativa*) (Yue et al., 2019).

Ряд мотивов сохраняются у всех представителей семейства, независимо от того, обладают ли они каталитической активностью или нет (Yue et al., 2019; Yang et al., 2023). Некоторые белки имеют специфические мотивы, как, например, ВАМ7, так и ВАМ9, которые имеют дополнительный мотив на N-конце белка. Этот мотив, как было предсказано, является специфическим BZR1 доменом (~160 а.о.), характерным для транскрипционных факторов, регулируемых брассиностероидами (Soyk et al., 2014) (рис. 7А).

Идентичность белков из разных групп не превышает 60%, что позволяет сделать предположение об их достаточно ранней дивергенции, в отличие от белковых последовательностей внутри групп, которые возникли в результате недавних дупликаций кодирующих их генов (Thalmann et al., 2019; Yue et al., 2019) (рис. 7Б).

ВАМ-белки локализуются в различных клеточных компартментах (хлоропластах, цитозоле, вакуоли, ядре) и обладают как каталитическими, так и регуляторными функциями (Kaplan et al., 2006; Yue et al., 2019; Thalmann et al., 2019). Показано, что ортологичные гены выполняют одну и ту же функцию и из-за сумбура в обозначениях генов, упомянутого выше, описание структуры, функций и локализации β-амилаз будет основано на семействе ВАМ арабидопсиса. Белки ВАМ можно подразделить на три группы на основе доказанной каталитической активности: каталитически активные (ВАМ1, ВАМ2, ВАМ3, ВАМ6), каталитически неактивные (ВАМ4, ВАМ5, ВАМ9) и

белки, чья активность на данный момент не определена (BAM7, BAM8). Наиболее значимые каталитически активные BAM1 и BAM3 будут охарактеризованы ниже.

Белок BAM2, обладающий каталитическими свойствами, считается одним из древнейших членов семейства  $\beta$ -амилаз и присутствует в геномах всех линий наземных растений (Thalman et al., 2019). Как было показано для *GmBAM2* сои, у белка присутствуют все необходимые остатки активного центра, но при этом в нормальных условиях его активность крайне низка и для ее активации требуется присутствие дополнительных ионов  $K^+$ . Также было показано, что у восьминедельных *bam2*-мутантов арабидопсиса листья накапливают избыток крахмала, что указывает на особую роль BAM2-генов на этой стадии развития (Monroe et al., 2014). Были показаны его необычные свойства: он активен в виде тетрамера и обладает вторичным сайтом связывания с субстратом, отличным от активного центра. Интересно, что аминокислотные остатки вторичного сайта связывания сохраняются среди ортологов BAM2 у всех наземных растений, что позволяет предположить, что это свойство функционально важно (Monroe et al., 2018). Представляется вероятным, что уникальные свойства BAM2 играют важную роль в деградации крахмала, которая в настоящее время неизвестна.

Каталитически неактивными считаются  $\beta$ -амилазы BAM4 и BAM9. Они относятся к так называемым псевдоферментам – белкам, которые по гомологии последовательностей принадлежат к семейству ферментов, но не обладают каталитической активностью (Eyers et al., 2016). Этот новый класс белков был обнаружен во многих различных семействах ферментов. Эти некаталитические белки выполняют уникальные и жизненно важные функции в передаче сигналов и метаболизме, включая связывание субстратов и аллостерическую модуляцию других белков (Murphy et al., 2017).

*BAM4*- и *BAM9*- подобные гены обнаружены только в геномах покрытосеменных растений, что может говорить об их эволюционной молодости. Растения арабидопсиса, мутантные по генам *BAM4* или *BAM9*, демонстрируют фенотип накопления крахмала, что, в сочетании с наблюдаемым отсутствием каталитической активности, может говорить о том, что они выполняют регуляторные функции в метаболических путях крахмала. Было выдвинуто предположение, что BAM4 может играть стимулирующую или регулирующую роль в деградации крахмала, которая не связана напрямую с BAM1 или BAM3 (Li et al., 2009). Так как показано, что BAM4 способен связываться как с амилозой, так и с амилопектином на уровнях, сходных с BAM1 и BAM3, предполагается, что функция BAM4 может контролироваться связыванием крахмала или сахара (Li et al., 2009). Дополнительная характеристика BAM4 у растений-нокаутов может быть обнаружена у других фенотипов, которые могли бы уточнить его роль в метаболизме крахмала.

В отличие даже от BAM4, данных по BAM9 еще меньше. Известно, что *AtBAM9* достаточно интенсивно экспрессируется вне фотосинтетической ткани (корни, почки, цветы), но в минимальном количестве в листьях и стеблях и находится под циркадной регуляцией (Chandler et al., 2001; Smith et al., 2004). Было обнаружено, что растения, в которых отсутствуют BAM9 и BAM3, накапливают больше крахмала, чем растения, мутантные только BAM3, что позволяет предположить, что BAM9 играет важную роль в метаболизме крахмала (Steidle, 2010). Анализ клубней картофеля показал, что белок StBAM9 локализован на поверхности крахмальных гранул, что может быть обусловлено межбелковым взаимодействием, либо связыванием с амилозой/амилопектином, поскольку BAM9 сохраняет некоторые из идентифицированных остатков, связывающих крахмал (Hou et al., 2017). Недавно были получены данные, что BAM9 связан со стрессоустойчивостью. Так, было показано значительное увеличение *MeBAM9* в корнях кассавы при умеренной засухе (Yang et al., 2023). Также экспрессия *CsBAM9* в растениях чая повышается во время акклиматизации к холоду (Yue et al., 2015). В дополнение к индукции экспрессии при холодовом стрессе, транскрипция *CsBAM9* усиливается при засухе, солевом стрессе и АВА-стрессе (Yue et al., 2019).

Считается, что белки AtBAM5 и AtBAM4, по-видимому, непосредственно не участвуют в расщеплении крахмала, поскольку соответствующие мутанты, например, *bam5* имеют нормальный уровень крахмала (Batailler et al., 2012).

Анализ многих растений показал, что к наиболее каталитически активным  $\beta$ -амилазам относятся BAM1 и BAM3, которые локализованы в пластидах (Monroe and Storm, 2018). Их генные и белковые последовательности имеют достаточно высокую гомологию (74,6% в случае *CsBAM1* и *CsBAM3*), сходное экзон-интронное строение (Yue et al., 2019; Yang et al., 2023). Их белки, имея одинаковые сайты активного центра, одинаковый набор и взаимное расположение мотивов каталитического домена, могут различаться только наличием дополнительного мотива на N-конце последовательности BAM3 (рис. 7) (Yue et al., 2019; Yang et al., 2023). В настоящее время имеется достаточно данных, что именно пластидные BAM1 и BAM3 играют основополагающую роль в деградации пластидного крахмала (Monroe and Storm, 2018; Thalmann et al., 2019; Yue et al., 2019; Yang et al., 2023). Сходство в структуре и каталитических свойствах дают возможность предположить, что ферменты выполняют одинаковые функции в хлоропластах, приводя к гидролизу крахмала и образованию мальтозы. Однако они отличаются локализацией экспрессии (клетки мезофила и устьиц), но также было показано значительные различия в регуляции транскрипции их генов.

Многочисленные исследования на мутантных линиях арабидопсиса показали, что *BAM3* связан со стрессом, особенно абиотическим стрессом. Так, было обнаружено, что *BAM3* транскрипционно может индуцироваться холодовым стрессом и было выдвинуто предположение, что пониженные температуры могут стимулировать гидролиз крахмала (Thalmann and Santelia, 2017). Но реакции на стресс явно сложны и при этом также было определено, что на деградацию или накопление крахмала оказывает влияние продолжительность холодового стресса (Monroe et al., 2014). В условиях кратковременного воздействия холодом происходило повышение экспрессии *BAM3* и увеличивалось содержание мальтозы, что приводило к защите от стресса. Однако при продолжительном стрессе в течение четырех дней активность *BAM3* падала более чем вдвое, что, как предполагалось, вызвано посттрансляционным ингибированием (Monroe et al., 2014). Считается, что *AtBAM3* является основной изоформой при разложении крахмала в ночное время, но при этом *AtBAM1* также может участвовать в этом процессе, по крайней мере, в отсутствие *AtBAM3*.

*BAM1* локализуется в замыкающих клетках устьиц (Horrer et al., 2016). Продукты разложения крахмала используются для образования осмотически активных метаболитов, которые способствуют раскрытию устьиц. Мутанты по гену *BAM1* теряют способность расщеплять крахмал в замыкающих клетках, что приводит к нарушению открытия устьиц (Horrer et al., 2016). Показано, что у арабидопсиса *BAM1* работает совместно с пластидной  $\alpha$ -амилазой *AMY1* и транскрипция обоих генов активируется АБК (Thalmann et al., 2016).

Интересно, что при осмотическом и тепловом стрессах ген *BAM1* также может индуцироваться в клетках мезофилла старых листьев (Thalmann and Santelia, 2017). В недавнем исследовании холодового осахаривания клубней картофеля уровни мРНК *StBAM1*, ортолога *AtBAM1*, после 30 дней хранения при температуре +4°C повышались в три раза (Hou et al., 2017). В то же время холодовый стресс никак не влиял на экспрессию *AtBAM1* в листьях арабидопсиса (Kaplan and Guy, 2004; Maruyama et al., 2009; Monroe et al., 2014). С другой стороны, RNAi-подавление экспрессии *StBAM1* приводило лишь к небольшим и непоследовательным изменениям активности *BAM1*, уровня крахмала и осахаривания клубней, вызванного холодом, поэтому трудно сделать вывод о том, какую роль играет данный белок в клубнях картофеля (Hou et al., 2017).

#### 1.4.2. Ингибиторы $\alpha$ -амилазы.

Терминологически ингибиторы  $\alpha$ -амилазы определяются как любые соединения (ферменты, вторичные метаболиты, синтетические химические вещества), способные контролировать активность белков  $\alpha$ -амилаз, путем формирования с ними комплексных

взаимодействий (Kasar et al., 2022). Ингибиторы  $\alpha$ -амилазы делятся на два класса: небелковой и белковой природы. К наиболее распространенным представителям небелковых ингибиторов  $\alpha$ -амилаз относятся полифенольные соединения, флавоноиды, полисахариды (акарбоза, акарвиозин-глюкоза), кумарин и др. (Kashtoh et al., 2023).

Ингибиторы  $\alpha$ -амилазы (AAI, AI) белковой природы представляют собой гликопротеины, которые способны ингибировать гидролиз крахмала  $\alpha$ -амилазой. К настоящему времени ингибиторы амилазы были выявлены у бактерий, животных и растений (Franco et al., 2002). Исходно растительный ингибитор  $\alpha$ -амилазы был выделен у фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) в 1975 году и была показана возможность этого белка ингибировать  $\alpha$ -амилазы слюны человека (Marshall and Lauda, 1975). Основной функцией ингибиторов  $\alpha$ -амилазы растений является регулирование скорости деградации крахмала в том числе и при абиотических стрессах, что приводит к различным физиологическим изменениям путем регуляции углеводного метаболизма, а также является одним из механизмов защиты растений от насекомых путем ингибирования их амилаз.

Было показано, что в растениях большое количество AI было выявлено у видов, для которых характерно большое содержание крахмала, особенно в запасующих органах, таких как семена, корнеплоды, клубни. В настоящее время белки ингибиторы амилазы были выделены, прежде всего, у зерновых культур, таких как пшеница *Triticum aestivum* L. (Franco et al., 2002), ячмень *H. vulgare* (Abe et al., 1993), рис *O. sativa* (Yamagata et al., 1998), рожь *Secale cereale* L. (Iulek et al., 2000) и др., а также у бобовых, вигны *Vigna unguiculata* L. Verdc (Melo et al., 1999) и фасоли *P. vulgaris* (Marshall and Lauda, 1975). Различные растительные ингибиторы  $\alpha$ -амилазы проявляют разнообразную специфичность в отношении  $\alpha$ -амилаз из разных источников. В некоторых случаях ингибиторы  $\alpha$ -амилазы действуют только против  $\alpha$ -амилаз млекопитающих или, наоборот, только против  $\alpha$ -амилаз насекомых. Было обнаружено, что белок AI из клубнелуковиц *Colocasia* ингибирует активность  $\alpha$ -амилазы картофеля и снижает содержание сахара в картофельных чипсах (Kumari et al., 2012). Более того было показано, что некоторые ингибиторы также могут действовать против  $\beta$ -амилаз (Zhang et al., 2014b).

Проведенный анализ AI-последовательностей показал, что они имеют сходную белковую структуру и содержат конценсусный для растений набор из восьми остатков цистеина, которые образуют четыре высоко консервативные дисульфидные связи (Lay and Anderson, 2005). Показано, что такая структура белка AI формирует комплекс, который ингибируют амилазы посттрансляционно, изменяя конформацию  $\alpha$ -амилаз, что и приводит к снижению их ферментативной активности (Kumari et al., 2012).

В геноме мягкой пшеницы сорта Butte 86 было выявлено 19 генов ингибиторов амилаз, расположенных на хромосомах всех трех геномов *T. aestivum* (Altenbach et al., 2011). Несмотря на значительное число генов, они группировались в три кластера, и вариабельность внутри членов кластера была небольшой. Все кодирующие последовательности генов различались незначительно (438-614 п.н.), равно как их белковые последовательности (121-181 а.о.) (Altenbach et al., 2011).

Считается, что растительные ингибиторы синтезируются в эндосперме и алеуроновых слоях семян, одновременно с запасными белками во время наполнения зерен (Nielsen et al., 2004). Так для пшеницы было показано, что 16 из 19 идентифицированных AI генов мягкой пшеницы экспрессировались в эндосперме зерна (Altenbach et al., 2011). Гликопротеин AI может образовываться посредством четырехэтапных биохимических процессов: синтез белка AI в результате экспрессии соответствующего гена AI, котрансляционное удаление сигнального пептида, посттрансляционная модификация белка путем добавления гликанов в аппарате Гольджи (так называемое образование пре-белка) и транспортировка белка в вакуоли (в некоторых случаях в эндоплазматический ретикулум) (Macz  et al., 2015). Экспрессия генов ингибиторов амилаз приводит к трансляции белков разного размера (мономер, димер и тетрамер) с несколько различным составом аминокислот, как это было показано в частности для пшеницы (Altenbach et al., 2011). Также было показано, что, например, гетеротетрамерная структура, содержащая  $\alpha\beta 2$ , необходима для установления прочного связывания с двумя молекулами  $\alpha$ -амилазы (Payan, 2004).

Структуры комплексов фермент/ингибитор были определены для различных типов ингибиторов растений и показано, что способы взаимодействия ингибиторов с тремя каталитическими кислотными группами амилаз могут довольно сильно различаться. При этом белки двух типов ингибиторов могут напрямую имитировать субстрат и, в результате, ингибируют амилазу, образуя комплекс, который блокирует активный центр фермента. Ген ингибитора амилазы-1 AI был сверхэкспрессирован в растении кофе и у трансгенных семян выявлено ингибирование активности фермента более чем на 80% (Barbosa et al., 2010). Эти результаты позволяют предположить, что существуют специфические взаимодействия между отдельными амилазами и ингибиторами амилазы.

Одним из наиболее интересных классов регуляции углеводного обмена у растений является подсемейство ингибиторов амилаз AAI\_LTSS, для которого также показано участие в защите растений от фитопатогенов и в межмембранном липидном транспорте. Представителем семейства является белок Amylase Inhibitor *Solanum berthaultii* (SbAI) — ген ингибитора амилазы картофеля *S. berthaultii* (Zhang, 2013). Роль этого белка

ингибитора была детально исследована в отношении амилазы в клубнях картофеля (Zhang, 2013; Zhang et al., 2014a,b).

Данный белок крайне интересен для данной диссертационной работы, так как показано, что у холодоустойчивых (CIS-устойчивых) сортов картофеля наблюдается повышенная экспрессия гена *SbAI* при хранении клубней при температуре +3°C. Это резко контрастирует с поведением сортов, чувствительных к холодовому осахариванию, у которых уровень экспрессии *SbAI* значительно ниже. Выявлена отрицательная корреляция между уровнем транскриптов *SbAI* и концентрацией редуцирующих сахаров в клубнях, что указывает на важную роль этого белка в регуляции процесса осахаривания. Тем самым было однозначно показано, что *SbAI* может быть важным регулятором деградации крахмала в клубнях картофеля и быть важным фактором при холодовом осахаривании (Zhang, 2013; Zhang et al., 2014a,b).

кДНК *SbAI* (GenBank: HS989783) имела длину 799 п.н., включая открытую рамку считывания (ORF) длиной 621 п.н, содержала последовательность, кодирующую сигнальный пептид, а также 5'- нетранслируемую область длиной 178 п.н. и кодировала белок, состоящий из 207 аминокислотных остатков (Zhang et al., 2014b). Анализ аминокислотной последовательности показал, что полученный белок включает домен 'Tryp\_alpha\_amyl', расположенный в области 30-108 а.о. Ранее было показано, что гены, содержащие 'Tryp\_alpha\_amyl', относятся к известному семейству ингибиторов альфа-амилазы (AAI), белков-переносчиков липидов (LTP) и запасных белков семян (SS) (Marchler-Bauer et al., 2010). Тем самым было подтверждено, что белок *SbAI S. berthaultii* действительно является ингибитором амилазы (Zhang et al., 2014a,b). Было высказано предположение, что *SbAI* может обладать специфической ингибирующей активностью, либо специфическими формами, либо специфическими механизмами действия, одним из которых является ингибирование исключительно амилаз картофеля, индуцируемых холодовым стрессом (Zhang et al., 2014a,b). Ингибитор *SbAI* может оказывать ингибирующее влияние не только на  $\alpha$ -амилазы, но и на две  $\beta$ -амилазы (*StBAM9*, *StBAM3*), индуцируемые при холодовом стрессе в клубнях (Zhang et al., 2014b).

Обращает на себя внимание то, что в результате исследований действия кратковременного холодового стресса (+3°C) не было выявлено прямой зависимости между количеством транскриптов *SbAI* и активностью амилазы в клубнях картофеля и было предположено, что гидролиз крахмала, так же как это было показано для других амилаз, может регулироваться на посттрансляционном уровне (Zhang et al., 2014b).

В экспериментах по генетической трансформации сверхэкспрессия *SbAI* в картофеле приводила к снижению активности амилазы и скорости разложения крахмала,

что сопровождалось падением содержания редуцирующих сахаров в клубнях, хранящихся в холодильнике (+3-4°C). При этом трансгенные линии с замолканием гена *SbAI* за счет RNAi показали противоположный результат и репрессия *SbAI* сопровождалась некоторым повышением экспрессии  $\alpha$ -амилазы *StAMY23* в клубнях (Zhang et al., 2014 a,b).

Можно предположить, что ингибирование гена *SbAI* при холодовом стрессе приводит к замедлению распада крахмала и уменьшению степени холодового осахаривания в клубнях. Кроме того, на изменение экспрессии генов амилаз влияют эффекты обратной связи с сахаром, что означает, что глюкоза и фруктоза являются сигнальными молекулами, катализирующие транскрипцию в клубнях картофеля генов *AMY* и генов ингибиторов амилаз *AI* (Zhang, 2013; Zhang et al., 2014b; Слугина и др., 2020).

Таким образом, было показано, что *SbAI* может ингибировать активность как  $\alpha$ -амилазы, так и  $\beta$ -амилазы в клубнях картофеля, главным образом, путем подавления *StAMY23* и *StBAM1*, соответственно. Эти результаты стали прямым доказательством того, что *SbAI* может быть ключевым регулятором амилаз, которые контролируют разложение крахмала и накопление редуцирующих сахаров в клубнях картофеля в условиях холодового стресса. Однако специфические механизмы регуляции между *SbAI* и амилазами в клубнях картофеля, длительно хранящихся при низкой температуре, требуют дальнейшего изучения.

#### **1.4.3. АДФ-глюкозопирофосфорилаза AGPase.**

Среди всех основных ферментов, участвующих в метаболизме крахмала в растениях, АДФ-глюкозопирофосфорилаза (AGPase) является одним из ключевых ферментов, осуществляющих синтез АДФ-глюкозы (ADP-Glc) из глюкозы-1-фосфата и АТФ, и тем самым контролирующим количество крахмала в различных органах растений, в том числе и в запасных тканях (клубне, эндосперме зерна, и др.) (Saripalli, 2015). Белок AGPase присутствует как в цитозоле клеток, так и в пластидах. Как пластидная (хлоропластная и амилопластная), так и цитозольная AGP-азы функционируют как гетеротетрамеры ( $\alpha_2\beta_2$ ). Каждая из гетротетрамеров AGP-азы включает по две большие LS ( $\beta_2$ ) и две малые SS ( $\alpha_2$ ) субъединицы (Preiss et al., 1990). Проведенные исследования показали, что каталитические и особенно регуляторные свойства AGPase у высших растений являются результатом синергетических взаимодействий между двумя типами субъединиц (Hwang et al., 2005). Считается, что LS субъединица выполняет регуляторную функцию, в то время как SS – обе, и регуляторную, и каталитическую. Гены *AGPaseS*, кодирующие малые субъединицы, как правило, экспрессируется в большинстве тканей,



тогда как *AGPaseL*, демонстрируют тканеспецифичный паттерн экспрессии. Анализ промоторов (1 т.п.н. от стартовой точки) *AGPaseL* и *AGPaseS* выявил большое количество цис-регуляторных элементов, связанных с реакцией на абиотические стрессы (Batra et al., 2017).

Было однозначно показано наличие ферментативной активности у *AGPaseS* белка. Впервые его кристаллическая структура была получена для *S. tuberosum* (Jin et al., 2005). Было обнаружено, что каталитический центр AGPase картофеля имеет на каждом конце карман, связывающим глюкозу. Функционально крайне важна также дисульфидная (S–S) связь между двумя остатками Cys12 в каталитического сайте, так как она регулирует активность AGPase растений и определено, что эта дисульфидная связь увеличивает сродство фермента к белку-активатору (3-фосфоглицерату 3-PGA) и субстрату АТФ (Jin et al., 2005; Figueroa et al., 2022).

Было несколько экспериментов по стимулированию синтеза крахмала путем экспрессии AGPase. Показана положительная корреляция между активностью AGPase и содержанием крахмала в клубневидных корнях. В случае картофеля в клубнях трансгенного картофеля, экспрессирующей антисмысловую конструкцию с геном AGPase, содержание крахмала снижалось, в то время как сверхэкспрессия гена *AGPase* в клубнях картофеля приводила к повышенному накоплению крахмала, а также к увеличению массы клубней (Wang et al., 2007).

При анализе генов, влияющих на содержание сахаров в клубнях *S. tuberosum* в условиях холодового стресса, было показано, что AGPase отвечает за 13,3% образующихся редуцирующих сахаров (Menéndez et al., 2002). Также активность экспрессии гена *AGPaseS* отрицательно коррелировало с накоплением глюкозы и фруктозы в клубнях картофеля при холодовом стрессе (Song et al., 2005). Также были показаны значительные изменения в экспрессии генов обеих субъединиц в клубнях двух сортов картофеля при непродолжительном (5 и 15 дней) холодовом стрессе. При этом показан разнонаправленный паттерн экспрессии в клубнях у CIS-устойчивого и CIS-чувствительного генотипов. Предполагается, что повышенная экспрессия AGPase может быть крайне важна для CIS- устойчивости (Liu et al., 2021).

#### **1.4.4. α-глюкан- и фосфоглюкан водные дикиназы GWD/PWD.**

Фосфорилирование крахмала является практически единственной модификацией, которая происходит в процессе разложения крахмала, которое может изменить определенные физико-химические свойства крахмала (Singh et al., 2003; Compart et al., 2023). При фосфорилировании крахмала увеличивается поверхность крахмальных гранул

и их доступность для ферментов деградации, таких как амилазы. Тем самым именно фосфорилирование запускает процесс деградации крахмала (Mahlow et al., 2014, 2016).

Было показано, что у растений процесс фосфорилирования крахмала осуществляется белками GWD (Glucan, water dikinase, GWD, R1 (у *S. tuberosum*), SEX1 (у *A. thaliana*)). Эти ферменты являются фосфотрансферазами, которые переносят фосфорсодержащие группы с помощью парных акцепторов (дикиназ). Было показано, что  $\alpha$ -глюкан водные дикиназы могут катализировать реакцию  $\alpha$ -глюкана и АТФ с водой.  $\beta$ -фосфат переносится на гистидиновый остаток в каталитическом центре белка GWD, а оттуда на C6-гидроксильную группу в молекуле амилопектина, в результате чего глюкановые цепи в крахмальной грануле переходят из высокоупорядоченной структуры в более водорастворимое состояние (Ritte et al., 2002). Переход поверхностных глюканов в более растворимое состояние имеет решающее значение для гидролаз, связанных с крахмалом, прежде всего таких как  $\beta$ -амилазы ВАМ. Таким образом, было доказано, что фосфорилирование поверхностных глюканов с помощью GWD повышает гидролитическую активность  $\beta$ -амилаз (Monroe, 2020). GWD растений катализирует фосфорилирование крахмала, которое, в свою очередь, регулирует как деградацию крахмала, так и его последующий биосинтез (Skeffington et al., 2014).

В настоящее время известны два представителя семейства  $\alpha$ -глюкан водных дикиназ: GWD1 и фосфоглюкан водная дикиназа GWD3/PWD. Гены *GWD* присутствуют во многих растениях, но эволюционная история и функции ферментов не идентичны (Adegbaaju et al., 2020). Так, GWD1 фосфорилирует глюкозильные остатки амилопектина в крахмальном зерне в положении C6 (Ritte et al., 2002). Затем GWD3/PWD дополнительно фосфорилирует другой глюкозильный остаток в положении C3 (Baunsgaard et al., 2005). Показано, что мутации либо в гене *GWD1*, либо в *GWD3/PWD* приводили к замедлению деградации и накоплению крахмала в листьях растений (Yu et al., 2001; Baunsgaard et al., 2005). У кассавы *M. esculenta* GWD1 способствует увеличению содержания крахмала, тем самым влияя на рост корней при хранении, а также на транзиторийный крахмал в листьях (Zhou et al., 2017). Ранее также было показано, что у *gwd1*-мутанта риса накапливался крахмал в листьях, и при этом заметно снижалась урожайность за счет меньшего количества метелок на растении и более мелких и менее созревших зерен (Hirose et al., 2013). С другой стороны, трансгенные растения риса со сверхэкспрессией гена *GWD1* картофеля продуцировали высоко фосфорилированный крахмал (Chen et al., 2017).

Гены *GWD* присутствуют в геноме многих растений, представленных в базе NCBI, но детально они практически ни у кого не охарактеризованы и эволюционная история и функции ферментов могут быть не идентичны (Adegbaaju et al., 2020). Это связано, прежде

всего, с протяженностью гена. Согласно нашим данным, ген *GWD1 S. tuberosum* (линия RH89-039-16), представленный в базе данных NCBI, имеет длину 19 188 п.н. (Gene ID: 102577510), содержит 34 экзона. При этом длина кодирующей последовательности составляет всего 4392 п.н. Показано, что ген локализован на хромосоме 5. В настоящее время имеется только две работы с относительно детальным описанием кДНК и белковых последовательностей  $\alpha$ -глюкан водной дикиназы GWD1 (Adegbaaju et al., 2020; Compart et al., 2023); гомологичный ген и белок PWD до сих пор не охарактеризован. Была описана вариабельность кДНК *GWD1* (но не *GWD3/PWD*) и кодируемого белка у 48 видов низших и высших растений, представленных в базе данных (Adegbaaju et al., 2020). Однако, в публикации был сделан основной акцент на эволюцию и особенности низших растений. Показано, что *GWD1* является монокопийным геном (за исключением дубликации у мха *Physcomitrella patens* Hedw.). Также было выдвинуто предположение о существовании другой функциональной эволюции в отношении *GWD3/PWD*.

В белковых последовательностях GWD было обнаружено три основных функциональных домена. На N-конце белка находится транзитный пептид (TP) для пластидной локализации, далее по последовательности располагаются два углеводсвязывающих модуля (CBM 45), один фосфогистидиновый домен и один АТФ-связывающий домен (Adegbaaju et al., 2020; Compart et al., 2023). Транзитный пептид локализации в пластидах был обнаружен у всех GWD1-белков покрытосеменных (но не голосеменных и низших растений). Этот пептид не был обнаружен у белков GWD2, возможно, связано с субфункционализацией этих белков в растениях (Adegbaaju et al., 2020). Также в белковых последовательностях GWD были выявлены два специальных каталитических домена связывания углеводов (CBM), также известные как крахмалосвязывающие домены (SBD) - CBM45 и CBM45s (Adegbaaju et al., 2020; Compart et al., 2023). Данные домены характерны для многих ферментов, участвующих в разложении крахмала, (например,  $\alpha$ -амилазы AMY3 *A. thaliana*). Наличие данных доменов необходимо и достаточно для выполнения функции фосфорилирования крахмальных зерен (Adegbaaju et al., 2020). Так, например, в трансгенной линии картофеля, в которой отсутствовал CBM45 мотив, предпочтительными субстратами для фосфорилирования были более короткие глюкановые цепи (Glaring et al., 2011).

Функции GWD достаточно подробно, в сравнении с другими растениями, были исследованы на картофеле. Неоднократно было показано, что картофель с более низкой активностью этого фермента имеет значительно более низкий уровень связанного с крахмалом фосфата (Viksø-Nielsen et al., 2001; Wickramasinghe et al., 2009). Меньший уровень фосфорилирования крахмала уменьшает разложение крахмала и накопление

сахаров в картофеле при холодовом осахаривании. Следовательно, дальнейшее снижение содержания фосфорилирования крахмала может приводить к повышению устойчивости картофеля к CIS. В связи с этим достаточно интересные исследования с точки зрения практического применения в селекции были получены по исследованию аллельного полиморфизма двух участков гена *StGWD* (627 и 606 п.н.) у 398 сортов и линий, включая образцы дикорастущих видов картофеля (Uitdewilligen et al., 2022). Был показан достаточно высокий полиморфизм анализируемых областей и выявлено 16 различных гаплотипов. Кроме того, анализ ассоциаций привел к выявлению специфических аллелей *StGWD*, вызывающих либо увеличение, либо уменьшение содержания фосфата, связанного с крахмалом. Так был выявлен один аллель, приводящий к снижению уровня фосфорилирования, но более интересен другой – связанный с повышением фосфорилирования крахмала, поскольку он может быть использован в маркер-опосредованной селекции для создания CIS-устойчивых сортов (Uitdewilligen et al., 2022). Кроме того, было показано, что при определенной комбинации четырех аллелей *StGWD* в тетраплоидном картофеле может быть достигнут вдвое более высокий уровень содержания фосфата в крахмале и следовательно более высокий уровень устойчивости к холодовому осахариванию (Uitdewilligen et al., 2022). Также было показано, что снижение экспрессии гена *StGWD* картофеля коррелирует со снижением разложения крахмала в клубнях картофеля при холодовом стрессе. Это может свидетельствовать об важной роли именно фосфорилирования  $\alpha$ -глицан-водной дикиназой *GWD* в распаде крахмала, по крайней мере, в клубнях и листьях картофеля (Orzechowski et al., 2021; Li et al., 2024).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Растительный материал.

Материалом исследования служили представители видов рода *Solanum* семейства Solanaceae. Образцы дикорастущих видов *Solanum* секции *Petota* были получены из коллекции Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха и генбанка Centre for Genetic Resources (г. Вагенинген, Нидерланды). В работе также использовались сорта и селекционные линии картофеля, предоставленные ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ВНИИКХ) (приложение, табл. П1).

Для анализа транскриптома использовали картофель сорта Леди Клэр. Отобранные в сентябре 2023 года клубни одного растения одинакового размера (диаметром 55–60 мм) были определены как полностью созревшие и хранились в климокамере при температуре +3°C в темноте в течение 0,5 (середина сентября), 3,5 (конец декабря) и 6,5 (конец марта) месяцев соответственно. В каждой из трёх временных точек клубни использовались для отбора проб (два биологических повтора). Образец представлял собой блок (включая перидерму, кору, сосудистое кольцо и перимедуллу) вокруг апикальной глазковой почки. Образцы замораживали в жидком азоте, хранили при температуре -80°C до получения последних образцов в конце марта.

Для определения вариабельности анализируемых генов у видов и сортов картофеля было отобрано 56 образцов представителей семейства Solanaceae, в том числе 8 образцов дикорастущих видов *Solanum* секции *Petota*, 42 сорта отечественной и зарубежной селекции и 6 линий картофеля селекции ВНИИКХ *S. tuberosum* (приложение, табл. П1 и П2). Растения картофеля (сорта и линии) выращивали на полях ВНИИКХ (пос. Коренево; отобранные и предоставлены к.б.н. Мелешиным А.А.); для выделения ДНК отбирался листовой материал, который хранился при температуре -80°C.

Для биохимического (измерение углеводов, каротиноидов, антоцианов) и экспрессионного анализа клубней картофеля при длительном холодовом стрессе были взяты пять сортов отечественной селекции (Барин, Красавчик, Надежда, Северное сияние, Утро), выращенные на полях ВНИИКХ в 2021 году. После сбора урожая в сентябре клубни были помещены на хранение в специализированное картофелехранилище ВНИИКХ (где поддерживалась температура +3°C). Анализ проводился в трех временных точках: сразу после сбора урожая в конце сентября (0 мес), затем в начале февраля, спустя 4 месяца хранения, и в конце апреля, спустя 7 месяцев хранения. Клубни отбирались в

каждой временной точке, замораживались в жидком азоте и хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для биохимического анализа листьев в ответ на кратковременный холододовый стресс использовали растения сорта Леди Клэр (зеленая окраска листьев) и селекционной линии Гибрид 1 с антоциановой окраской листьев и клубней (предоставлено к.б.н. Мелешиным А.А., ВНИИКХ). Растения выращивались в теплице ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН.

Для имитации кратковременного холододового стресса растения выращивались в теплице при  $+21^{\circ}\text{C}$  и затем моделировали условия кратковременного холододового стресса в климатической камере (Sanyo, Япония) при  $+3^{\circ}\text{C}$  (день/ночь 16 ч/8 ч). Листовые пробы отбирались в нескольких точках: 'к0' (контроль при  $+21^{\circ}\text{C}$ ), '6h', '24h', '48h' (стресс в динамике) и 'в12' (восстановление после стресса,  $+21^{\circ}\text{C}$ ). Материал (листья) замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Пробы использовались для биохимического и молекулярного анализа (рис. 8).

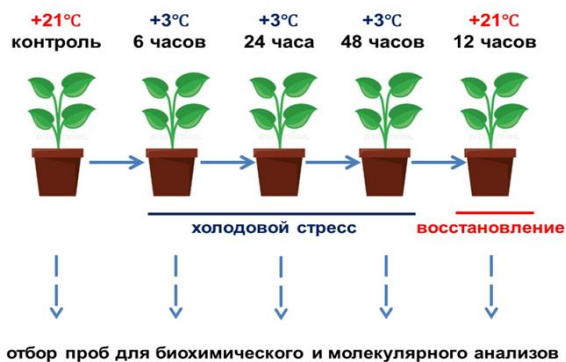


Рисунок 8 – Схема эксперимента кратковременного холододового стресса на растениях картофеля с зеленой и фиолетовой окраской листьев.

## 2.2. Выделение ДНК, РНК и синтез кДНК.

**Выделение растительной ДНК** выполняли по методике СТАВ-А (Puchooa, 2004) с дополнительной двойной депротеинизацией фенол/хлороформом.

**Выделение РНК.** Тотальную РНК выделяли из тканей различных органов картофеля (листья, стебли, корни, столоны, цветки, плоды, клубни (мякоть, кожура)). Для выделения тотальной РНК использовали набор реактивов RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для очистки полученных препаратов РНК проводили обработку ДНКазой I согласно инструкции, представленной в комплекте набора реактивов RNase Free DNase I Set (Magen, Китай).

**Синтез кДНК.** кДНК получали с использованием GoScript Reverse Transcription System (Promega, США), методика выделения согласно инструкции производителя.

Концентрации РНК, ДНК и кДНК определялись с помощью флуориметра Qubit 4 и соответствующего набора реагентов (Invitrogen, США). Дополнительно качество выделенной РНК проверялось методом электрофореза в агарозном геле.

### 2.3. Биохимический анализ.

**Определение содержания крахмала.** Для количественного определения крахмала в клубнях и листьях картофеля применяли набор Enzytec™ Liquid Starch (R-Biopharm AG, Германия) согласно инструкции, прилагаемой к набору. Метод основан на ферментативном расщеплении амилоглюкоамилазой (AGS крахмала до D-глюкозы с последующим фосфорилированием и выделением NADPH. Количество NADPH соответствующее количеству D-глюкозы, образовавшейся в результате гидролиза крахмала, определяли при длине волны 340 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer (Германия).

**Определение содержания моно- и дисахаров.** Образцы ткани картофеля анализировали на содержание (мг/100 г сырого веса) растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы) с использованием наборов Enzytec™ Liquid D-Glucose/DFructose и Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose (R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

**Определение содержания каротиноидов, хлорофиллов и антоцианов.** Для определения содержания вторичных метаболитов применяли метод Фолча (Solovchenko et al., 2001). После инкубации предварительно растертой в жидком азоте растительной ткани картофеля в смеси Фолча (хлороформ:метанол в соотношении 2:1) измеряли верхнюю водно-метанольную фазу (содержит фенолы и антоцианы) и нижнюю хлороформную фазу (содержит хлорофиллы и каротиноиды) каждую отдельно на спектрофотометре. Хлороформную фазу при необходимости разводили хлороформом в несколько раз так, чтобы цвет, в зависимости от интенсивности окраски, стал светло-зеленым и измеряли поглощение при нужной длине волны.

Содержание хлорофиллов а и b и сумму каротиноидов определяли при длинах волн указанных ниже и вычисляли по формулам:

$$\text{Хлорофилл а (мкг/мл)} = 11,47 (A_{666\text{нм}} - A_{750\text{нм}}) - 2 (A_{648\text{нм}} - A_{750\text{нм}})$$

$$\text{Хлорофилл b (мкг/мл)} = 21,85 (A_{648\text{нм}} - A_{750\text{нм}}) - 4,53 (A_{666\text{нм}} - A_{750\text{нм}})$$

$$\text{Сумма каротиноидов (сумма ксантофиллов и каротинов) (мкг/мл)} = [1000 (A_{480\text{нм}} - A_{750}) - 1,33 \text{ Chl a} - 23,93 \text{ Chl b}] / 202. (A_{\text{нм}} - \text{абсорбция при указанных длинах волн}).$$

Для определения антоцианов в отобранную водно-метанольную фазу добавляли по 2 капли концентрированной соляной кислоты и при необходимости разводили

полученный раствор mQ в 2-10 раз, после чего измеряли на спектрофотометре при длине волны 535 нм по формуле в пересчете на г сырого вещества (FW) по цианидин-3-гликозиду

$$\text{Антоцианы} \left( \frac{\text{мкг}}{\text{гFW}} \right) = \frac{A_{535} \times d \times V \times Mr \times 1000}{\epsilon \times m}.$$

Все измерения проводили в двух биологических и трех технических повторностях. Расчеты содержания каротиноидов, хлорофиллов и антоцианов проводили с помощью программы Excel.

## 2.4. Транскриптомный анализ.

Для приготовления библиотек мРНК использовали набор реагентов NEBNext® mRNA Library Prep для Illumina® (New England BioLabs Inc., США). Полученные библиотеки были секвенированы компанией MyGene Co. (Москва, Россия) с использованием спектрометра Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Сан-Диего, США).

Для картирования полученных прочтений транскриптов был использован геном картофеля *S. tuberosum* сорта DM 1-3 516 R44 (SolTub\_3.0; GCF\_000226075.1). После удаления последовательностей, содержащих адаптер (cutadapt v.1.17) и низкокачественных ридов (sickle v.1.33), парные перекрывающиеся прочтения были объединены с помощью FLASH v.1.2.11 (<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>; дата обращения: 10.11.2024) и выровнены с аннотированными генами в геноме картофеля. Анализы обогащения GO (Gene Ontology) и KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов) проводились с помощью ShinyGO 0.82 (Ge SX, 2020; <https://bioinformatics.sdstate.edu/go/>; дата обращения: 18.04.2025). Относительные уровни транскрипции идентифицированных генов рассчитывали как количество прочтений на т.п.н. экзонного региона гена на миллион картированных прочтений (RPKM).

Дифференциальную экспрессию генов анализировали с помощью программы DESeq2 ([www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html](http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html)); гены считались экспрессированными по дифференциальной экспрессии, если уровни экспрессии были не менее чем двукратными [абсолютное значение  $\log_2\text{FoldChange (FC)} \geq 1$ ], а  $\text{padj}$  (скорректированное значение P, или уровень ложноположительных результатов) был  $< 0,05$ . Для визуализации дифференциальной экспрессии генов использовали диаграммы Венна, тепловые карты, графики «Вулкан» и графики ПЦР против РНК-секвенирования.



## 2.5. Экспрессионный анализ.

Определение уровня экспрессии исследуемых генов проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием набора «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Условия реакции: первый цикл – 5 мин при 95°C; последующие 40 циклов – 15 сек при 95°C, 30 сек 60°C. Реакции содержали смесь SYBR Green RT-PCR (Syntol, Москва, Россия), 2,5 нг кДНК и ген-специфические праймеры. В качестве референса были взяты *Stsec3* и *Stef1*, так как ранее была определена эффективность генов-референсов для RT-PCR для *S. tuberosum* и такое сочетание повышает точность результатов RT-PCR по сравнению с одиночным референсным анализом.

## 2.6. Амплификация, клонирование и секвенирование.

Амплификацию нуклеотидных последовательностей анализируемых генов проводили с помощью набора реактивов LongAmp Hot Start Master Mix (New England Biolabs, США), следуя прилагаемой методике. Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл, где содержался 10X буфер, 1,5мкМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTP, по 5 мкМ соответствующих праймеров, а также 0,2 единицы Taq-полимеразы и ~100 нг геномной ДНК. Условия реакции: денатурация – 1 мин при 95°C; отжиг праймера – 1 мин при температуре соответствующей температуре плавления праймеров; элонгация ДНК – 1 мин на каждые 1 т.п.н. анализируемой последовательности при 72°C; число циклов – 35.

Визуализацию и анализ полученных продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (Universal Agarose) в 1X TBE-буфере, окрашенном бромистым этидием. В качестве стандарта молекулярных масс применяли DNA Ladder Mix и 100 bp DNA ladder Plus (“Fermentas”, Литва). Полученные результаты фотодокументировали с использованием системы GELdocGO (Bio-Rad, США).

Клонирование полноразмерных кодирующих последовательностей гена осуществляли согласно методике набора Evrogen Quick-TA kit (Россия). Лигирование с вектором проводили в 10 µl реакционной смеси: 1 µl вектора (pDrive Cloning Vector (50 ng/µl)), 3 µl очищенного ПЦР продукта, 5 µl Ligation Master Mix и 3 мкл очищенной воды.

Трансформацию компетентных клеток штамма XLBlue 4 мкл лигазной смеси проводили стандартным методом. Полученную смесь разносили по чашкам Петри со средой LBA содержащей ампициллин (100мкг/мл), Xgal (40мг/мл) и IPTG (100mM). Анализ и отбор на наличие вставки проводили на основе метода бело-голубой селекции.

Полученные амплифицированные и клонированные фрагменты секвенировали с использованием соответствующих праймеров (приложение, табл. ПЗ) с использованием набора Big-dye («Applied Biosystems») на ABI 310 capillary DNA Analyzer (ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ биотехнологии РАН).

Для определения последовательности генов углеводного метаболизма и биосинтеза вторичных метаболитов, секвенирования и экспрессионного анализа использовались разработанные нами праймеры (приложение, табл. ПЗ).

## 2.7. Статистический анализ.

Анализ последовательностей и выравнивание этих последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для поиска радикальных сайтов последовательностей аминокислот использовали PROVEAN (<https://www.jcvi.org/research/provean>). Предсказание третичных структур белков проводили с использованием программы Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Для последовательностей белков определяли консервативные домены и мотивы (NCBI-CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; MEME 5.5.7 (<http://meme-suite.org/tools/meme>), молекулярный вес (Mw) и изоэлектрическую точку (pI) (ExPASy, <https://web.expasy.org/protparam/>).

Данные биохимического анализа и результаты ПЦР-РВ обрабатывались в программе GraphPad Prism v. 9 совместно с использованием Excel. Данные сравнивались на основе однофакторного дисперсионного анализа (множественные сравнения корректировались с помощью теста Бонферрони);  $p < 0,05$  считалось указанием на статистически значимое различие.

Регрессионный анализ (поиск корреляций между уровнем экспрессии гена и содержанием метаболитов) проводили с помощью программы GraphPad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>). Критерии наличия корреляции: значения коэффициента корреляции Пирсона ( $r > 0,5$  и  $p\text{-value} < 0,05$ ).

Филогенетические деревья строили с использованием последовательностей генов, кДНК, аминокислот методами максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) и объединения соседей (Neighborhood-Joining) в программе MEGA 7.0 (Kumar, 2016). Индексы бутстрепа рассчитывали по 1000 репликам. Значения процента бутстрепа (Bootstrap Percentage, далее BP) менее 50 не рассматривались.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

#### 3.1. Анализ транскриптомных изменений в клубнях картофеля при длительном воздействии холодового стресса.

Ранее проводились исследования влияния холодового стресса на экспрессию генов в клубнях картофеля, но при этом в подавляющем большинстве экспериментов длительность воздействия низких температур не превышала 1-3 месяцев. В условиях РФ картофель обычно хранится в картофелехранилищах при температуре +3-5°C до 6-8 месяцев, что определяется временем сбора клубней (сентябрь-октябрь) и посадки в следующем сезоне (апрель-май). Однако исследований молекулярно-генетических изменений, которые происходят в клубнях при таком длительном хранении, практически не проводилось. Поэтому представлялось интересным дать оценку функциональной активности генов в ответ на воздействие на клубни картофеля длительного низкотемпературного стресса, имитирующего хранение в картофелехранилище. Целевыми метаболическими путями стали, прежде всего, углеводный, так как именно он определяет синтез, стабильность и распад крахмала, а также пути биосинтеза вторичных метаболитов - каротиноидов и антоцианов, как одни из основных антиоксидантов, задействованных в стрессовых ответах.

Для определения генов, изменяющих экспрессию при длительном холодовом стрессе, был проведен транскрипционный анализ клубней картофеля. Для исследования был выбран сорт Леди Клэр. В сентябре 2023 года были собраны клубни одного растения одинакового размера (диаметром 55–60 мм) и хранились в климокамере при температуре +3°C в темноте в течение 3,5 (декабрь) и 6,5 (март) месяцев. В конце каждого периода хранения клубни использовались для отбора проб. Взятый образец представлял собой кубический срез (5×5×5 мм) мякоти, включая кожицу, без глазковых почек. Для каждой временной точки использовались два биологических повтора (два клубня с одного растения). Для оценки изменения экспрессии генов при длительном холодовом стрессе были получены библиотеки и проведено секвенирование транскриптомов образцов, отобранных в трех временных точках: до помещения на +3°C (0 мес), через 3,5 месяцев (3,5 мес) и 6,5 месяцев (6,5 мес) хранения при +3°C (рис. 9).

Шесть полученных библиотек были секвенированы на платформе Illumina HiSeq 2500. После удаления адаптеров и последовательностей низкого качества парные перекрывающиеся прочтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) и выровнены с аннотированными генами в геноме картофеля. Анализы обогащения GO и KEGG проводились с помощью ShinyGO 0.82.

Полученные и отфильтрованные прочтения хорошего качества были выровнены с геномом картофеля (первичная биоинформационная обработка проводилась MyGene Co).



Рисунок 9 – Схема получения и анализа транскриптомов клубней сорта Леди Клэр при воздействии длительного холодового стресса.

Секвенирование шести библиотек дало 19 436 490 (0 мес), 21 677 357 (3,5 мес) и 17 269 387 (6,5 мес) чистых прочтений, что составляет приблизительно 4 ГБ данных о последовательностях для каждой временной точки и приблизительно в 4,7 раза больше размера генома картофеля (0,84 ГБ).

Всего было идентифицировано 23 425 (0 мес), 22 601 (3,5 мес) и 22 576 (6,5 мес) генов, что суммарно охватывает 24 957 из 32 873 аннотированных генов картофеля. Распределение экспрессированных генов на трех стадиях хранения было суммировано с помощью диаграммы Венна. 20 962 гена транскрибировались на всех трех стадиях. Примерно 500–600 генов были коэкспрессированы между парами стадий, и наибольшее количество генов (1333 генов) транскрибировалось на стадии до воздействия холодового стресса (0 мес), (рис. 10). Среди них 26,6%, 27,6% и 4,8% всех дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) показали по крайней мере двукратное изменение в точках 3,5 против 0 мес (2394/4242 повышенная/пониженная транскрипция), 6,5 мес против 0 мес (2684/4207) и 6,5 мес против 3,5 мес (722/470) соответственно (рис. 10). Ранее при анализе влияния кратковременного (20 дней) хранения клубней картофеля сорта Atlantic при +4°C было выявлено 3055 ДЭГ, при этом 1685 генов повышали экспрессию, 1370 – понижали (Lin et al., 2019). Сходные результаты по соотношению генов с повышенной/пониженной транскрипцией (1851/1441) были показаны при инкубации клубней сорта Netherlands № 15 при +4°C в течение 15 дней (Cui et al., 2025) .

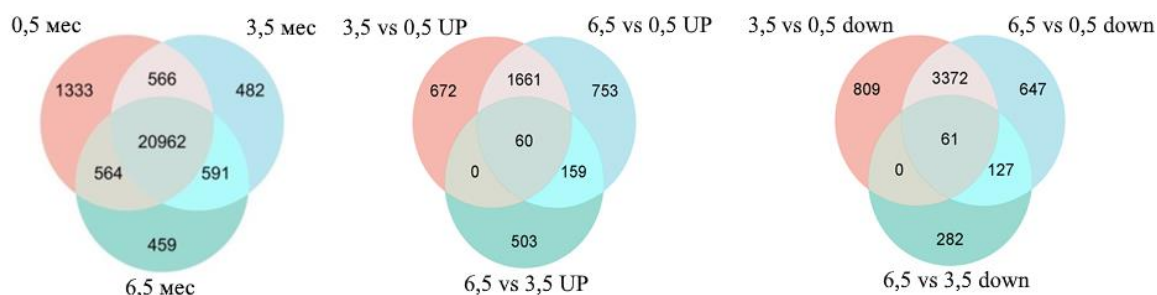


Рисунок 10 – Диаграммы Венна, отражающие количество общих и уникальных дифференциально экспрессируемых генов в клубнях картофеля сорта Леди Клэр в трех анализируемых точках холодового стресса.

Было обнаружено, что в образцах 3,5 мес и 6,5 мес против 0 мес основные изменения в регуляции генов и метаболизма во время холодового хранения выражаются в активации ДЭГ, связанных с транскрипционным аппаратом, трансляцией, посттрансляционными модификациями, метаболическими путями, а также в пониженной регуляции ДЭГ, связанных с фотосинтетическими путями и вторичным метаболизмом (каротиноиды, фенилпропаноиды, порфирины и т. д.) (табл. 1).

Таблица 1 – Сравнительная генная онтология (GO) функционально аннотированных ДЭГ трех кросс-комбинаций.

GO:BP term	Количество генов пути	ДЭГ с повышенной экспрессией			ДЭГ с пониженной экспрессией		
		3,5 vs 0	6,5 vs. 0	6,5 vs. 3,5	3,5 vs. 0	6,5 vs. 0	6,5 vs. 3,5
GO:0006351	transcription DNA-templated (2291)	214	185	0	303	301	91
GO:0045893	positive regulation of transcription DNA-templated (337)	42	35	0	0	0	16
GO:0010467	gene expression (3934)	476	489	138	430	457	156
GO:0010468	regulation of gene expression (2495)	239	212	0	328	336	108
GO:0010629	negative regulation of gene expression (211)	25	22	0	0	28	14
GO:0006412	translation (686)	128	180	61	0	0	0
<b>Cell cycle, differentiation</b>							
GO:0007049	cell cycle (447)	59	51	0	0	0	0
GO:0030154	cell differentiation (206)	22	22	0	26	25	0
<b>Protein metabolism</b>							
GO:0019538	protein metabolic process (4250)	479	553	183	553	560	129
GO:0008104	protein localization (649)	87	107	0	0	0	0
GO:0006605	protein targeting (174)	32	40	0	0	0	0
GO:0006457	protein folding (262)	29	33	26	57	49	11
<b>Carbohydrate metabolism</b>							
GO:1901135	carbohydrate metabolic process (635)	80	86	23	84	80	0
GO:0005975	carbohydrate metabolic process (1002)	79	91	35	12	0	29
<b>Secondary metabolism</b>							
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic process (4939)	542	530	143	545	546	185
GO:0009250	glucan biosynthetic process (95)	11	0	0	17	16	5
GO:0019222	regulation of metabolic process (3029)	312	285	0	385	397	122
GO:0016116	carotenoid metabolic process (30)	0	5	7	9	0	0
GO:0009813	flavonoid biosynthetic process (21)	0	0	0	5	0	0
GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process (281)	0	0	0	41	33	0
<b>Phytohormones metabolism and signaling</b>							
GO:0009755	hormone-mediated signaling pathway (499)	63	57	0	82	89	28

GO:0009725	response to hormone (841)	94	88	33	123	123	35
GO:0009873	ethylene-activated signaling pathway (95)	12	0	0	14	13	6
GO:0009723	response to ethylene (120)	14	0	0	18	17	7
GO:0009736	cytokinin-activated signaling pathway (60)	9	0	0	10	14	0
GO:0009735	response to cytokinin (87)	11	0	8	19	20	8
GO:0009734	auxin-activated signaling pathway (110)	23	23	0	15	19	8
GO:0009733	response to auxin (291)	27	0	0	0	33	10
GO:0009738	ABA-activated signaling pathway (91)	11	11	0	20	19	0
GO:0009737	response to abscisic acid (183)	32	29	18	34	29	0
GO:0009742	brassinosteroid signaling pathway (36)	0	0	0	9	8	0
GO:0009741	response to brassinosteroid (41)	0	0	0	11	10	0
GO:0009696	salicylic acid metabolic process (57)	0	0	0	11	9	0
GO:0009863	salicylic acid signaling pathway (23)	0	0	0	8	8	0
GO:0009751	response to salicylic acid (46)	0	0	0	12	10	0
GO:2000022	regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway (22)	0	0	0	8	9	2
GO:0009753	response to jasmonic acid (89)	0	0	0	14	15	0
<b>Stress response</b>							
GO:0034440	lipid oxidation (59)	12	13	0	0	0	0
GO:0030258	lipid modification (92)	15	17	6	13	0	0
GO:0008610	lipid biosynthetic process (558)	54	61	24	0	0	0
GO:0006629	lipid metabolic process (1253)	103	124	50	166	150	0
GO:0033554	cellular response to stress (664)	108	95	0	78	74	18
GO:0006970	response to osmotic stress (162)	26	27	21	36	28	0
GO:0006950	response to stress (3189)	239	0	0	461	439	0
GO:0009409	response to cold (97)	15	15	12	14	0	0
GO:0009266	response to temperature stimulus (207)	28	25	29	45	36	8
GO:0009414	response to water deprivation (94)	14	12	15	20	17	6
GO:0006979	response to oxidative stress (274)	0	28	23	57	42	0

Обнаруженные изменения в экспрессии были количественно схожи для пар 3,5 мес против 0 мес и 6,5 мес против 0 мес, но в то же время были выше, чем для пар 6,5 мес против 3,5 мес, что может свидетельствовать о том, что наиболее существенные изменения транскрипционной активности происходят в клубнях в период первых 3,5 месяцев холододового хранения.

Было показано, что наиболее распространенные процессы во время холододового хранения клубней (3,5/6,5 мес против 0 мес) были связаны с метаболизмом белков и углеводов. Также, принимая во внимание низкотемпературное хранение клубней, был затронут липидный метаболизм, а также были обогащены категории, связанные с реакцией на стресс, включая «реакцию на холод» и «реакцию на температурный стимул» (табл. 1). Полученные данные по основным категориям генов, которые изменились при длительном низкотемпературном хранении клубней, были сходны с результатами ранее проведенного транскрипционного анализа клубней картофеля при кратковременном (до 1 месяца) холододовом стрессе, где также основной категорией ДЭГ были гены углеводного и белкового метаболизмов (Lin., et al., 2019; Cui et al., 2025).

Так как данная диссертационная работа была сфокусирована на изменении активности генов углеводного, каротиноидного и антоцианового метаболизма в клубнях картофеля при длительном холододовом стрессе, то из полученного списка ДЭГ были

выбраны гены данных метаболических путей, показавших максимальные изменения (повышение и понижение транскрипции) в процессе хранения клубней при +3°C.

*Гены углеводного метаболизма.* Как это следовало из данных проведенного транскрипционного анализа, а также литературных данных, холодостресс затрагивает активность генов углеводного обмена (Dharshini et al., 2016; Yang et al., 2020). Ранее было показано, что изменение экспрессии углеводных генов приводило к холодострессовому осахариванию CIS за счет распада крахмала и накопления редуцирующих сахаров (McKenzie et al., 2005; Chen et al., 2012; Zhang et al., 2017). Также показано, что распад крахмала при холодострессе происходит в результате фосфоролитической и гидролитической реакций и, как считается, требует согласованного действия нескольких ферментов, включая крахмалфосфорилазы, амилазы, инвертазы, гликан-водные дикиназы (Sowokinos, 2001; Chen et al., 2012; Zhang et al., 2014, 2017; Compart et al., 2023). Данные транскрипционного анализа клубней при непродолжительном холодострессе также указывали на участие данной группы генов (Lin., et al., 2019; Cui et al., 2025).

Анализ транскриптомов клубней сорта Леди Клэр в процессе холодострессовой инкубации выявил 270 ДЭГ, связанных с углеводным метаболизмом, при этом для 37 ДЭГ было показано изменение экспрессии более чем в два раза (рис. 11).

Ранее было показано, что CIS характеризуется накоплением растворимых сахаров, которое в основном регулируется совместным действием гранулярно-связанной крахмалсинтазы 1 (GBSS1), бета-амилаз (BAM), ингибиторов инвертазы (INH) и фруктокиназ, направленных на стимуляцию расщепления дисахаридов и полиглюканов (Lin et al., 2019). Через 3,5 месяца холодострессовой инкубации по сравнению с 0 мес наблюдалась повышенная экспрессия *BAM7*, ингибитора фруктозидазы 1 (LOC102586828), фруктокиназы (LOC102577816), а экспрессия *BAM1* и *BAM3* снижалась; экспрессия двух генов *GBSS-like* и двух генов растворимых крахмалсинтаз повышалась, но лишь в 1,3–1,6 раза. Другие ДЭГ, связанные с гидролизом дисахаридов, были либо подавлены (сахарозофосфатсинтаза SPS4, щелочная/нейтральная инвертаза A, бета-фруктозидаза PAIN-1, инвертаза клеточной стенки CWINV1, бета-галактозидазы 3 и 4, альфа-галактозидаза), либо характеризовались повышением экспрессии (сахарозосинтаза SS16, щелочная/нейтральная инвертаза D, бета-галактозидаза 16, альфа-галактозидаза 3).

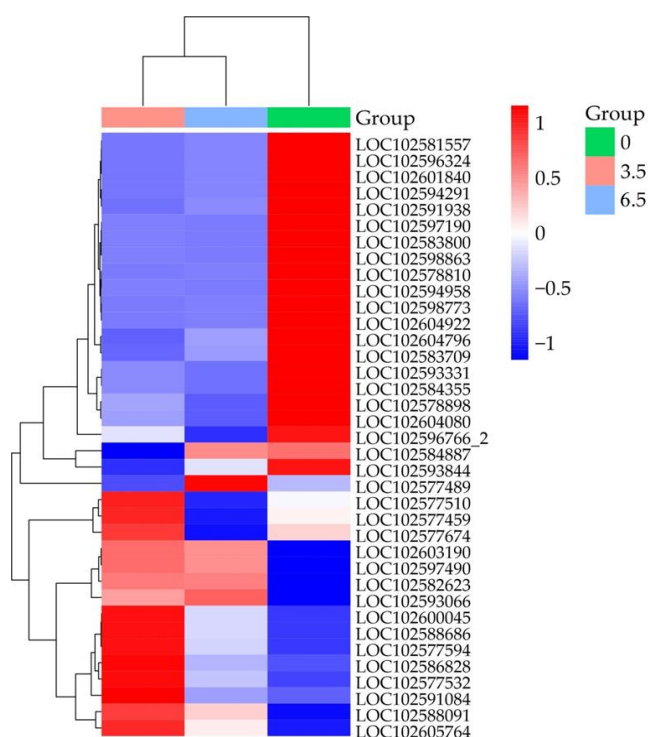


Рисунок 11 – Тепловая карта, отражающая изменения уровней экспрессии генов углеводного обмена в клубнях картофеля при длительном холодовом стрессе.

Ещё несколько ДЭГ, связанных с расщеплением полиглюканов (включая крахмал), были подавлены (девять глюкан-эндо-1,3-β-D-глюкозидаз, α-глюкозидазы 11 и 40, α-амилазы, α-1,4-глюканфосфорилаза L-1) или повышены (β-глюкозидазы 18, 42 и 46, фосфоглюканфосфатаза DSP4, изофермент α-глюканфосфорилазы типа Н). Через 6,5 месяцев по сравнению с 3,5 месяцами стресса экспрессия некоторых ДЭГ была значительно повышена (*BAM1*, *PAIN-1*, β-галактозидаза 8, β-глюкозидаза 11) или снижена (крахмалсинтаза LOC102577674, фруктокиназа, ингибитор фруктозидазы 1, α-глюканфосфорилаза типа Н, α-1,4-глюканфосфорилаза L-1, сахарозосинтаза).

Помимо достаточно ожидаемых изменений в экспрессии генов α- и β-амилаз, инвертаз, крахмал- и сахарозосинтаз и других известных генов углеводного обмена, для ряда генов/семейств генов *S. tuberosum*, таких как гены транслокаторов семейства SWEET (*StSWEET10*, 12, 15), глюкан эндо-1,3-β-глюкозидазы 8, 13, α- галактозидаза 3 (*AGAL3*), галактуринозил трансфераза 8 (*GAUT8*), фруктозо-1,6-бифосфатаза (*FBPase*), фосфоглюканфосфатаза (*DSP4*) было впервые показано участие в ответе на холодовый стресс в клубнях (рис. 12).

Следует отметить, что для некоторых этих генов, например, для генов *SWEET10*, 12, 15 вообще была неизвестна их функция у растений, а транскриптомный анализ не только показал их вовлеченность в холодовый ответ, но и то, что гены *SWEET12* и *SWEET15* картофеля индуцируются холодовым стрессом.



Для некоторых из этих генов данные транскриптомного анализа были подтверждены ПЦР-РВ (рис. 12).

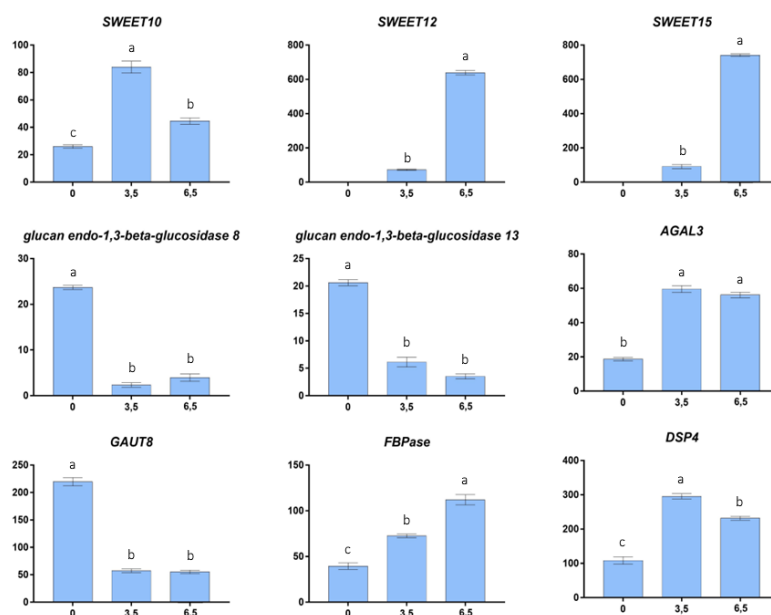


Рисунок 12 – Изменение экспрессии генов углеводного обмена в клубнях в ответ на длительный холодовый стресс (3°C). С – сентябрь (20°C), Ф – январь, 3,5 месяцев стресса, А – март, 6,5 месяцев стресса (в качестве референсов использовались гены *Stsec3* и *Stef1*). Значимые различия экспрессии между органами растения при  $p < 0,05$ .

*Гены метаболизма каротиноидов.* Известно, что каротиноиды, как одни из основных антиоксидантов растений, участвуют в защите от стрессовых воздействий, в том числе и при холодовом стрессе. Однако большинство исследований проводилось на листьях и плодах. Анализ транскриптомов в трех временных точках выявил 14 ДЭГ, связанных с синтезом каротиноидов в динамике холодового хранения. Для большинства генов было показано значительное уменьшение транскрипционной активности уже через 3,5 месяцев хранения (рис. 13).

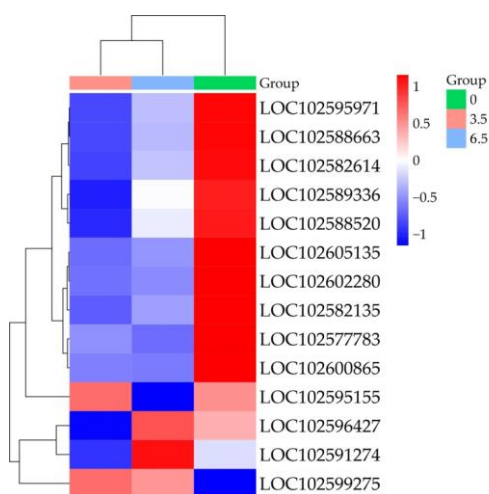


Рисунок 13 – Тепловая карта, отражающая изменения уровней экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в клубнях сорта Леди Клэр при длительном холодовом стрессе.

Для ряда генов наблюдалось повышение транскрипции через 6,5 месяцев стресса, как, например, у гена LCYB (LOC102595971) с высокой экспрессией в сентябре, понижением транскрипции в 7,9 раз через 3,5 месяцев стресса и повышением в 2,8 раз в конце срока инкубации (рис. 13).

*Гены метаболизма флавоноидов.* Флавоноиды, включая антоцианы, так же как и каротиноиды, являются вторичными метаболитами, участвующие в антистрессорной защите растительных клеток. Анализ транскриптомов выявил 29 ДЭГ, связанных с синтезом флавоноидов (рис. 14).

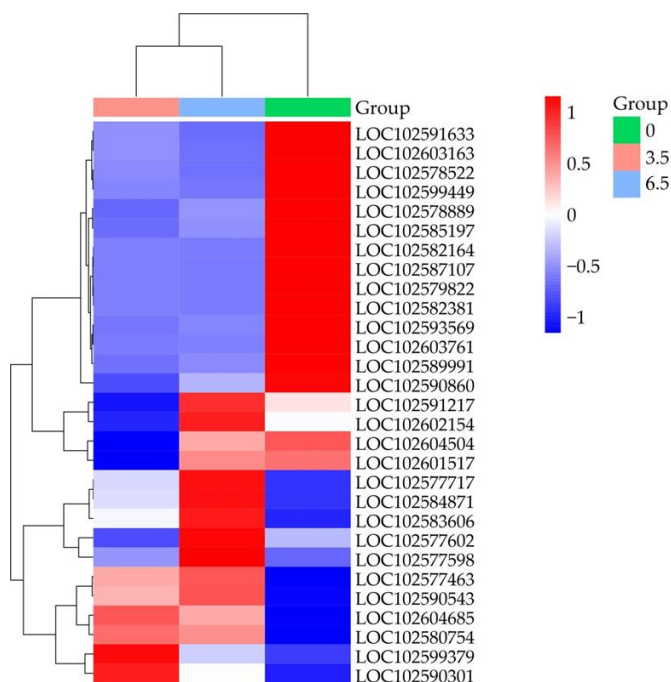


Рисунок 14 – Тепловая карта, отражающая изменения уровней экспрессии генов биосинтеза флавоноидов в клубнях картофеля при длительном холодовом стрессе.

По профилю изменений экспрессии эти гены можно выделить в две группы: одна (в основном это гены начала флавоноидного пути) включает 14 генов, для которых характерно резкое уменьшение уровней транскрипции уже через 3,5 месяца холодового стресса, которое сохраняется до 6,5 месяцев, другая включает 11 генов, в том числе гены биосинтеза антоцианов, для которых показано увеличение экспрессии через 3,5 мес и/или 6,5 мес стресса (рис. 14).

Таким образом, транскрипционный анализ позволил определить основные группы генов, которые изменяют экспрессию в клубнях картофеля в ответ на длительное холодовое воздействие. Это в свою очередь позволило определить набор целевых генов биосинтеза углеводов и вторичных метаболитов для дальнейшего более детального исследования на сортах картофеля, различающихся по морфо-физиологическим признакам.

### 3.2. Изменение содержания углеводов (крахмала, редуцирующих сахаров) и динамики экспрессии генов углеводного обмена в клубнях сортов картофеля при длительном холододовом хранении.

Проведенный транскрипционный анализ позволил определить и ранжировать гены, дифференциально экспрессирующихся в клубнях картофеля сорта Леди Клер в процессе длительного хранения клубней при  $+3^{\circ}\text{C}$ . Однако представлялось важным определить, насколько выявленные закономерности являются общими для различных сортов картофеля. Для этого аналогичный эксперимент с длительным холододовым воздействием, имитирующим условия хранения в картофелехранилище при  $+3^{\circ}\text{C}$ , был проведен с использованием клубней пяти сортов картофеля Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние, Надежда, различающихся по срокам спелости/холодоустойчивости, содержанию крахмала в клубнях, содержанию каротиноидов и антоцианов (рис. 15).

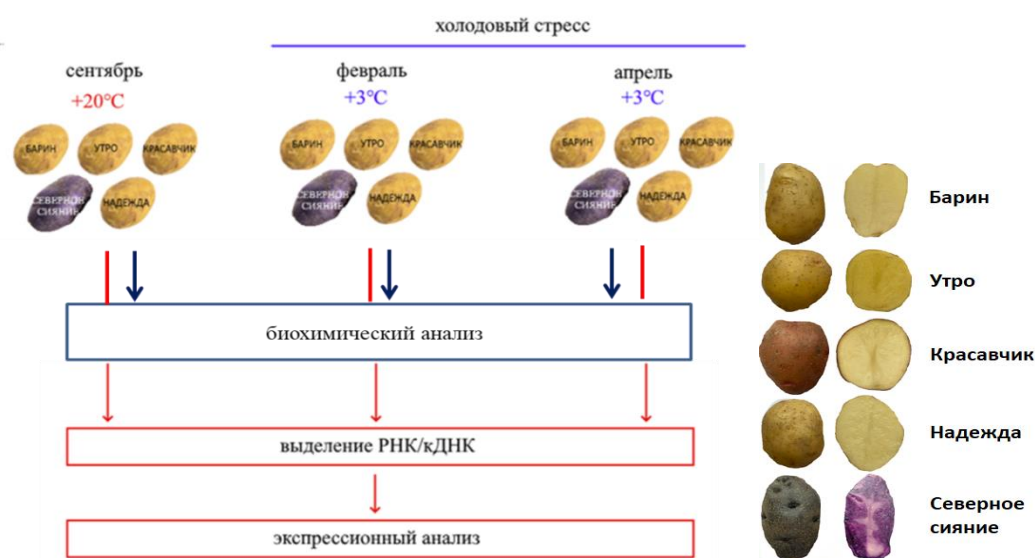


Рисунок 15 – Клубни картофеля анализируемых сортов и схема проведения эксперимента.

Для определения динамики изменения крахмала и редуцирующих сахаров при длительном холододовом стрессе проведен биохимический анализ клубней пяти сортов *S. tuberosum*. Пробы для анализа отбирали до закладки на  $+3^{\circ}\text{C}$  в сентябре (0 мес) и после закладки на холододовое хранение феврале (4 мес) и апреле (7 мес). Количественное определение крахмала в клубнях проводили с помощью набора Enzytec™ Liquid Starch, редуцирующих сахаров с помощью набора Enzytec™ Liquid D-Glucose/Dfructose. Как и ожидалось, в процессе холододового хранения в клубнях всех пяти анализируемых сортов происходит уменьшение содержания крахмала и наблюдается значительное увеличение количества глюкозы и фруктозы в феврале и апреле по отношению к сентябрю. В сравнении с февралем, в апреле в клубнях сортов Утро и Надежда продолжается рост

содержания редуцирующих сахаров, в то время как у сортов Барин и Северное сияние достаточно резко падает (рис. 16). При этом в феврале (4 месяца стресса) клубни сорта Барин отличаются самым высоким содержанием фруктозы и глюкозы – в 1,5-3 и 1,5-4 раза выше, чем у остальных сортов. Самые низкие показатели – в клубнях сорта Надежда. В апреле (7 месяцев стресса) существенных межсортных различий отмечено не было, за исключением пониженного (в сравнении с другими сортами) содержания глюкозы в клубнях сорта Северное сияние.

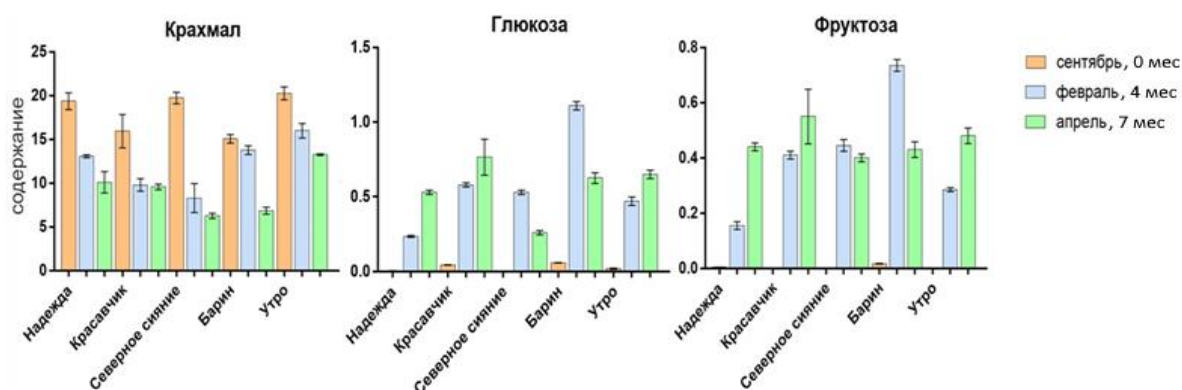


Рисунок 16 – Содержание крахмала и редуцирующих сахаров (мг/г свежей ткани) в клубнях картофеля пяти сортов в динамике длительного холодного хранения.

Эти результаты подтвердили ранее полученные данные о том, что в целом в клубнях картофеля к концу выхода из периода покоя происходит распад части крахмала с образованием глюкозы, необходимой для стимулирования роста побегов (Benkeblia et al., 2008). При этом при воздействии пониженных температур происходит более активный распад крахмала, что сопровождается значительным увеличением содержания редуцирующих сахаров.

Таким образом, при низкотемпературном хранении с сентября по апрель содержание крахмала снижается в разной степени в клубнях всех сортов. Для сортов Красавчик, Барин и Северное сияние характерно повышение содержания редуцирующих сахаров с сентября по февраль, тогда как в апреле их содержание не меняется в сравнении с февралем (Красавчик) или значительно снижается (Барин, Северное сияние).

### 3.3. Определение паттернов экспрессии генов углеводного обмена в клубнях пяти сортов картофеля при длительном холодном хранении.

Выбор генов для анализа был сфокусирован на генах углеводного обмена и основывался как на данных проведенного транскриптомного анализа, так и на литературных данных. Было выбрано девять генов – *StGBSS*, *StSUS4*, *StAGPaseS*, *PAIN-1(StVinv)*, *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*, для которых ранее была показана связь с холодным стрессом и/или устойчивостью к CIS.

Для транскрипционного анализа из клубней картофеля выбранных сортов в каждой из анализируемых точек (сентябрь - до холодного стресса, февраль и апрель при +3°C) была выделена РНК, и синтезированная кДНК была использована для анализа транскрипции и использована для проведения РВ-ПЦР с разработанными праймерами для каждого из генов (приложение, табл. ПЗ).

Анализ транскрипции генов у пяти сортов картофеля показал сходство паттернов экспрессии для генов сахарозосинтазы *StSUS4*, гликан-водной дикиназы *StGWD* амилаз *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI*. У всех сортов наблюдались значительные изменения уровней экспрессии (повышения в случае *StSUS4*, *StGWD*, *StAmy23*, понижение в случае *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*) в клубнях после 7 месяцев холодного стресса, в сравнении с сентябрьским до закладки на +3°C (рис. 17). И паттерны экспрессии совпадали с данными анализа транскриптома сорта Леди Клар.

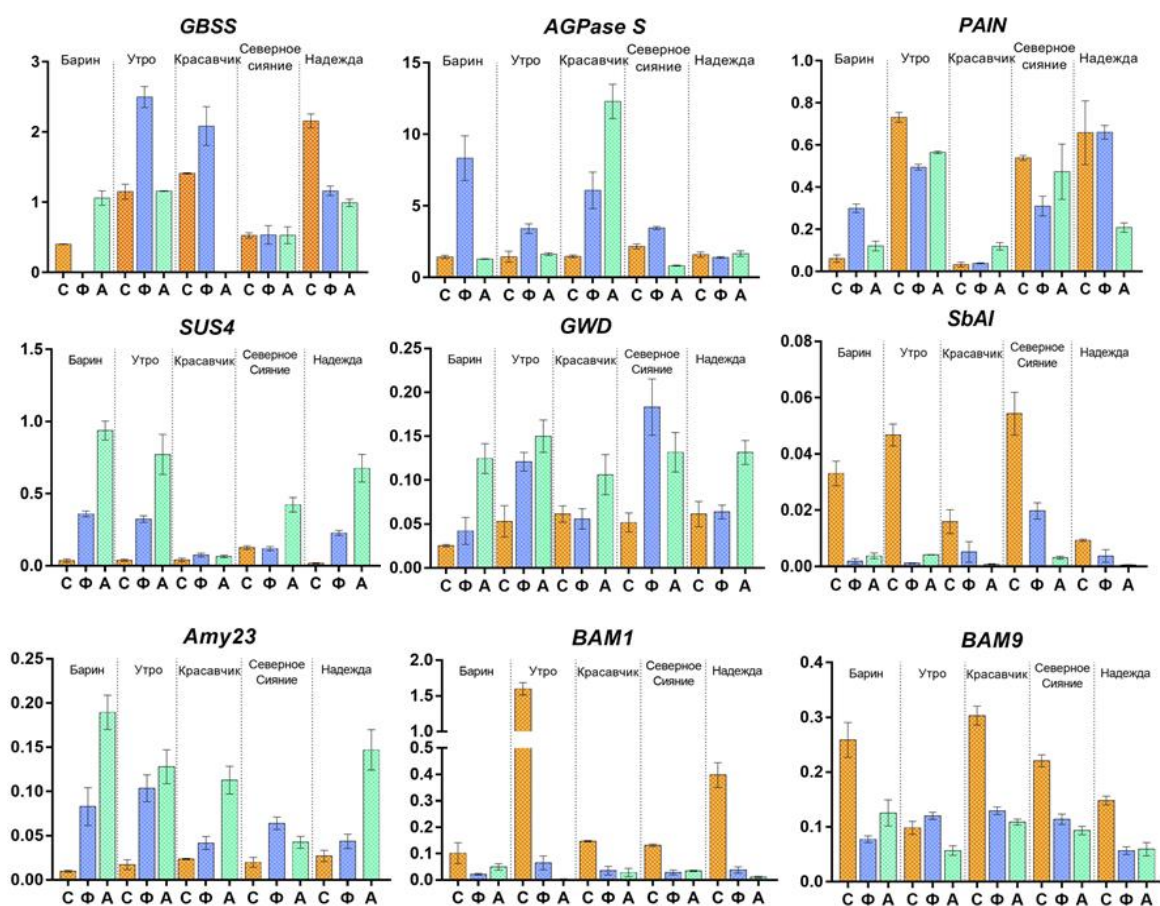


Рисунок 17 – Изменение экспрессии генов углеводного обмена пяти сортов картофеля в ответ на длительный холодовый стресс (+3°C). С – сентябрь (+20°C), Ф – февраль, 4 месяца стресса, А – апрель, 7 месяцев стресса (в качестве референсов использовались гены *Stsec3* и *Stef1*).

В случае генов *StGBSS*, *StAGPaseS*, *PAIN-1* наблюдались сортоспецифичные паттерны, причем для некоторых сортов они были противоположны (например, сорта

Барин и Надежда гены *StGBSS* и *PAIN-1*) (рис. 17). Такая же специфичность ответа гена *PAIN-1* на стрессовое воздействие была показана ранее и для других сортов картофеля при 15- и 90-дневной инкубации при +3°C (Егорова и др., 2023). Также различия в паттернах экспрессии в условиях холодового стресса в клубнях различных сортов картофеля были выявлены при анализе ряда других генов углеводного обмена (Oufir et al., 2008). Из этого следует, что различия паттерна экспрессии данных генов в клубнях различных сортов картофеля могут свидетельствовать о генотип-зависимой регуляции ответа на длительный холодовый стресс.

Ранее было показано, что *StBAM1* и *StBAM9* вносят разный вклад в холодовое осахаривание клубней. *StBAM1* локализуется в стромах амилопласта и гидролизует растворимый крахмал, а *StBAM9*, не обладая ферментативной активностью, связывается как с поверхностью крахмальной гранулы, так и с *StBAM1* и образует белковый комплекс (Zhang et al., 2014b; Hou et al., 2017). Также было показано увеличение транскрипции обоих генов после одного месяца инкубации клубней при +4°C (Zhang et al., 2014a; Hou et al., 2017). Однако в процессе длительной холодовой инкубации для обоих генов  $\beta$ -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* показано падение транскрипционной активности в клубнях (рис. 17). Так, транскрипция *StBAM1* значительно падает к концу холодовой инкубации в апреле по сравнению со временем закладки на +3°C в сентябре, что наиболее сильно выражено у сортов Утро и Надежда. При этом изменения между 4 и 7 месяцами не значительны: уровень экспрессии гена либо остается неизменным, либо несколько снижается (рис. 17). Уровень экспрессии *StBAM9* также значительно падает к 4 месяцам холодового стресса, но не так значительно, как в случае *StBAM1*. В апреле по сравнению с февралем экспрессия *StBAM9* немного вырастает (сорт Барин), падает (сорт Утро), либо почти не меняется (сорта Красавчик, Северное сияние, Надежда) (рис. 17).

Несовпадение полученных результатов по экспрессии анализируемых генов  $\beta$ -амилаз в процессе 4 и 7 месячного холодового хранения клубней с ранее полученными данными при воздействии на клубни пониженных температур в течение одного месяца можно объяснить тем, что, вероятно, в случае хранения клубней, находящихся в состоянии физиологического покоя, 30 дней можно рассматривать как кратковременное воздействие низких температур, в процессе которого клубни накапливают достаточное для устойчивости к холоду количество редуцирующих сахаров, после чего устанавливается равновесие между содержанием крахмала/сахаров и активностью деградирующих крахмал ферментов. Также необходимо учитывать активное участие в деградации запасаемого крахмала  $\alpha$ -амилаз (гидролиз) (Zhang et al., 2014a) и пластидной крахмал фосфорилазы (фосфоролиз) (Slugina et al., 2020).



Особый интерес представлял также ген *PAIN-1*, так как для кодируемого им белка вакуолярной кислой инвертазы VINV ранее предполагалась тесная связь между активностью и накоплением восстанавливающих сахаров во время холодового хранения (Zrenner et al., 1996; Matsuura-Endo et al., 2004). Кроме того, исходно нами также предполагалось, что экспрессия гена будет увеличиваться по мере холодовой инкубации клубней анализируемых сортов, так как считалось, что именно VINV может быть ключевым ферментом, контролирующим распад сахарозы при гидролизе крахмала во время CIS. В случае сорта Леди Клэр транскриптомные данные этому соответствовали, и было детектировано значительное повышение экспрессии *PAIN-1* по мере увеличения времени холодового стресса. Однако анализ клубней других пяти сортов показал различные паттерны (рис. 17). При этом для сорта Красавчик при крайне низком общем уровне транскрипции во всех трех временных точках наблюдается увеличение экспрессии, как в транскриптоме у сорта Леди Клэр; у сорта Барин при достаточно резком усилении транскрипции в феврале (через 4 месяца стресса) наблюдается падение к концу холодового хранения, но все равно уровень транскрипции в апреле (7 мес) выше, чем в сентябре (0 мес). У остальных трех сортов в целом наблюдается падение уровней транскрипции к концу холодового воздействия в сравнении с дострессовым уровнем (рис. 17). Эти данные, помимо зависимой от генотипа экспрессии гена *PAIN-1*, могут поддерживать предположение о том, что ключевыми игроками в распаде крахмала могут быть иные ферменты, такие как сахарозосинтаза SUS4, цитозольная нейтральная или апопластная кислая инвертазы (Nguyen-Quo et al., 2001; Koch, 2004; Егорова и др., 2023).

Представлялось интересным определить наличие возможных корреляций между уровнями экспрессии анализируемых генов и количеством крахмала и моносахаров в клубнях в процессе длительного холодового стресса. Регрессионный анализ (поиск корреляции между уровнем экспрессии гена и содержанием углеводов) проводили в программе GraphPad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>). Критерии наличия корреляции определяли по значению коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ )>0,5 и  $p$ -value<0,05 (табл. 2). Проведенный анализ показал наличие достоверных корреляций для четырех генов *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI* (табл. 2). Для генов *StAmy23* и *StAI* была показана корреляция для всех углеводов. При этом достаточно логично для гена  $\alpha$ -амилазы *StAmy23* наблюдалась отрицательная корреляция ( $p=0,0016$ ,  $r=-0,55$ ) с содержанием крахмала, а для глюкозы и фруктозы – положительная ( $p<0,0001$ ,  $r=0,677$ ). При этом для гена ингибитора амилаз *StAI* наблюдалась обратная картина: отрицательная корреляция ( $p=0,0001$ ,  $r=-0,64$ ) с содержанием глюкозы и фруктозы, положительная ( $p=0,0003$ ,  $r=0,62$ ) с содержанием крахмала.

Таблица 2 – Корреляционный анализ зависимости содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровней экспрессии генов углеводного обмена в клубнях сортов картофеля при длительном холодовом стрессе.

		<i>GBSS</i>	<i>AGPaseS</i>	<i>PAIN</i>	<i>SUS4</i>	<i>GWD</i>	<i>StAI</i>	<i>AMY23</i>	<i>BAM1</i>	<i>BAM9</i>
крахмал	R <sup>2</sup>	0,089	0,044	0,243	0,238	0,377	0,38	0,303	0,307	0,118
	<i>r</i>	0,3	-0,21	0,49	-0,48	<b>-0,61</b>	<b>0,62</b>	<b>-0,55</b>	<b>0,55</b>	0,34
	p-value	0,11	0,265	<b>0,005</b>	<b>0,006</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0015</b>	0,06
		<i>GBSS</i>	<i>AGPaseS</i>	<i>PAIN</i>	<i>SUS4</i>	<i>GWD</i>	<i>StAI</i>	<i>AMY23</i>	<i>BAM1</i>	<i>BAM9</i>
глюкоза	R <sup>2</sup>	0,082	0,43	0,11	0,224	0,128	0,408	0,475	0,192	0,29
	<i>r</i>	-0,29	<b>0,66</b>	-0,33	0,47	0,36	<b>-0,64</b>	<b>0,69</b>	-0,44	<b>-0,54</b>
	p-value	0,124	<b>&lt;0,0001</b>	0,075	<b>0,008</b>	<b>0,05</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,015</b>	<b>0,0021</b>
		<i>GBSS</i>	<i>AGPaseS</i>	<i>PAIN</i>	<i>SUS4</i>	<i>GWD</i>	<i>StAI</i>	<i>AMY23</i>	<i>BAM1</i>	<i>BAM9</i>
фруктоза	R <sup>2</sup>	0,123	0,345	0,088	0,268	0,251	0,446	0,46	0,22	0,362
	<i>r</i>	-0,35	<b>0,59</b>	-0,296	<b>0,52</b>	0,5	<b>-0,67</b>	<b>0,68</b>	-0,47	<b>-0,60</b>
	p-value	0,057	<b>0,0006</b>	0,112	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,0004</b>

Для гена гликан-водной дикиназы *StGWD*, так же как и  $\alpha$ -амилазы, вовлеченного в деградацию крахмальных гранул, выявлена сильная отрицательная корреляция содержанием крахмала ( $p=0,0003$ ,  $r=-0,61$ ) и положительная – с содержанием фруктозы ( $p=0,005$ ,  $r=0,5$ ). Интересна также выявленная корреляция генов  $\beta$ -амилаз: экспрессия *StBAM9* отрицательно коррелировала с содержанием моносахаров (глюкоза –  $p=0,0021$ ,  $r=-0,54$ ; фруктоза –  $p=0,0004$ ,  $r=-0,602$ ). Для *StBAM1* выявлена положительная корреляция с содержанием крахмала ( $p=0,0015$ ,  $r=0,554$ ).

Таким образом, в условиях длительной (4 и 7 месяцев) холодовой инкубации (+3°C) в клубнях пяти сортов картофеля, различающихся содержанием крахмала, были определены паттерны экспрессии девяти генов углеводного обмена – *StGBSS*, *StSUS4*, *StAGPase*, *PAIN-1(StVinv)*, *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*, связанные с метаболизмом крахмала, для которых ранее была показана связь с холодовым стрессом и/или устойчивостью к CIS. Для пяти генов *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI* показана корреляция (положительная и отрицательная) с изменением содержания крахмала и моносахаров при длительном холодовом стрессе.

Данные транскрипционного анализа и данные анализа экспрессии генов у пяти сортов картофеля позволили определить набор генов для дальнейшего более детального анализа. Выбор генов основывался на их выявленной активной роли при длительном холодовом стрессе в клубнях картофеля, но при этом достаточно малоизученной. Основываясь на данных транскриптомного анализа, для более детального структурно-функционального анализа, решено было сфокусироваться на генах ингибитора амилаз *StAI*,  $\alpha$ -амилазы *StAmy23* как значимых, но малоисследованных генах углеводного метаболизма,



а также основных генах биосинтеза каротиноидов и антоцианов, так как и многочисленные литературные данные и данные анализа транскриптома сорта Леди Клэр показывают вовлеченность этих вторичных метаболитов в формирование холодоустойчивости растений, но при этом они практически не изучены у *S. tuberosum*.

### **3.4. Структурно-функциональная характеристика гена ингибитора амилаз клубнеобразующих видов картофеля.**

Известно, что активность амилаз может контролироваться специфическими белками ингибиторами амилаз AI (amylase inhibitor). Ранее была описана только кДНК гена ингибитора амилазы у клубнеобразующего вида *S. berthaultii* *SbAI* и исследована его роль в отношении амилазы в клубнях картофеля (Zhang et al., 2014b). Было показано, что при хранении при +3°C в течение 30 дней в клубнях картофеля детектировалось увеличение уровней мРНК гена *SbAI*. Также между количеством транскриптов *SbAI* и содержанием глюкозы и фруктозы выявлена отрицательная корреляция (Zhang et al., 2014b; Слугина и др., 2020). Кроме того, основанное на посттрансляционном взаимодействии ингибирующее действие *SbAI* было показано не только для  $\alpha$ -амилазы *StAmy23*, но и для  $\beta$ -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* (Zhang et al., 2014b). Это свидетельствует о важности *SbAI* в регуляции деградации крахмала в клубнях при холодовом стрессе.

Однако, несмотря на показанную значимость ингибитора амилаз AI в регуляции углеводного обмена, никаких исследований ортологов данного гена у других видов растений, включая виды картофеля или сорта *S. tuberosum*, практически не проводилось, так же как не проводилось детального исследования изменения профиля экспрессии AI в различных органах в случае кратковременного и длительного холодового стресса.

#### **3.4.1. Идентификация и характеристика полногеномных последовательностей генов гомологов AI и их белковых последовательностей у дикорастущих видов картофеля.**

Для анализа генов-гомологов AI были взяты образцы 12 видов картофеля, относящихся к различным сериям секции *Petota* (Hawkes, 1990; Hardigan et al., 2015) (приложение, табл. П2). Большинство образцов были представителями суперсерии *Rotata* видами серии *Tuberosa* (*S. berthaultii*, *S. gourlay*, *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. verrucosum*, *S. vernei*, *S. kurtzianum*, *S. sucrense*), а также серий *Longipedicullata* (*S. stoloniferum*), *Glabrescentia* (*S. chacoense*), *Demissa* (*S. demissum*), *Acaulia* (*S. acaule*). Кроме того, в анализ был взят образец вида *S. jamesii*, относящийся к серии *Pinnatisecta* суперсерии *Stellata*. Также отобранные виды отличались плоидностью генома, значениями балансового числа эндосперма EBN и устойчивостью к холодовому стрессу

(<https://potato.cgn.wur.nl/species.htm>) (Rodríguez et al., 2010; Gavrilenko, 2011; Cai et al., 2012; Machida-Hirano, 2015; Гавриленко, 2017; Huang et al., 2019).

Помимо вышеперечисленных видов из базы NCBI были экспортированы последовательности неклубнеобразующего вида *S. etuberosum* (GCA\_029582245.1) (секции *Petota*, подсекции *Estolonifera*) и представителей эволюционно менее отдаленных видов суперсерии *Stellata* – *S. bulbocastanum* (GCA\_037074985.1), *S. commersonii* (GCA\_029582505.1), *S. pinnatisectum* (GCA\_035578085.1), а также *S. megistacrolobum* суперсерия *Rotata*, серия *Megistacroloba* (GCA\_029582645.1). Для сравнения в анализ были также включены последовательности генов томата *S. pennelii* (Gene ID: 107012074) и *S. lycopersicum* (Gene ID: 101255064).

С использованием разработанных нами праймеров (приложение, табл. П3) были амплифицированы последовательности гомологов *AI* образцов двенадцати видов картофеля. Полученные фрагменты длиной 1700-1900 н.п. были клонированы в вектор pGEM и секвенированы (3-5 клон для каждого образца) с использованием тех же праймеров. В результате чего впервые были получены последовательности *AI* генов 12 видов картофеля, которые были депонированы в генбанк NCBI (MT074624-MT074659) (приложение, табл. П3).

Последовательности *AI*-гомологичных генов у определенных в данной работе образцов 12 видов картофеля и также последовательности видов, экспортированных из базы NCBI, различались по длине: 1763 п. н. у *S. tuberosum* ssp. *andigena* - 2040 п.н. у *S. bulbocastanum*. При этом все гомологи *AI* имели одинаковое экзон-интронное строение и содержали четыре экзона. Размеры экзонов отличались незначительно. Наименьшая суммарная длина экзонов (609 п.н.) была показана для вида *S. demissum*, наибольшая - для *S. stoloniferum* (642 п.н.). Полиморфизм длин интронных последовательностей был более значительным: от 1134 п.н. у *S. etuberosum* до 1422 п.н. у *S. bulbocastanum*.

Анализ вариабельности исследованных *AI* генов видов картофеля показал, что в сравнении с *StAI S. tuberosum* cv. DM1-3 516 (ID:102591697), который выступал в качестве референса, в полногеномных последовательностях было выявлено 449 SNPs, что составило 20,5%, а в экзонных последовательностях - 106 SNPs (16,2%). Среди кодирующих последовательностей наиболее вариабельным был экзон I (49 SNPs), среди не кодирующих – интрон I (157 SNPs). Наиболее интересным и достаточно неожиданным нам показался выявленный высокий уровень аллельного полиморфизма, и не только у полиплоидных видов, но и у диплоидных, например у *S. berthaultii* ВИР 24267, где выявлено четыре аллеля, два из которых включали не только замены, но и

тринуклеотидную делецию (рис. 18), в то время как у гексаплоидного *S. demissum* 15176 было выявлено только два SNPs.

Неожиданно у видов картофеля в экзоне III были выявлены инсерционные мутации. Так, было показано, что последовательность этого экзона у образца *S. stoloniferum* имеет протяженную 24-нуклеотидную вставку CCAGTGCTTCACCAACATCAGCCT, в то время как у других видов в том же сайте экзона наблюдались делеции от 3 до 12 нуклеотидов, не сбивающих рамку считывания (рис. 18). В конце экзона IV у некоторых диких видов картофеля (*S. demissum* (15176/34), *S. suurense* (ВИР 23598), *S. vernei* (ВИР 20332), *S. chacoense* (3678), *S. commersonii*) была выявлена 9-нуклеотидная делеция GGTGCAATT, однако ее не наблюдается у остальных анализируемых видов картофеля и у томата (рис. 18). При этом следует отметить, что все выявленные индели не сбивали рамку считывания.

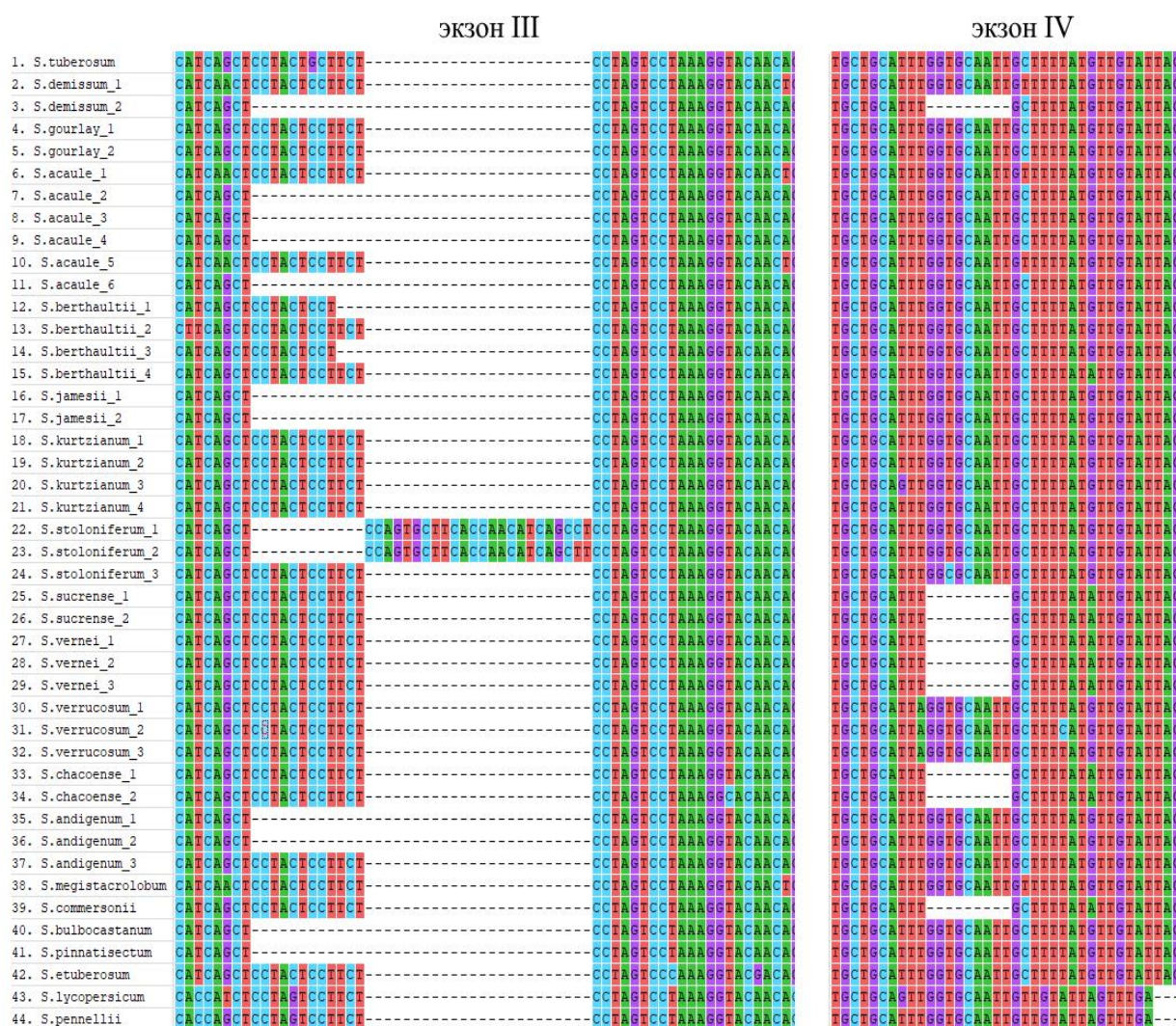


Рисунок 18 – Фрагменты нуклеотидных последовательностей экзонов III и IV гена *Al* у видов *Solanum*.

Кодирующие последовательности *AI*-генов были транслированы, а также охарактеризованы их функциональные домены и третичные структуры белка. Аминокислотные последовательности отличались по длине (от 202 а.о. у *S. demissum* до

213 а.о. у *S. stoloniferum*) (приложение, табл. П4). Всего было выявлено 36 вариантов белковых последовательностей. Из-за аллельных вариантов нуклеотидных последовательностей у одного образца выявлялись несколько возможных вариантов кодируемых белковых последовательностей. В целом у AI последовательностей двенадцати видов картофеля при выровненной длине 213 а.о. было выявлено замещение 41 а.о. (19,3 %), из которых, согласно программе PROVEAN, семь были радикальными и потенциально могли изменить функциональность белка. Также были детектированы три делеции (S137del, P134\_S137del и G202\_I204del) и вставка одной аминокислоты (P138\_S139ins) (приложение, табл. П4). Радикальные аминокислотные замещения, а также инсерция и две делеции (S137del, T135\_P138del) были выявлены в последовательностях функциональных доменов. Наибольшее количество аминокислотных замещений, включая радикальные, были выявлены в последовательностях образцов *S. vernei*, *S. acaule*, *S. sucrense* и *S. chacoense*. Единичные радикальные замещения обнаружены в аллельных вариантах образцов *S. berthaultii* и *S. demissum*. При этом достаточно неожиданным оказался тот факт, что, несмотря на то, что AI-гомологи видов томата *S. pennellii* и *S. lycopersicum* имели в 2-10 раз больше аминокислотных замещений, чем *S. tuberosum*, все они носили нейтральный характер (приложение, табл. П4).

Проведенное выравнивание аминокислотных последовательностей и сравнение с охарактеризованной ранее последовательностью SbAI и другими представителями семейства ингибиторов амилаз AAI\_LTSS (Zhang et al., 2014b) показало наличие у них двух консервативных доменов: LTP\_2 (в положении 16–102 а.о.) и super family PRK14971 (в положении 77–196 а.о.), характерных для представителей AAI\_LTSS-типа ингибиторов  $\alpha$ -амилаз. Также полученные последовательности белков AI были высоко богаты остатками пролина, которые составляли 13–14% от всех аминокислот, что свидетельствует о принадлежности выявленных гомологов к AGP-семейству пролин-обогащенных белков. Ранее было установлено, что наличие пролин-богатых мотивов в белках указывает на их склонность к взаимодействию с другими белками (Williamson, 1994). Также было показано, что домен LTP\_2 анализируемых видов картофеля включал характерные для AAI\_LTSS-семейства консенсусные остатки цистеина Cys, формирующих дисульфидные мостики (позиции 30, 41, 58, 59, 72, 74, 99 и 108). Кроме того все AI белки видов картофеля содержали так называемый домен LTP\_2 ‘Группа\_alpha\_amyl’, расположенный в районе 30-108 а.о., который характерен для всех представителей ингибиторов амилаз растений (Marchler-Bauer et al., 2011, Zhang et al., 2014a).



У идентифицированных гомологов AI образцов видов картофеля и томата были определены консервативные мотивы (рис. 19B). Так, у анализируемых видов секции *Rotata*, так и у секции *Stellata* в белковых последовательностях AI детектировано шесть одинаковых консервативных мотивов с одинаковым расположением (рис. 19B). Также эти же мотивы выявлены у двух видов томата. Основные различия касались мотива 7, который располагается между мотивами 4 и 3 (рис. 19B). У более эволюционно древних видов *Stellata* он отсутствует, в то время как у *Rotata* присутствует у большинства видов картофеля, как и у видов томата. У анализируемых последовательностей *S. berthaultii* имеется два аллельных варианта, при этом у одного аллельного варианта присутствует последовательность мотива 7 (A<sub>133</sub>PTPSPSP<sub>140</sub>), как у большинства видов, а во втором случае последовательность изменяется на другую – VAPPP. Интересно, что этот же мотив, появившийся у одного из аллельных вариантов *S. berthaultii*, присутствует также и в последовательности белка AI вида *S. gourlayi*, но в составе третьего мотива (рис. 19B).

Состав и расположение мотивов у видов клубнеобразующего картофеля было таким же, как у неклубнеобразующего вида *S. etuberosum* и видов томата, что может говорить о значимости данного белка для метаболизма углеводов растений. Таким образом, у клубнеобразующих и неклубнеобразующих видов картофеля домены и мотивы, входящие в состав гомологов AI, сохраняются, что указывает на то, что в диких видах AI представляет собой функционально правильный белок и его активность связана с регуляцией экспрессии гена, а не с его последовательностью и, вероятно, присутствие или отсутствие мотива 7 значительно не влияет на функциональность белка.

Так как ранее для ингибиторов амилаз не были известны возможные третичные структуры, то впервые было проведено моделирование 3D структур AI анализируемых гомологов видов картофеля. Был использован пакет программ Phyre2 и матрицы (известные кристаллические структуры) c1lipA\_ “Barley lipid transfer protein (NMR)” и c2rkna\_ “X-ray structure of the self-defense and signaling protein DIR1 *Arabidopsis thaliana*”.

Поскольку MEME-предсказание показало высокое структурное сходство белков AI у видов картофеля, то в анализ пространственной структуры были взяты два аллельных варианта белка вида *S. demissum* (*S. demissum\_1* и *S. demissum\_2*), которые представляют два типа структуры – наличие или отсутствие консенсусного мотива 7 (A<sub>133</sub>PTPSPSP<sub>140</sub>). С достоверностью более 90% программой Phyre2 были моделированы 30–104 (*S. demissum\_1*) и 31–104 (*S. demissum\_2*) а.о., соответствующие домену LTP\_2, остальная последовательность была смоделирована *ab initio*. Последовательность домена PRK14971 была предсказана неупорядоченной, то есть не имела ни вторичной, ни третичной структуры. Домен LTP\_2 у AI белков *S. demissum\_1/S. demissum\_2* формировал две/три

$\alpha$ -спирали и одну  $\beta$ -складку, за счет взаимодействия между которыми сворачивался в выраженную третичную структуру (рис. 20).

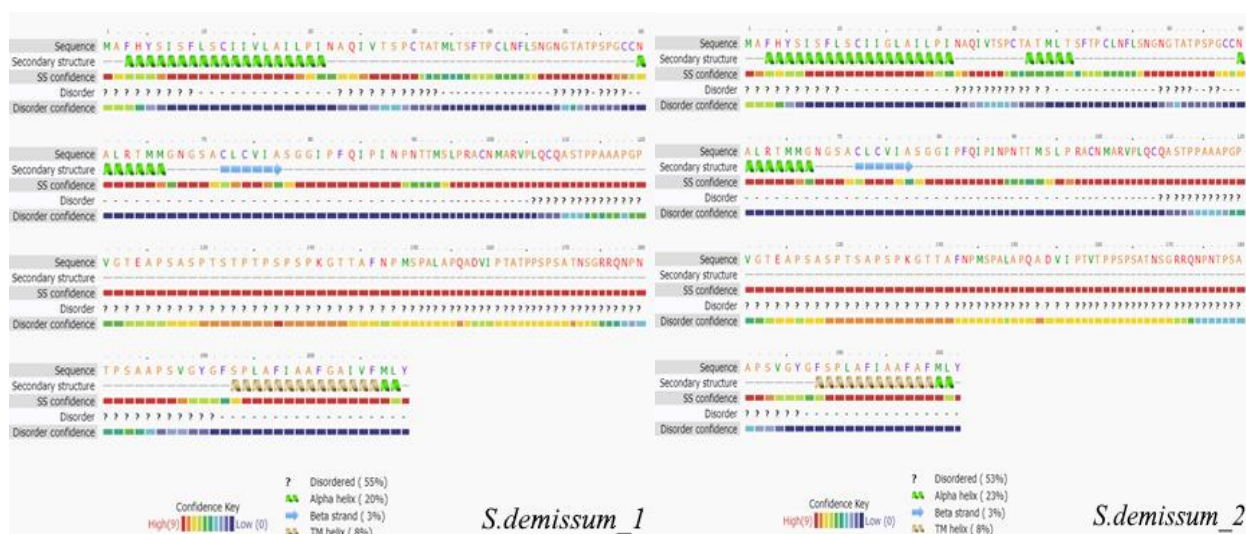


Рисунок 20 – Вторичная структура двух аллельных вариантов белка AI *S. demissum*.

На С-конце белков AI у двух аллельных вариантов выявлена последовательность трансмембранной спирали, а на N-конце – сигнального пептида. Как уже говорилось, сравнительное моделирование вторичной и третичной (3D) структур белка было проведено на примере двух аллельных вариантов белка у вида *S. demissum*, которые различаются делециями (у *S. demissum\_2* относительно *S. demissum\_1*) мотива 7 и участком на С-конце (G<sub>202</sub>AI<sub>204</sub>) (рис. 21).

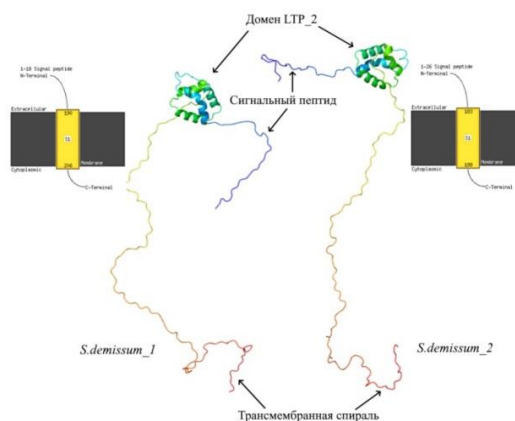


Рисунок 21 – Трехмерная структура вариантов AI *S. demissum\_1* и *S. demissum\_2*.

При сравнении выяснилось, что различия в последовательности никак не сказываются на пространственной структуре белков, однако согласно предсказанию, варианты различаются размером сигнального пептида (18 а.о. у *S. demissum\_1* и 26 а.о. у *S. demissum\_2*). Если рассматривать мотив 7, то из анализа вторичной структуры видно, что данный участок приходится на неструктурированную часть белка, поэтому его отсутствие у *S. demissum\_2* не сказывается на пространственной структуре белка. Вторая

делеция, как следует из предсказания, не помешала формированию трансмембранной спирали.

Это позволяет с высокой долей вероятности говорить о сходстве функций аллельных вариантов AI у разных видов картофеля.

Таким образом, впервые проведенная для 12 видов картофеля характеристика доменов и мотивов AI белков и третичной структуры показала, что у клубнеобразующих видов картофеля и неклубнеобразующего вида *S. etuberosum*, домены и мотивы сохраняются, что указывает на то, что у всех анализируемых видов AI представляет собой функционально правильный белок; присутствие или отсутствие мотива 7 значительно не влияет на его функциональность. Состав и расположение мотивов в клубнеобразующих видах картофеля были аналогичны тем, что наблюдаются у неклубнеобразующего вида *S. etuberosum* и у некоторых видов томатов. Такой консерватизм может указывать на важность данного белка для углеводного обмена растений.

### 3.4.2. Филогенетический анализ последовательностей AI-гомологов у видов картофеля.

Для определения филогенетических связей у видов картофеля был проведен анализ полученных AI-последовательностей; в качестве внешней группы использовали AI-гомологи видов томата *S. lycopersicum* и *S. pennellii* (рис. 22).

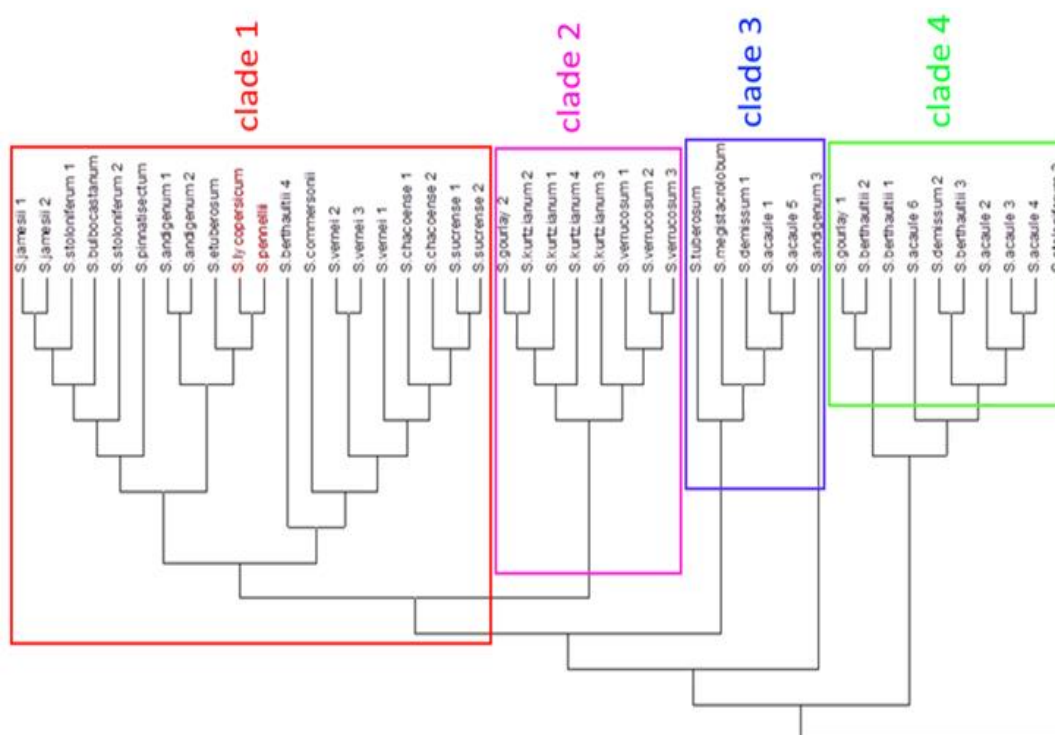


Рисунок 22 – Филогенетическая дендрограмма анализируемых последовательностей AI у видов картофеля (метод ML, модель Tamura 3, 1000 бутстрэп-реплика).



По раннее проведенным исследованиям было выявлено, что филогенетически виды картофеля можно поделить на несколько клад и подклад, но при этом аллельные варианты последовательностей *AI* одного вида могут попасть в разные клады (Rodríguez et al., 2010; Cai et al., 2012; Huang et al., 2019). Как следует из построенной нами дендрограммы, полученные последовательности группировались в четыре клады (рис. 22).

Интересно то, что выявленные аллельные варианты *AI* видов *S. acaule*, *S. demissum*, *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. gourlay* и *S. stoloniferum* попадали в разные клады. При этом один аллель *S. demissum* и четыре аллельных варианта двух образцов вида *S. acaule* группировались вместе, в то время как оставшиеся аллели этих видов формировали отдельную группу внутри сестринского кластера. Образец *S. gourlay* имел также сложный состав аллельных вариантов, где один аллель кластеризовался в кладе 2 с *S. kurtzianum* и *S. verrucosum*, а второй - в кладе 4 с другими видами. Такой разброс аллелей исследуемых образцов по разнымкладам свидетельствует о сложном аллельном составе данных видов.

### 3.4.3. Профили экспрессии гомологов *AI* в различных органах растений видов картофеля.

Так как ранее транскрипция гена ингибитора амилаз определялась только в клубнях у двух сортов *S. tuberosum*, контрастных по устойчивости к холодовому стрессу (Zhang et al., 2014b), а для видов картофеля только в листьях (Слугина и др., 2020), то представлялось интересным определить, является ли экспрессия гена *AI* видо- или органоспецифичной и сравнить уровни мРНК в различных органах у видов картофеля.

Для анализа были выбраны растения четырех видов картофеля секции *Petota* – *S. tuberosum* (сорт Надежда) и дикорастущие *S. rybinii*, *S. chacoense* и *S. kurtzianum*. Для дикорастущих видов показана умеренная холодоустойчивость на основании ареала их произрастания (Machida-Hirano, 2015), однако для данных конкретных образцов степень холодоустойчивости неизвестна, и мы ориентировались на данные для видов.

Для экспрессионного анализа методом РВ-ПЦР были отобраны ткани как надземных фотосинтезирующих органов стебля, бутона, цветка, листа, так и подземных нефотосинтезирующих – stolона, корня и клубня. Для определения уровней транскрипции гена *AI* были разработаны праймеры *AI*expF и *AI*expR (приложение, табл. ПЗ). Профиль экспрессии гена *StAI* вначале определяли для сорта Надежда. мРНК детектировалась во всех шести анализируемых органах; относительный уровень экспрессии был в достаточно широком интервале 0,00025–0,3 (рис. 23), что совпадало с данными по экспрессии *AI*, определенными ранее для двух образцов *S. berthaultii* (органы – листья, корни, клубни), контрастных по устойчивости к CIS (Zhang et al., 2014a).

Полученные данные показали, что экспрессия гена в незапасующих вегетативных органах (бутон, цветок, лист, стебель, корень) сорта Надежда была достаточно низкой, в отличие от высокой в клубне (рис. 23). Достаточно высокий уровень транскрипции генов *AI* и/или самих белков был ранее показан, помимо клубней картофеля, и для других запасных органов, например, у батата, таро, риса и ячменя (Robertson et al., 1989; Rekha and Padmaja, 2002; Zhang et al., 2014b; Ramli et al., 2018; Дьяченко и др., 2019; Слугина и др., 2020). Показанное увеличение уровней транскрипции *AI* гена в запасующих тканях по сравнению с другими вегетативными органами может говорить об активном участии белка ингибитора амилаз в защите запасного крахмала клубня от гидролиза.

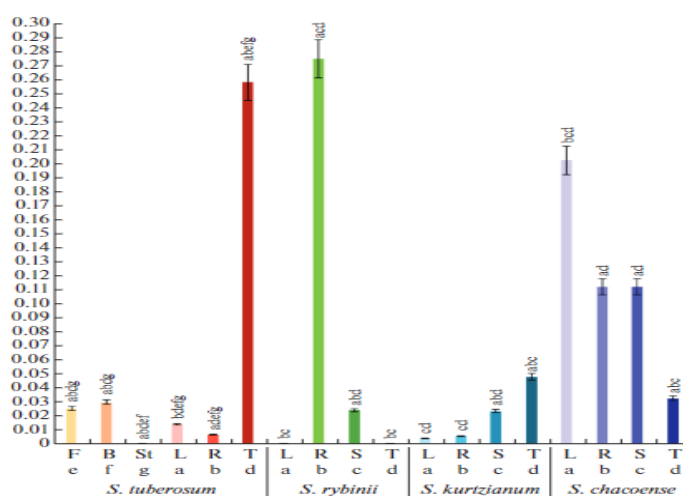


Рисунок 23 – Профиль экспрессии гена ингибитора амилаз *AI* в различных органах (стебель – St, лист – L, бутон – B, цветок – F, корень – R, стolon – S, клубень – T).

У всех анализируемых образцов видов картофеля наиболее высокий уровень транскрипции был детектирован в клубнях. У сорта Надежда экспрессия *StAI* была выявлена во всех анализируемых органах, кроме стебля, с максимумом у клубня (рис. 23). Профиль экспрессии *AI* в органах *S. kurtzianum* был в целом аналогичен таковому у *S. tuberosum*, наибольший уровень транскрипции также был детектирован в клубнях, однако в 5,2 раз ниже, чем в клубнях сорта Надежда (рис. 23). В клубнях *S. chacoense* и *S. rybinii* транскрипция гомологов *AI* была в 8,6 и 430 раз ниже, чем у сорта Надежда. Это может говорить о большей CIS-устойчивости сорта Надежда и образца *S. kurtzianum*.

Экспрессия в других подземных органах была иной. Наиболее высокий уровень экспрессии был показан для корней образца вида *S. rybinii*, где уровень транскрипции был в 2,4 раза выше, чем у *S. chacoense*, и более чем в 42 раза выше, чем у *S. kurtzianum* и *S. tuberosum*, но при этом в клубне экспрессия *SrAI* была минимальной (рис. 23). В случае столонов картина также отличалась от таковой в клубнях. Экспрессия *StAI* в этом органе была следовой, в то время как у *ScAI* – наиболее высокая среди анализируемых видов,

такая же, как в корнях, и в два раза выше, чем в клубнях. В случае *SrAI* и *SkAI* экспрессионные уровни были сходными (рис. 23).

Если сравнивать полученные экспрессионные профили *AI* генов в подземных органах (корнях, столонах и клубнях) четырех видов, то можно предположить существование нескольких возможных сценариев регуляции содержания крахмала в клубнях у разных видов картофеля: у одних видов деградация крахмала может терминироваться активностью амилаз в корнях и столонах; у других – распад крахмала может ингибироваться непосредственно в клубнях.

#### **3.4.4. Характеристика вариабельности генных и белковых последовательностей и определение аллельных вариантов *StAI* у 36 сортов картофеля.**

Так как ранее внутривидовой полиморфизм гена ингибитора амилаз не был определен, то для более детального изучения *AI* анализировали нуклеотидные и аминокислотные последовательности у культивируемых сортов и линий картофеля, проводили оценку их полиморфизма и определение аллельных вариантов.

Для определения вариабельности гена ингибитора амилаз у *S. tuberosum* были отобраны 36 образцов картофеля (31 сорт отечественной селекции, три сорта зарубежной селекции, две селекционные линии) (подобраны к.с/х.н. Милешиным А.В., растения выращены на полях ВНИИКХ, пос. Коренево). Для амплификации последовательностей гена *StAI* были использованы те же праймеры *AI-F* и *AI-R*, что и для амплификации генов ингибиторов амилаз у видов. Полученные амплификаты размером ~2000 п.н. были клонированы в плазмиду pGEM и затем по пять клонов для каждого образца были секвенированы.

В итоге для 36 взятых в анализ сортов была впервые определена полная нуклеотидная последовательность гена *AI*. Структура гена *AI*, как и ожидалось на основе данных межвидовой вариабельности, была у всех сортов одинакова и включала 4 экзона.

Нуклеотидная последовательность *StAI* у сортов различалась по длине (от 1781 п.н. (сорт Метеор 1) до 1872 п.н. (сорт Ред Скарлет 2)) в основном за счет последовательностей интронов. Экзоны по длине составляли 621 п.н. и 630 п.н.; разница была обусловлена наличием более чем у трети образцов (38,5%) в 3'-области гена делеции GGTGCAWTT (приложение, рис. П5). Данная делеция была выявлена в последовательностях гена 17 сортов, причем у девяти – в гетерозиготе.

Анализ полученных последовательностей гена *StAI* позволил выявить 530 SNPs. Уровень вариабельности составил 27,1%, то есть был крайне высоким в целом и для генов углеводного обмена в частности. Интроны, как и ожидалось, были более полиморфны и

значительно различались по длине, особенно интрон I, включающий протяженные вставки длиной до 47 п.н. Ряд достаточно протяженных делеций (например, GATATATTTCTCTY<sub>1406</sub>), и инсерция TATACC<sub>1298</sub> были выявлены в интронах II и III. У ряда сортов был выявлен высоко полиморфный фрагмент в положении 347-400 п.н., содержащий несколько инсерций, различающихся и по длине, и по нуклеотидному составу. Помимо инсерции и делеции интронные последовательности содержали 396 вариабельных сайтов.

Экзонные последовательности *StAI* у сортов картофеля также, достаточно неожиданно, отличались высокой вариабельностью. Так, уровень выявляемого полиморфизма составил 21,3% (134 SNPs), что также значительно выше полиморфизма, детектируемого для других известных генов углеводного метаболизма. Так, полиморфизм наиболее вариабельного фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* (экзон V—стоп-кодон) у сортов картофеля был менее 9% (Draffehn et al., 2010; Слугина и др., 2018); генов фосфорилирования крахмала, определенный у 192 линий картофеля, показал наибольший уровень полиморфизма для гена  $\alpha$ -гликан-Н<sub>2</sub>О-дикиназы *GWD* менее 5%, и для изоформ крахмал-синтазы *SS I-III* менее 3,5% (Carpenter et al., 2015).

Для каждого сорта были секвенированы и проанализированы по пять клонов, что позволило выявить возможные аллельные варианты для каждого сорта, взятого в анализ. Из 36 видов, которые были включены в исследование, 26 оказались гетерозиготными, то есть имели несколько вариантов аллелей гена *StAI* (приложение, рис. П5).

Анализ последовательностей экзонов 36 сортов позволил детектировать 70 аллельных вариантов (приложение, рис. П5). Интересно, что ранее для полноразмерной кодирующей последовательности гена *Pain-1* у 19 сортов картофеля было описано лишь 11 аллельных вариантов (Draffehn et al., 2010). В случае анализа полиморфизма гена *GWD* у 398 сортов картофеля было выявлено только 16 аллельных вариантов, причем пять из них имели отличия в 1-2 SNPs (Uitdewilligen et al., 2022). Также любопытно, что все анализируемые сорта картофеля характеризовались сортоспецифичными аллельными вариантами гена *StAI* и не было выявлено какого-то основного или основных аллелей, характерных для большинства сортов, как это обычно бывает для растительных генов, в том числе и для других генов картофеля (Uitdewilligen et al., 2022; Li et al., 2024). Так, например, в случае анализа гена *GWD* 398 сортов картофеля, 31,8% сортов имели аллель А и 20,8% - аллель В (Uitdewilligen et al., 2022). Стоит отметить, что в нашем исследовании, как и в случае с геном *GWD*, некоторые аллельные варианты *AI* отличались друг от друга всего на 1-2 нуклеотидные замены. Наибольшее количество различий было выявлено для аллельных вариантов сортов Люкс (18 SNPs), Ирбитский (17 SNPs) и Гала (16 SNPs). Как

и было показано ранее, тетраплоидные сорта могут иметь различный набор гаплотипов/аллельных вариантов на четырех сестринских хроматидах и по этому набору они могут быть гомо- или гетерозиготными (Li et al., 2024). В нашем исследовании только семь сортов (Утро, Великан, Танай, Сударыня, Вымпел, Матушка, Кортни) были гомозиготны по аллельному варианту *StAI* (приложение, рис. П5). Такой высокий уровень вариабельности генов и большое количество аллельных вариантов не типично как для растительных генов в целом, так и конкретно для генов *S. tuberosum*, для которых определялся возможный аллельный состав.

Для определения вариабельности аминокислотных последовательностей экзоны *StAI* были транслированы. Длина белковых последовательностей составила 206 а.о. и 209 а.о., что было результатом инсерции трех аминокислотных остатков GAI/F<sub>202</sub> на С-конце белка, как следствие нуклеотидной вставки GGTGCAWTT (рис. 24).

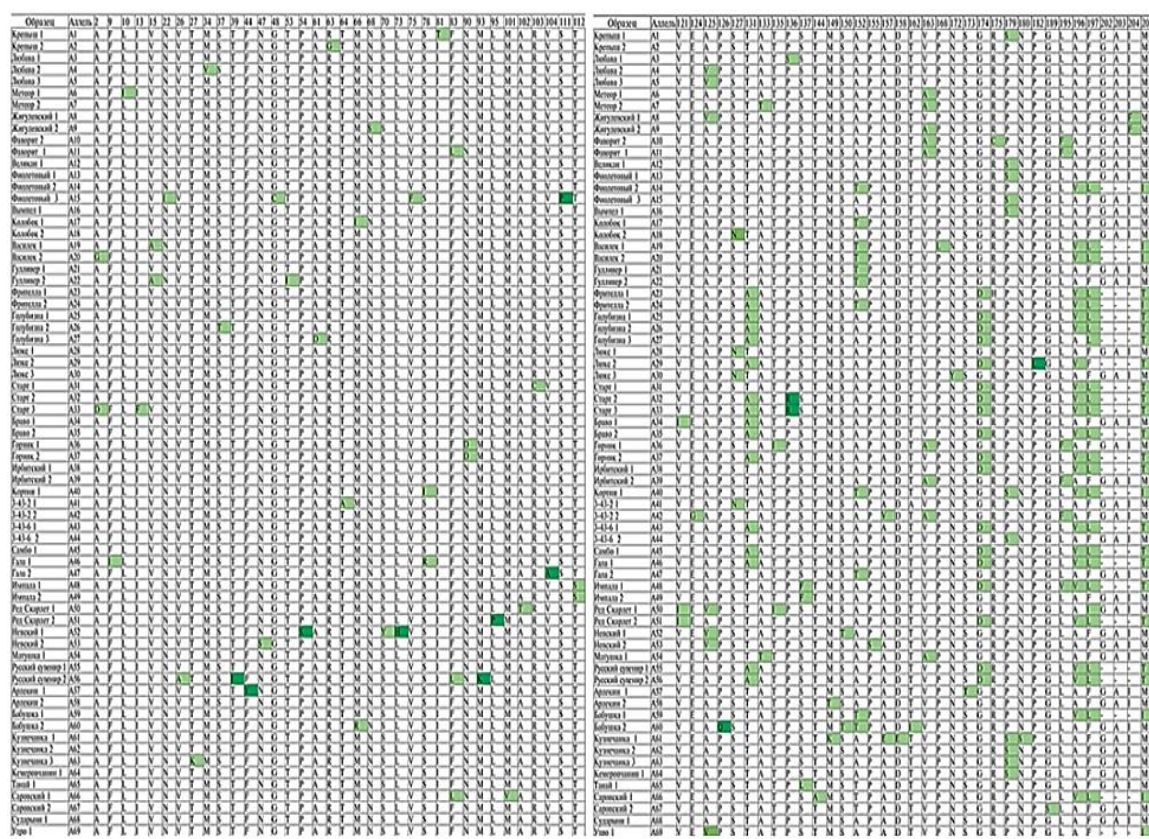


Рисунок 24 – Аллельные варианты *StAI* у 36 сортов и линий картофеля (в первой строке указаны положения аминокислотных замен).

Из 135 SNPs, детектированных в экзонах, только 69 приводили к аминокислотным заменам, уровень аминокислотного полиморфизма составил 33,0%. Из 69 выявленных замен лишь 11 были радикальными (согласно программе PROVEAN) и могли приводить к изменению конформации белка AI, изменяя его функцию или активность. В

последовательностях сортов Гала и Горняк было детектировано наибольшее количество замен (9 и 8, соответственно).

Таким образом, в результате проведенного исследования были впервые идентифицированы (амплифицированы, клонированы, секвенированы) последовательности генов ингибиторов амилаз *AI* у образцов 12 видов и 36 сортов и линий картофеля; определена экзон-интронная структура и вариабельность генов и белковых последовательностей. Выявлен высокий уровень полиморфизма у образцов видов: выявлено 42 аллельных варианта гена *AI* и 36 вариантов белковых последовательностей. Сходство доменов и мотивов белков *AI* и их третичной структуры указывает на то, что у всех анализируемых видов *AI* представляет функционально правильный белок; присутствие или отсутствие мотива 7 значительно не влияет на функциональность белка. Состав и расположение мотивов у видов клубнеобразующего картофеля было таким же, как у неклубнеобразующего вида *S. etuberosum* и видов томата, что может говорить о значимости данного белка для метаболизма углеводов растений.

Анализ последовательностей *AI* у 36 сортов и линий картофеля выявил крайне высокий как нуклеотидный (21,3%), так и аминокислотный полиморфизм (33,0%). Из выявленных 69 замещений аминокислотных остатков только 11 считаются радикальными и могут приводить к изменению конформации белка. Длина *StAI* составила 206 а.о. и 209 а.о., что обусловлено присутствием вставки *GAI/F*<sub>202</sub> на С-терминальной области белка. Все анализируемые сорта картофеля были гетерозиготными по гену *AI* и им соответствовали несколько аллельных вариантов. В результате исследования было обнаружено 70 вариантов нуклеотидной последовательности и 69 вариантов аминокислотной последовательности.

### **3.5. Определение содержания углеводов и анализ экспрессии гена $\alpha$ -амилазы *StAmy23* в органах и тканях растений сортов картофеля.**

Ранее экспрессия гена *StAmy23* была определена только в листьях и клубнях *S. tuberosum* сорта Solara (Zhang et al., 2014); было показано, что ген экспрессируется в клубнях и при прорастании его транскрипция падает (Zhang et al., 2014; Hou et al., 2017). Однако не исследовалась возможность транскрипции *StAmy23* в других органах и тканях растений картофеля, как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих.

Для анализа были выбраны образцы трех сортов – Сатурна, Гала и Барин, которые отличались по содержанию крахмала в клубнях. Уровень транскрипции определялся для шести различных органов растений картофеля: лист, стебель, плод, стolon, корень и



клубень, в последнем отдельно анализировались экспрессия в мякоти (сектор) и в кожуре (без области глазков). Растения выращивались на опытных полях ВНИИКС в 2021 году.

Было определено содержание углеводов (крахмал, сахароза, глюкоза, фруктоза) в клубнях анализируемых сортов. В клубнях сортов Гала и Сатурна содержание крахмала было сходным (11,2%), и практически вдвое выше, чем в клубнях сорта Барин (6,3%). В мякоти клубней сорта Сатурна было выявлено самое большое количество редуцирующих сахаров (глюкоза+фруктоза) – 0,392 мг/г ткани; наименьшее количество (0,016 мг/г) было показано для сорта Гала, клубни сорта Барин содержали 0,072 мг/г сахаров. Анализ содержания каждого из моносахаров показал, что в клубнях сорта Гала было в 4,5 и в 24,5 раза меньше глюкозы и фруктозы, чем в клубнях сорта Барин и Сатурна, соответственно.

Для проведения экспрессионного анализа методом РВ-ПЦР, на основании определенной последовательности *StAmy23*, были разработаны экспрессионные праймеры *StAmy23expF* и *StAmy23expR* (приложение, табл. ПЗ). Результаты проведенного анализа показали, что во всех шести анализируемых органах и тканях всех трех сортов картофеля уровень транскрипции *StAmy23* был достаточно высок (исключение - кожа клубня сорта Сатурна) (рис. 25).

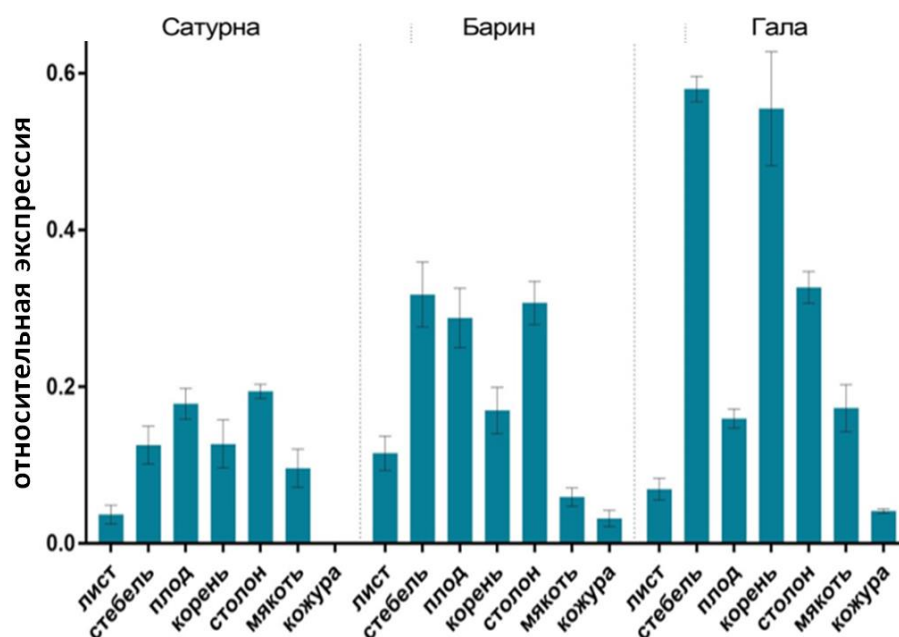


Рисунок 25 – Экспрессия гена *StAmy23* в органах и тканях растений картофеля сортов.

Полученные данные показали, что *StAmy23* экспрессируется в клубнях на более высоких уровнях, чем в листьях, что подтверждает ранее опубликованные данные (Zhang et al., 2014). Однако нельзя согласиться с утверждением, что *StAmy23* транскрибируется преимущественно в тканях клубня и связан только с прорастанием клубня с максимумом экспрессии перед прорастанием (Zhang et al., 2014; Hou et al., 2019). Как следует из рисунка 25, у всех трех сортов картофеля во всех остальных анализируемых органах, как

вегетативных, так и в плодах, экспрессия *StAmy23* была выше (в целом в 1,5-2,7 раза), чем в клубнях (суммарно в кожуре и мякоти). Следует отметить значительные межсортовые различия в транскрипции *StAmy23*, при том, что соотношения уровней мРНК в различных органах у сортов были схожи (рис. 25).

Так как взятые в анализ сорта практически вдвое различались содержанием крахмала и сахаров в клубнях, то было интересно сопоставить уровни синтезируемой в клубнях мРНК *StAmy23* между сортами. Наименьший уровень экспрессии *StAmy23* в мякоти клубня был у сорта Барин, для которого также было характерно наименьшее содержание крахмала, а наиболее высокий у сорта Гала с высоким содержанием крахмала в клубнях, тогда как в кожуре клубней он не различался между сортами. Для листьев уровни транскриптов были одинаково низкими, с небольшим преимуществом у сорта Барин. Экспрессия *StAmy23* в стеблях была максимальной у сорта Гала, наиболее низкий – у сорта Сатурна. В целом наиболее высоким уровнем экспрессии практически во всех органах, за исключением плода, характеризовался сорт Гала. Можно предположить, что это может отражать сортоспецифичность экспрессии данного гена. Тогда более низкий уровень транскрипции в плодах у растений сорта Гала можно, по всей видимости, объяснить разницей в зрелости плода у анализируемых сортов, поскольку, как было показано, для  $\alpha$ -амилаз характерно значительное изменение уровня их транскрипции и при росте клубней, и при созревании плодов (Duan et al., 2024).

Поиск возможной взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *StAmy23* и биохимическими данными, проведенный в программе GraphPad Prism v. 7.02 с использованием значения коэффициента корреляции Пирсона и *p*-value, позволил выявить положительную корреляцию между уровнем транскрипции *StAmy23* и содержанием крахмала, но не содержанием редуцирующих сахаров, что может говорить о том, что, по всей видимости, активность  $\alpha$ -амилазы *StAmy23* дополняется также активностью  $\beta$ -амилаз, а также другими ферментами метаболизма крахмала, прежде всего, ингибиторами амилаз и различных инвертаз (Слугина и др., 2018; Слугина и др., 2020). Помимо этого нужно учитывать действие ферментов гидролиза сахарозы, и действие различных транскрипционных факторов.

Таким образом, впервые был охарактеризован профиль экспрессии гена *StAmy23* в шести органах и тканях растений картофеля у трех сортов, различающихся содержанием крахмала в клубнях. Показано, что *StAmy23* транскрибируется во всех анализируемых органах и не характеризуется преимущественной экспрессии в клубнях. Высокий уровень транскриптов *StAmy23* в фотосинтезирующих тканях растений картофеля свидетельствует об участии фермента в регуляции метаболизма крахмала не только в клубнях, но также и в



других как вегетативных, так и генеративных органах для поддержания процессов роста растения, а также в формировании ответа на абиотические стрессы.

### **3.6. Изменение синтеза вторичных метаболитов и экспрессии генов, их кодирующих, у картофеля в условиях холодого стресса.**

У растений в процессе эволюции сформировались сложные сигнальные и защитные системы, чтобы справляться с действием различных биотических и абиотических стрессов, в том числе и с воздействием пониженных температур. Для инактивации образующихся при стрессовом воздействии молекул активных форм кислорода (АФК, ROS), растения выработали несколько механизмов и, прежде всего, синтез вторичных метаболитов, таких как каротиноиды, антоцианы и аскорбат, оказывающих антиоксидантное действие в условиях стресса (Shah and Smith, 2020; Naing and Kim, 2021). Считается, что именно аккумуляция таких вторичных метаболитов как каротиноиды и антоцианы может придавать растениям устойчивость при холодом стрессе и у различных видов растений при воздействии низких температур изменяется содержание антоцианов и каротиноидов, а также экспрессия генов их кодирующих (Mittler et al., 2004; Hwang et al., 2017; Hajhashemi et al., 2018; Šamec et al., 2022; Li et al., 2023; Bulgakov et al., 2024). Для *S. tuberosum* исследования холодого стресса в контексте с изменением содержания вторичных метаболитов крайне ограничены. В связи с этим представлялось интересным изучение изменения содержания антоцианов и каротиноидов и реакции кодирующих их генов в ответ на действие кратковременного и длительного холодого стресса в листьях и клубнях сортов *S. tuberosum*.

#### **3.6.1. Определение вариабельности генов биосинтеза каротиноидов и их экспрессии в листьях и клубнях сортов картофеля при кратковременном и длительном холодом стрессе.**

*Идентификация и характеристика генов и белковых последовательностей фитоинсинтазы S. tuberosum.* Фитоинсинтаза, катализирующая первую стадию биосинтеза каротиноидов, считается ключевым ферментом каротиногенеза (Shumskaya et al., 2012; Stra et al., 2023). Количество генов PSY, кодирующих фитоинсинтазу у растений, может различаться от трех – PSY1, PSY2 и PSY3, как у большинства видов, двух, как, например, у представителей Зонтичных или одного, как у арабидопсиса (Li et al., 2008; Welsch et al., 2008; Rodriguez-Villalon and Gas E, 2009; Stauder et al., 2018; Lisboa et al., 2022). Ранее была определена суммарная экспрессия генов PSY1/2 без разграничения на отдельные гены в клубнях семи сортов картофеля и содержание каротиноидов в мякоти и кожуре клубней (Valcarcel et al., 2016).

Так как ранее последовательности генов фитоинсинтаз картофеля не были определены и охарактеризованы, то первой задачей стала их характеристика *in silico* в геноме картофеля и определение варибельности этих генов у пяти сортов *S. tuberosum*.

Для идентификации генов фитоинсинтаз *S. tuberosum* была использована последовательность генома картофеля, представленного в генбанке NCBI. Для поиска были использованы последовательности гомологичных *PSY* генов томата. В результате *in silico* анализа из геномной последовательности были извлечены последовательности генов *StPSY1* (ID:102593756), *StPSY2* (ID:102589336) и *StPSY3* (ID:102603193).

Выравнивание последовательностей подтвердило более высокую гомологию последовательностей *StPSY1* и *StPSY2*, в то время как последовательность *StPSY3* отличалась от них значительно (рис. 26). Размеры генов составили 2794 п.н. для *StPSY1*, 2734 п.н. – *StPSY2*, 3440 п.н. – *StPSY3*. Основные различия в длинах генов связаны с варибельностью интронов. Все три гена имели одинаковую структуру и состояли из 6 кодирующих экзонов, а также включали нетранслируемый экзон в 5'-UTR области (рис. 26Б), что соответствовало структуре *PSY* генов у других видов растений (Giorio et al., 2008; Li et al., 2008; Efremov et al., 2020; Lisboa et al., 2022).

Размеры аминокислотных последовательностей варьировали значительно от 384 а.о. у *StPSY3*, 412 а.о. у *StPSY1*, и 438 а.о. у *StPSY2* (рис. 26). Сравнение белковых последовательностей выявило 79% сходства *StPSY1* и *StPSY2*, в то время как степень сродства *StPSY1/StPSY2* с *StPSY3* не превышала 65%.

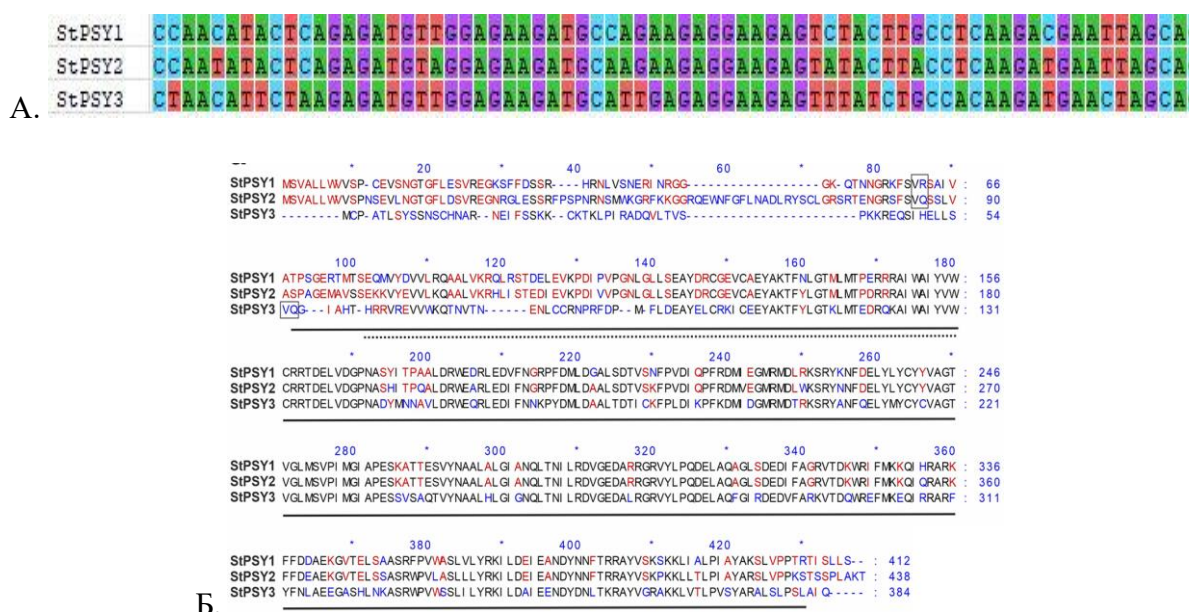


Рисунок 26 – Фрагмент экзона IV (А) и полные аминокислотные (Б) последовательности *StPSY* (подчеркнут фитоинсинтазный домен, в рамке выделен сайт отщепления транзитного пептида).

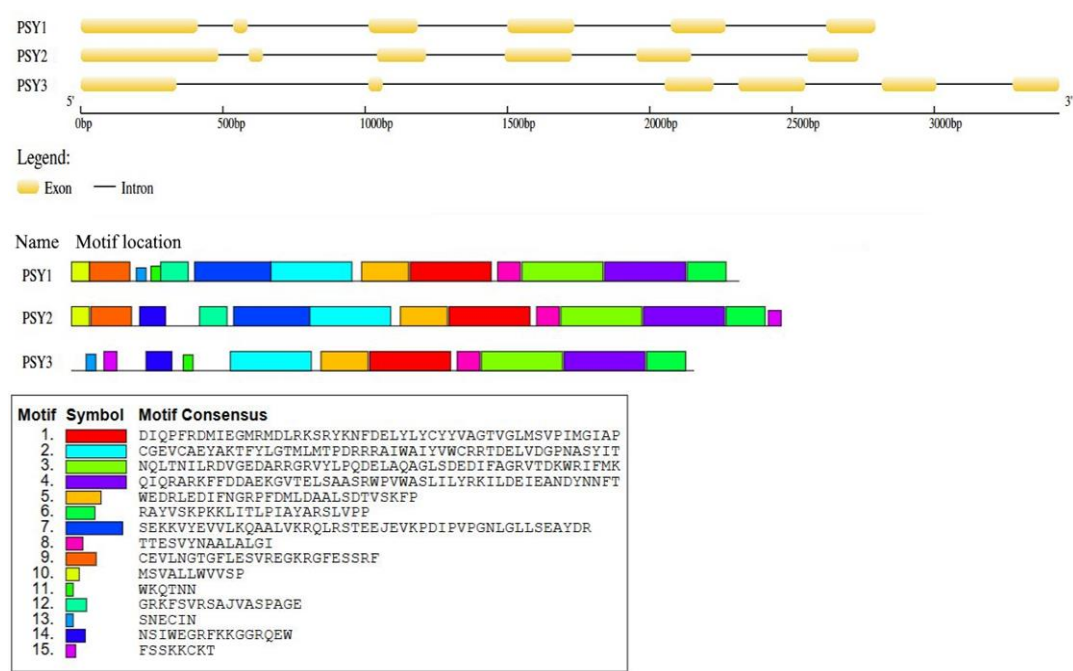


Рисунок 27 – Экзон-интронная структура трех генов *StPSY* и состав доменов белков.

Анализ функциональных последовательностей выявил фитоинсинтазный домен PLN02632 у всех белков (*StPSY1*<sub>75-406ao</sub>, *StPSY2*<sub>92-430ao</sub>, *StPSY3*<sub>63-380ao</sub>). Основные различия белков *StPSY1* и *StPSY2* связаны с присутствием на С-конце последовательности FSSRRCKT и мотивов FPSP и RQEWNFGFLNADLRYSCSL на N-конце (рис. 26Б, 27). Ранее было предсказано наличие на N-конце фитоинсинтазы транзитного пептида, ответственного за пластидную локализацию и выявлен функционально значимый сайт его отщепления (Giorio et al., 2008; Lisboa et al., 2022). У фитоинсинтаз картофеля данный сайт был также определен как *StPSY1-V61/R62*, *StPSY2-V85/Q86*, *StPSY3-V55/Q56* (рис. 26Б, 27). Последовательность транзитного пептида у *StPSY3* значительно отличается от такового у *StPSY2* и *StPSY1* (рис. 27).

*Филогенетический анализ генов StPSY.* На основе последовательностей белков *StPSY* и их гомологов из томата, перца и арабидопсиса была создана дендрограмма (рис. 28). Все гомологи *PSY1* и *PSY2* видов Пасленовых группируются вместе, формируя отдельные подкластеры. Гомологи *PSY3*, включая *StPSY3*, кластеризуются отдельно, занимая базовую позицию по отношению к кластерам *PSY1* и *PSY2*.

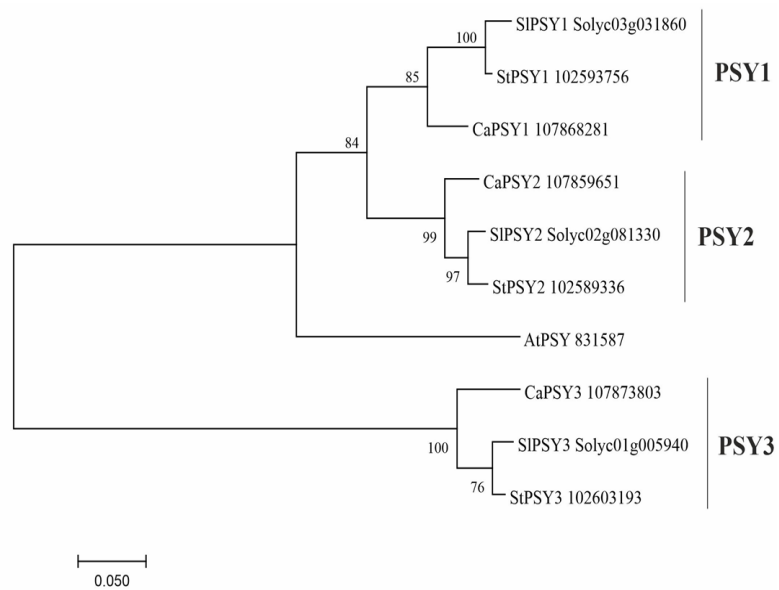


Рисунок 28 – Дендрограмма белковых последовательностей фитоинсинтаз растений.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фитоинсинтаз картофеля подтверждают данные о филогенетическом сходстве и эволюционной молодости PSY1 и PSY2 в сравнении с PSY3 и возможном возникновении PSY1 и PSY2 в результате дупликации гена-предшественника с возможной последующей функциональной диверсификацией (Giorio et al., 2008; Li et al., 2008; Efremov et al., 2020; Lisboa et al., 2022).

*Характеристика регуляторных последовательностей генов StPSY.* *cis*-регуляторные элементы промоторов и 5'UTR районов генов играют ключевую роль в процессе регуляции экспрессии генов. Исследования промоторов генов, связанных с биосинтезом каротиноидов, в основном сосредоточены на реакции на свет, и существует несколько исследований реакции на температуры (Welsch et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2010). Существует достаточно ограниченное количество исследований промоторных районов генов каротиногенеза, в том числе у PSY (Efremov et al., 2020), при этом регуляторные последовательности генов *StPSY* ранее описаны не были вовсе.

Для того чтобы определить особенности регуляции транскрипции всех трех генов *StPSY* картофеля были проанализированы промоторы и 5'UTR области длиной ~1.5 т.п.н. и проведен поиск *cis*-регуляторных элементов. Было детектировано 30 (*StPSY1*), 40 (*StPSY2*) и 5 (*StPSY3*) *cis*-регуляторных сайтов. Подавляющее большинство из них светочувствительны, что объясняется важной ролью каротиноидов в процессе фотосинтеза (табл. 3). Кроме того, у генов *StPSY1* и *StPSY2* было найдено 5 и 11, соответственно, сайтов, связанных с АБК. В промоторе *StPSY1* был найден LTR-сайт, связанный с реакцией на низкие температуры.

Таблица 3 – *cis*-регуляторные сайты в промоторных последовательностях генов *StPSY*.

		мотивы	Регуляторные участки генов		
			<i>StPSY1</i>	<i>StPSY2</i>	<i>StPSY3</i>
Количество <i>cis</i> -регуляторных сайтов в промоторных и 5'-UTR областях генов	Светочувствительные элементы	TCCC-motif	-	1	1
		Box 4	4	3	1
		ATC-motif	-	-	2
		GATA-motif	1	2	1
		TCT-motif	1	2	-
		ACE	-	-	-
		AE-box	1	1	-
		MRE	5	1	-
		Box II	1	2	-
		G-box	6	9	-
		GT1-motif	4	4	-
		Chs-CMA1a	-	1	-
		Gap-box	-	1	-
		LAMP-element	-	2	-
	АБК	wABRE	5	11	-
	Холод	LTR	1	-	-

*Характеристика вариабельности генов StPSY у сортов картофеля.* Так как ранее не определялся внутривидовой уровень вариабельности генов фитоинсинтаз у видов картофеля, то представлялось интересным охарактеризовать его у генов *StPSY1* и *StPSY2* сортов *S. tuberosum* и определить аллельные варианты. Для анализа были отобраны пять сортов картофеля – Барин, Утро, Красавчик, Северное сияние и Надежда, которые ранее были изучены на предмет полиморфизма и экспрессии генов углеводного обмена, и, кроме того, отличались окраской кожуры и мякоти клубней.

Для определения вариабельности кодирующих последовательностей с использованием разработанных праймеров *StPSY1geneR-StPSY1geneF* и *StPSY2geneR-StPSY2geneF* (приложение, табл. П3) были амплифицированы и секвенированы кДНК клубней отобранных сортов. В результате ПЦР реакции были амплифицированы фрагменты размером ~1,2 и ~1,3 т.п.н. соответственно, что совпадало с ожидаемым размером кодирующих последовательностей генов *StPSY1* и *StPSY2*.

Секвенирование полученных фрагментов выявило одинаковую длину гена *StPSY1* у пяти исследуемых сортов картофеля – 1239 п.н., что соответствует белку в 412 а.о. Межсортовой полиморфизм кодирующих последовательностей оказался крайне низким. При анализе выявлено отсутствие инделей и только наличие 9 SNPs, из которых шесть найдено в экзоне I, в то время как другие экзоны были инвариантны (рис. 29А).

Сорта Красавчик и Надежда имели специфичные аллельные варианты, когда как у остальных сортов присутствовал один вариант *StPSY*. *SlPSY* сортов томата и других представителей семейства Паслёновых также характеризовались низкой вариабельностью (Sugiyama et al., 2017; Ahrazem et al., 2019).



Анализ белковых последовательностей *StPSY1* сортов картофеля показал, что SNP не приводили к заменам аминокислотных остатков. Это может свидетельствовать о консервативности *StPSY1* у сортов картофеля (рис. 29Б).

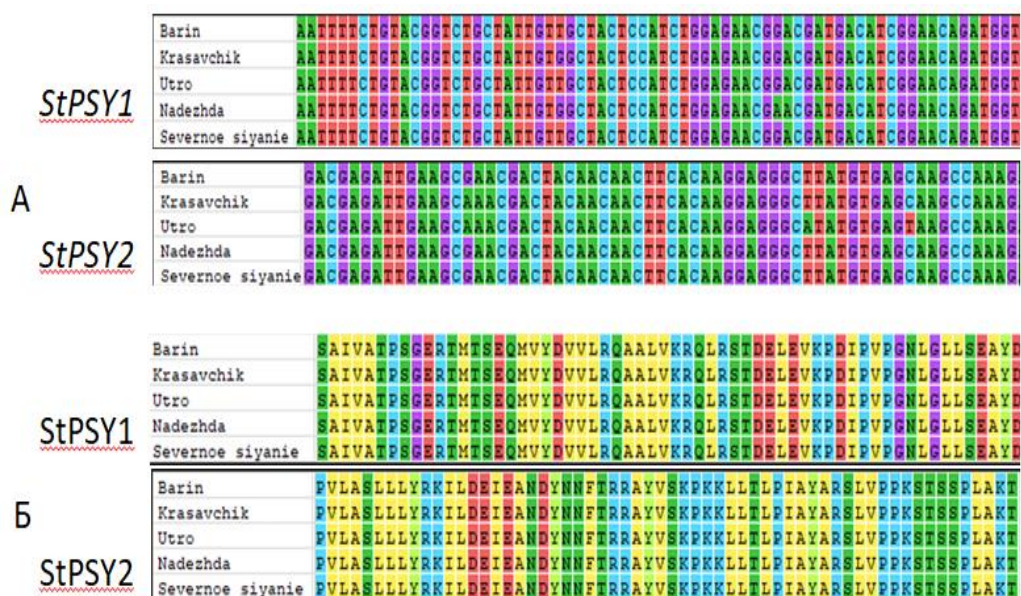


Рисунок 29 – Полиморфизм последовательностей *StPSY1* и *StPSY2* (А) и кодируемых белков (Б) у пяти сортов картофеля.

По аналогии были получены и охарактеризованы последовательности кДНК генов *StPSY2*. Длина кДНК *StPSY2* составила 1314 п.н., соответствующая 438 а.о. белка. Межсортная вариабельность *StPSY2* также была низка. Всего было обнаружено 14 одонуклеотидных полиморфизмов, индели также отсутствовали. Наибольшее количество замен нуклеотидов было выявлено в экзоне I (7 SNPs) (рис. 29А).

Анализ белковых последовательностей пяти сортов картофеля показал, что выявленные SNP также не приводили к аминокислотным заменам, что также говорит о консервативности белка *StPSY2* у сортов картофеля (рис. 29Б).

Таким образом, анализ полиморфизма ключевых генов каротиногенеза *StPSY1* и *StPSY2*, а также кодируемых ими белков у пяти сортов картофеля показал крайне низкие уровни вариабельности, что может свидетельствовать о консервативности *StPSY* у сортов *S. tuberosum*.

*Определение паттернов экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в листьях S. tuberosum при кратковременном и долговременном холодовом стрессе.* Для дальнейшего анализа функциональной характеристики генов каротиногенеза *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3*, а также определения содержания вторичных метаболитов и экспрессии генов, их контролирующих, в надземной части растений (в листьях) при кратковременном холодовом стрессе, имитирующем весенние заморозки, был отобран сорт Леди Клэр.

Данный сорт рекомендуется к выращиванию в средней полосе РФ, где нередки случаи возвратных ночных заморозков и похолоданий (как это случилось в 2019 и 2024 гг).

Биосинтез каротиноидов регулируется многими факторами, включая условия окружающей среды, эндогенные сигналы и действие различных транскрипционных факторов (Arango et al., 2014; Li et al., 2016). Важным фактором окружающей среды, влияющим на накопление каротиноидов, является температура (Hwang et al., 2017; Šamec et al., 2022; Li et al., 2023). Синтез ликопина в растениях подавлялся при температуре ниже 12°C или выше 32°C (Dumas et al., 2003). Также для нескольких сортов определен уровень транскрипции семи генов биосинтеза в клубнях, и связь содержания отдельных типов каротиноидов с генотипом и условиями выращивания (Paayavula et al., 2012; Fogelman et al., 2019). Таким образом, ранее не изучалась экспрессия генов каротиноидов в ответ на действие холодового стресса у растений *S. tuberosum*, поэтому в продолжение работ по идентификации и структурно-функциональной характеристике последовательностей генов биосинтеза каротиноидов была проведена оценка возможной роли генов каротиногенеза в различных органах растений картофеля у различных сортов в ответных реакциях на холодовый стресс.

*Определение паттернов экспрессии генов фитоинсинтазы и содержания каротиноидов в листьях S. tuberosum при кратковременном холодовом стрессе (+3°C).* Схема эксперимента была описана в главе материалы и методы (рис. 8). Проведенный биохимический анализ содержания суммы каротиноидов показал, что холодовый стресс приводит к повышению содержания каротиноидов в листьях картофеля, однако, эти изменения были незначительны (рис. 30). После 24 ч инкубирования при +3°C происходит небольшое незначительное снижение синтеза каротиноидов в листьях сорта Леди Клэр, за которым следует также небольшое увеличение через 48 ч холодового стресса (рис. 30). Сходные результаты были показаны и при анализе листовой ткани кукурузы и сои, где также не были выявлены значительные изменения в содержании каротиноидов после 24 ч и 48 ч холодового стресса (Mazur et al., 2024). В то же время для листьев двух сортов чая (*C. sinensis*) и османтуса душистого (*Osmanthus fragrans* Lour.) ранее показано увеличение содержания каротиноидов в листьях при выращивании при пониженных температурах (Yang et al., 2021; Wang et al., 2022).

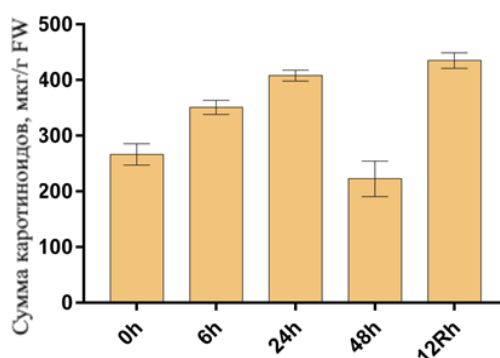


Рисунок 30 — Изменение содержания общих каротиноидов в листьях растений сорта Леди Клэр в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C). 0h – контроль (20°C); 6h, 24h, 48h – холодовый стресс 6, 24, 48 ч, соответственно; 12hR – 12 ч восстановления после стресса.

Для определения уровней экспрессии анализируемых генов фитоинсинтаз в листьях контрольных и опытных растений, подвергнутых воздействию кратковременного холодового стресса, были разработаны ген-специфичные праймеры: PSY1, PSY2, PSY3 (приложение, табл. ПЗ). Первым этапом работы было определение уровней транскрипции всех трех генов фитоинсинтаз в листьях картофеля при нормальных условиях. Как следует из рисунка 31, транскрипция генов *PSY* при нормальных условиях (+20°C) отличалась значительно. Наибольший уровень экспрессии в листьях был показан для гена *StPSY2*, который более чем в 10 раз был выше экспрессии гена *StPSY1*, что согласуется с тем, что именно *PSY2* является основной фитоинсинтазой в фотосинтезирующих тканях большинства растений (Welsch et al., 2008; Li et al., 2008).

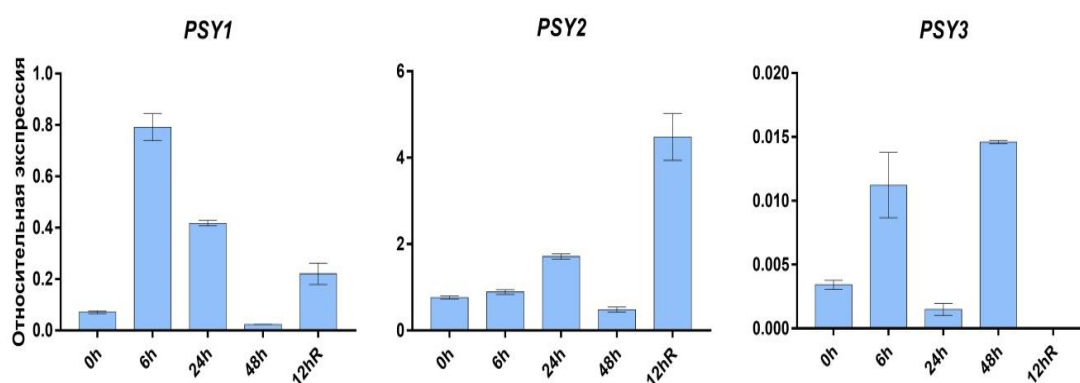


Рисунок 31 – Изменение экспрессии генов *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3* в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C) (обозначения см. рис. 30).

Достаточно неожиданна была детекция транскриптов *StPSY3* в тканях листа картофеля, так как ранее считалось, что ген *PSY3* транскрибируется только в корнях или в ответе на действие стрессовых факторов, как это было показано для кукурузы (Li et al., 2008). Следовые количества транскриптов *PSY3* в листьях были показаны только для чая (*C. sinensis*) (Li et al., 2023).



Исходя из полученного паттерна экспрессии можно утверждать, что транскрипция всех трех генов *StPSY* усиливается при воздействии холода, но в разной степени: *StPSY2* – в значительно большей, чем *StPSY1* и *StPSY3*. При этом разница в уровнях экспрессии в листьях картофеля между генами *StPSY2*, *StPSY1* и *StPSY3* на всем протяжении воздействия стресса составляет один и два порядка, соответственно (рис. 31), что соотносится с основополагающей функцией PSY2 в биосинтезе каротиноидов в листьях (Welsch et al., 2008; Li et al., 2008).

Для всех анализируемых генов картофеля характерен достаточно быстрый ответ на холодостресс и через 6 часов инкубации при +3°C в листьях детектируется увеличение экспрессии по сравнению с контролем. При этом наиболее значительный рост экспрессии наблюдается для *StPSY1* (в 7,5 раз) и *StPSY3* (в 4 раза), а в случае *StPSY2* увеличение транскрипции незначительно (только в 0,15 раз). Однако после 24 ч холодостресса экспрессия *StPSY2* продолжает увеличиваться практически вдвое по сравнению с контролем и 6 ч холодостресса. В этой же временной точке наблюдается снижение экспрессии *StPSY1* и *StPSY3* по сравнению с 6 ч, а в случае последнего практически до следовых количеств и ниже уровня экспрессии в контроле (рис. 31). После более продолжительного воздействия холода (48 часов), транскрипция основных генов *StPSY2* и *StPSY1* падает до стрессового уровня и только в случае *StPSY3* повышается в сравнении с другими точками стресса и контролем, но тем не менее в абсолютном выражении уровни транскрипции этого гена остаются следовыми. Было достаточно неожиданно увеличение транскрипции генов *StPSY2* и *StPSY1* в листьях сорта Леди Клэр при восстановлении после стресса (12 часов инкубации при +20°C) в 6 и 3 раза превышающий до стрессовые уровни (рис. 31), по всей видимости, для компенсации результатов воздействия стресса.

Таким образом, в ответ на кратковременный холодостресс активируется экспрессия всех трех генов фитоинсинтаз в листьях картофеля, при этом ген *StPSY2* отвечает за «быстрый» ответ на действие стрессового фактора (6 ч), а *StPSY1* – за более «поздний» ответ при продолжающемся воздействии стресса (24 ч). В результате такое тандемное изменение уровней транскрипции может привести к активному синтезу фитоина – предшественника всех каротиноидов, и, как результат, защите клеток от стрессового воздействия. Выявленный впервые паттерн экспрессии *StPSY3* не повторял профили транскрипции двух других генов фитоинсинтаз картофеля, достаточно сильно изменялся при стрессовом воздействии и в ряде случаев (6 и 48 ч стресса) был сопоставим с уровнем *StPSY1* в норме.

Определение паттернов экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и содержания каротиноидов в клубнях пяти сортов *S. tuberosum* при долговременном холодовом стрессе ( $+3^{\circ}\text{C}$ , 7 месяцев). В дополнение к работам по определению изменения углеводов и генов, ассоциированных с их метаболизмом, представлялось интересным оценить изменения уровней транскрипции генов каротиногенеза в динамике хранения клубней при низких температурах ( $+3^{\circ}\text{C}$ ) в течение 7 месяцев, аналогично условиям хранения клубней в картофелехранилище. Отбор материала для анализа проводился в динамике холодового хранения при  $+3^{\circ}\text{C}$ : в сентябре были взяты свежие клубни, в феврале – через 4 месяца после сбора, а в апреле – через 7 месяцев хранения.

Было определено суммарное содержание каротиноидов в клубнях пяти сортов картофеля в динамике холодового хранения (рис. 32).

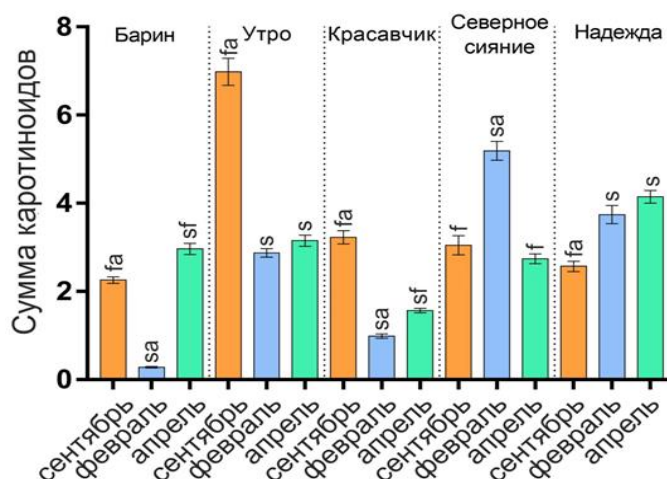


Рисунок 32 – Суммарное содержание каротиноидов (мкг/г сырого веса) в клубнях картофеля анализируемых сортов в динамике низкотемпературного ( $+3^{\circ}\text{C}$ ). Буквами s, f и a над столбцами обозначено достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) конкретного значения экспрессии гена от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (s – сентябрь, f – февраль, a – апрель)

В дострессовый период (сентябрь) содержание каротиноидов в клубнях сортов было примерно одинаковым, за исключением сорта Утро, где их уровень оказался в 2 раза выше (рис. 32). Это коррелировало с интенсивной желтой окраской мякоти данного сорта. После 4 месяцев хранения при  $+3^{\circ}\text{C}$  у сортов Барин, Утро и Красавчик зафиксировано снижение содержания каротиноидов, тогда как у сортов Северного сияния и Надежды их количество возросло. К концу 7-месячного холодового хранения (апрель) динамика изменилась: у сортов Барин и Надежда наблюдался рост уровня пигментов; у сортов Утро и Красавчик — снижение; у Северного сияния показатели остались неизменными.

При сравнении апрельских и февральских данных выявлено увеличение общего количества каротиноидов у всех сортов, кроме Северного сияния. Ранее аналогичная

зависимость накопления этих соединений от генотипа была описана для сорта Desiree, у которого длительное хранение также привело к изменению состава каротиноидов (Morris et al., 2004). Одной из возможных причин роста концентрации пигментов к концу хранения может быть частичная дегидратация клубней, усиливающая их компартментализацию.

*Определение паттернов экспрессии 16 генов биосинтеза каротиноидов в клубнях пяти сортов при долговременном холодовом стрессе.* Те же ткани клубней, которые были взяты для определения содержания каротиноидов в динамике длительного хранения при +3°C, были применены для выделения мРНК и последующего экспрессионного анализа 16 генов, охватывающий весь путь биосинтеза каротиноидов (рис. 33).

В сентябре, до того, как клубни картофеля были заложены на холодное хранение, наиболее высокий уровень транскрипции большинства генов каротиноидов был показан для клубней сорта Надежда (рис. 33). В клубнях сорта Северное сияние уровень транскрипции генов был самым низким, за исключением генов *StNCED1* и *StPSY1* (ниже выявлен только у сорта Барин), а также *StLCYE* (напротив, самый высокий уровень) (рис. 33). Данные результаты согласуются с полученными ранее данными о сорто- и генотип специфичности профилей экспрессии генов каротиногенеза (Paayavula et al., 2012; Wiberley-Bradford et al., 2014).

По сравнению с исходными, профили транскрипции всех анализируемых генов биосинтеза каротиноидов по мере хранения клубней демонстрировали значительное снижение уровней транскриптов в феврале в сравнении с сентябрем, за некоторыми исключениями, в числе которых был незначительный рост экспрессионной активности в клубнях сорта Барин генов *StLCYE* и *StNCED1* и неизменным уровнем сорта Северное сияние транскриптов генов *StCrtISO*, *StLCYB1* и *StNCED1* (рис. 33).

В период с февраля по апрель экспрессия анализируемых генов каротиногенеза практически не менялась, особенно в сравнении со значительным падением экспрессии в период первых 4 месяцев хранения при +3°C с сентября по февраль. Так, например, у сорта Надежда детектировалось незначительное увеличение в тканях клубня уровней экспрессии генов *StPSY2*, *StPDS*, *StLYCB1*, *StVDE*, *StZDS* и *StZEP* и уменьшение транскрипции *StPSY3* (рис. 33).

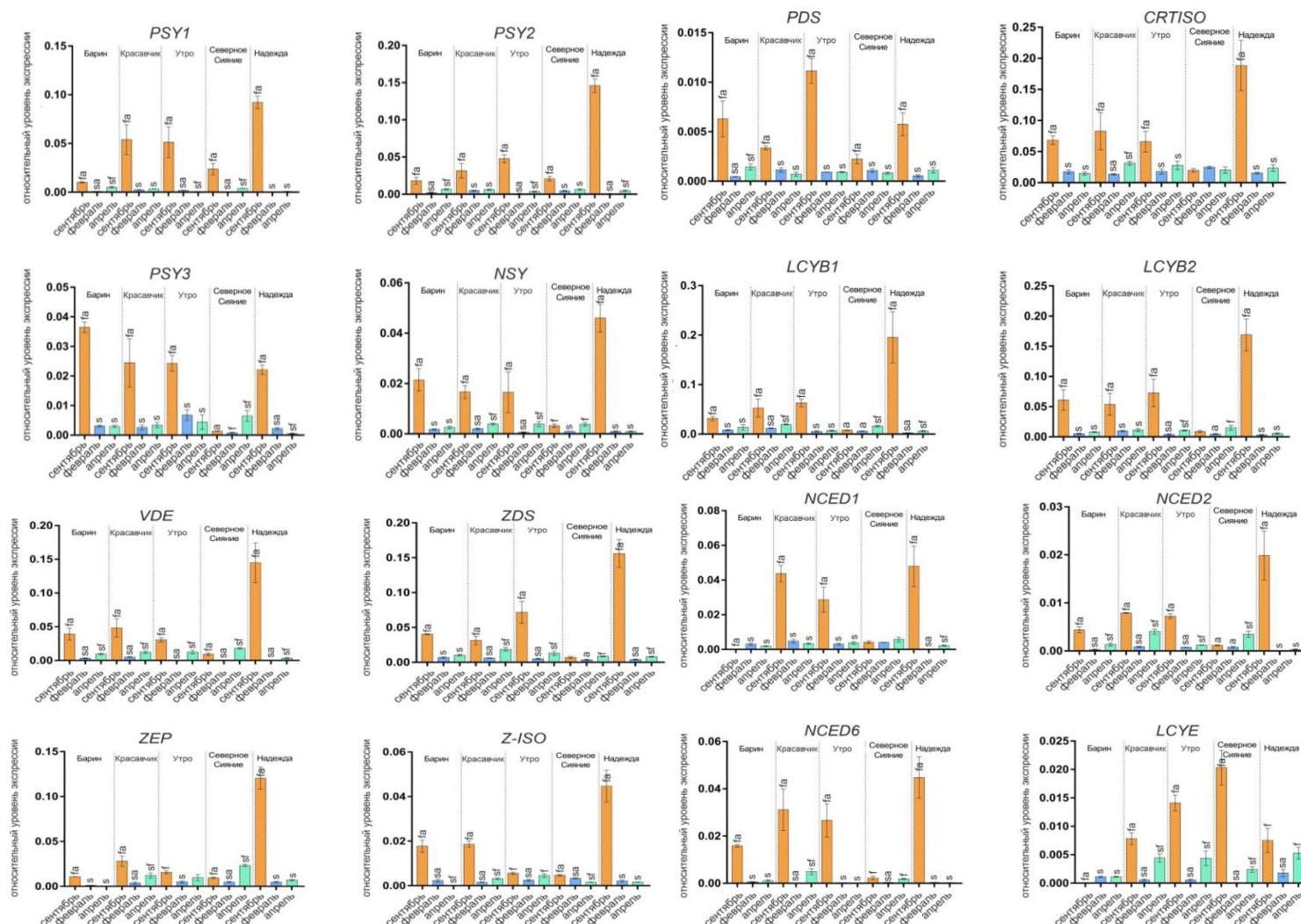


Рисунок 33 – Профили экспрессии 16 генов каротиногенеза в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель). Буквами s, f и a над столбцами обозначено достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) конкретного значения экспрессии гена от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (s – сентябрь, f – февраль, a – апрель).

Сорт Утро также характеризовался незначительным увеличением транскрипции в клубнях генов *StPSY2*, *StZ-ISO*, *StLCYE*, *StLCYB2* и генов синтеза ксантофиллов *StVDE* и *StZDS*, а также уменьшением уровня экспрессии гена *StPSY1*. Тем не менее, следует еще раз отметить, что выявленные изменения транскрипции этих генов в периоде февраль-апрель были незначительны (рис. 33).

Таким образом, за некоторым исключением, для всех сортов наблюдалась общая тенденция снижения активности всех анализируемых генов каротиногенеза в период первых четырех месяцев холодного стресса (сентябрь – февраль).

Чтобы выяснить, есть ли корреляция между количеством каротиноидов в клубнях разных сортов картофеля и тем, насколько активно работают гены, отвечающие за образование каротиноидов, при длительном воздействии холода, мы провели статистический анализ. Поиск возможных корреляций между уровнем экспрессии гена и содержанием каротиноидов (регрессионный анализ) был проведен с использованием программы GraphPad Prism v.7.02. Критерии наличия корреляции: значения коэффициента Пирсона ( $r$ )>0,5 и  $p$ -value<0,05 (табл. 4).

В результате средняя достоверная корреляция была обнаружена только в случае гена *StPDS* ( $p=0,047$ ,  $r=0,52$ ) (табл. 4), кодирующего синтез фитоиндесатуразы, который катализирует первые стадии модификации 15-*цис*-фитоина – предшественника всех нижестоящих каротиноидов (Rosas-Saavedra and Stange, 2006).

Таблица 4 – Корреляционный анализ зависимости уровней экспрессии генов каротиногенеза от суммарного содержания каротиноидов в клубнях при длительном холодном хранении.

	<i>PDS</i>	<i>CRTISO</i>	<i>LCY B1</i>	<i>LCY B2</i>	<i>PSY1</i>	<i>PSY2</i>	<i>PSY3</i>	<i>NSY</i>
<i>r</i>	<b>0.52</b>	0.08	0.07	0.12	0.23	0.11	0.16	0.06
<i>R</i> <sup>2</sup>	0.27	0.007	0.005	0.015	0.055	0.013	0.027	0.003
<i>p</i> -value	<b>0.047</b>	0.763	0.806	0.654	0.399	0.683	0.559	0.834
	<i>VDE</i>	<i>ZDS</i>	<i>ZEP</i>	<i>Z-ISO</i>	<i>LCY E</i>	<i>NCED1</i>	<i>NCED2</i>	<i>NCED6</i>
<i>r</i>	-0.01	0.15	-0.02	-0.05	0.37	0.23	0.08	0.21
<i>R</i> <sup>2</sup>	<0.0001	0.022	<0.0004	0.003	0.14	0.053	0.006	0.044
<i>p</i> -value	0.97	0.594	0.943	0.846	0.169	0.408	0.78	0.453

Ранее было выявлено, что в растительных тканях, не вовлечённых в процесс фотосинтеза, таких как семена и плоды, наблюдается тесная взаимосвязь между содержанием каротиноидов и активностью генов, ответственных за их синтез (Howitt and Pogson, 2006; Филюшин и др., 2020; Efremov et al., 2020). При этом проведенный ранее для *S. tuberosum* анализ транскрипционной активности ряда генов каротиногенеза в динамике развития клубней, а также у свежесобранных клубней показал с одной

стороны зависимость от генотипа уровней экспрессии, а с другой отсутствие корреляций уровня транскрипции с содержанием соответствующих типов каротиноидов (Morris et al., 2004; Payyavula et al., 2012).

Таким образом, впервые у картофеля функционально охарактеризованы ключевые гены каротиногенеза – гены фитоинсинтаз *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3*. Проведен анализ экспрессии генов фитоинсинтаз и содержания каротиноидов в листьях *при кратковременном холододовом стрессе*, который имитирует возвратные весенние заморозки. Показано, что в ответ на кратковременный холододовый стресс содержание каротиноидов существенно не меняется. В листьях картофеля в ответ на кратковременное действие низких температур активируется экспрессия всех трех генов фитоинсинтаз, при этом ген *StPSY2* отвечает за «быстрый» ответ на действие стрессового фактора (6 ч), а *StPSY1* – за более «поздний» ответ при более продолжительном воздействии стресса (24 ч), как было показано ранее. Выявленный впервые паттерн экспрессии *StPSY3* не повторял профили двух других генов фитоинсинтаз картофеля, достаточно сильно изменялся при стрессовом воздействии и в ряде случаев (6 и 48 ч стресса) был сопоставим с уровнем *StPSY1* в норме.

В динамике долговременного (7 месяцев) воздействия низких температур (+3°C) на клубни пяти сортов картофеля были впервые определены паттерны экспрессии 16 генов, охватывающий весь путь биосинтеза каротиноидов и апокаротиноидов. В результате, за исключением корреляции средней силы для гена *StPDS*, зависимости между уровнями транскрипции отдельных генов и суммарным содержанием каротиноидов выявлено не было. Все анализируемые сорта характеризовались повышенным уровнем экспрессии почти всех анализируемых генов перед закладкой на холододовое хранение в сентябре, в сравнении с февралем–апрелем (4-7 месяцев холододового стресса). Наблюдаемое снижение экспрессии генов, отвечающих за синтез и распад каротиноидов (за исключением отдельных случаев), через 4 и 7 месяцев хранения клубней при низких температурах, вероятно, отражает переход в фазу физиологического покоя. Различия в активности генов, регулирующих отдельные этапы биосинтеза, могут объясняться спецификой накопления определённых типов каротиноидов в клубнях в процессе хранения. Динамика общего содержания этих пигментов при длительном холододовом воздействии, по-видимому, зависит от генетических особенностей сорта, что подчеркивает роль генотипа в устойчивости метаболизма к внешним условиям.

### 3.6.2. Определение паттернов экспрессии генов биосинтеза антоцианов в листьях и клубнях *S. tuberosum* при кратковременном и долговременном холодовом стрессе.

Ранее было неоднократно показано, что, как и все флавоноиды, антоцианы принимают активное участие в защите растения от абиотических стрессов (Ahmed et al., 2014; Fukumoto and Mazza, 2000; Bulgakov et al., 2024). Установлено, что при холодовом стрессе холодостойкость растения положительно коррелирует с содержанием антоцианов (Liu et al., 2020). Низкая температура стимулирует биосинтез антоцианов в листьях и экспрессию генов, регулирующих синтез антоциановых пигментов (Li et al., 2012; Zhang et al., 2019).

Биосинтез антоцианов является частью флавоноидного пути и активности так называемых «ранних» ферментов, которые кодируются структурными генами халконсинтазы (*CHS*), халконизомеразы (*CHI*) и флаванон-3-гидроксилазы (*F3H*) и далее «поздних» ферментов, кодирующимися генами: флавоноид 3'-монооксигеназы (*F3'H*), флавоноид 3',5'-гидроксилазы (*F3'5'H*), дигидрофлавонол 4-редуктазы (*DFR*). Последний фермент биосинтеза – антоцианидинсинтаза (*ANS*) приводит к образованию антоцианов дельфинидина, пеларгонидина, цианидина и их метилированных производных мальвидина, пеонидина и петунидина (Liu et al., 2018; Li et al., 2019) (рис. 34).

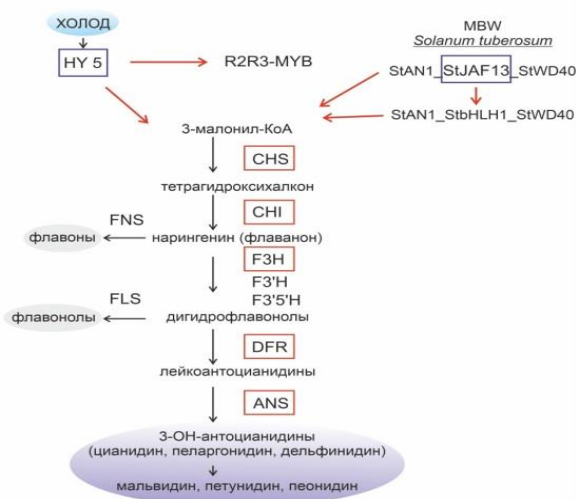


Рисунок 34 – Схема биосинтеза антоцианов. Выделены ферменты (красная рамка) и транскрипционные факторы (синяя рамка), экспрессия генов которых анализировалась.

Помимо кодирующих ферментов структурных генов биосинтез антоцианов контролируется комплексом MBW, включающим транскрипционные факторы трех семейств – R2R3-MYB, bHLH и WDR (WD40), который у *S. tuberosum* представлен StAN1-StJAF13/StHLH1-StWD40. В свою очередь, экспрессия генов MBW-комплекса, и генов ферментов биосинтеза контролируется ТФ ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5),



активирующего биосинтез антоцианов. Показано, что холодовый стресс стимулирует биосинтез антоцианов в листьях и экспрессию генов MBW-комплекса (Li et al., 2012; Zhang et al., 2019).

Известно, что у картофеля могут синтезироваться все шесть антоцианов и на сегодняшний момент в геноме *S. tuberosum* идентифицированы основные структурные и регуляторные гены биосинтеза (Li et al., 2019; Tengkun et al., 2019; Strygina et al., 2019; D'Amelia et al., 2020), а также определены механизмы регуляции синтеза пигмента (Liu et al., 2018; Strygina et al., 2019). Однако влияние различных стрессов на уровни биосинтеза антоцианов определены не были, за исключением работы по изучению холодового стресса у единственного устойчивого к холоду дикорастущего вида картофеля *S. commersonii*, где была подтверждена связь между количеством синтезированных антоцианов и холодостойкостью (D'Amelia et al., 2018). Поэтому, аналогично исследованию каротиноидов, представлялось интересным изучение изменения содержания антоцианов и экспрессии кодирующих их генов в ответ на действие кратковременного и длительного холодового стресса в листьях и клубнях сортов *S. tuberosum*.

**Определение паттернов экспрессии структурных и регуляторных генов в клубнях сортов и гибридов картофеля, отличающихся содержанием антоцианов.** В анализ были отобраны клубни картофеля семи сортов и гибридов, различающиеся по окраске мякоти и кожуры от белой до темно-фиолетовой (Барин, Гибрид 6, Гибрид 4, Гибрид 7, Сапфир, Гибрид 1, Северное сияние) (рис. 35).



Рисунок 35 – Окраска клубней анализируемых сортов и гибридов картофеля.

Проведенный биохимический анализ показал, что клубни анализируемых образцов различались по количеству антоцианов в мякоти (рис. 36). Интересно то, что визуальный анализ, при котором предположительно были расположены клубни по цвету от более темной окраски до светлой, в целом соответствовал результатам



измерения методом спектрофотометрии содержания антоцианов. Исключение составили сорт Северное сияние и Гибрид 1, где у визуально более темного по окраске клубня Гибрида 1 было выявлено меньшее содержание антоцианов, чем в мякоти менее окрашенного клубня сорта Северное сияние.

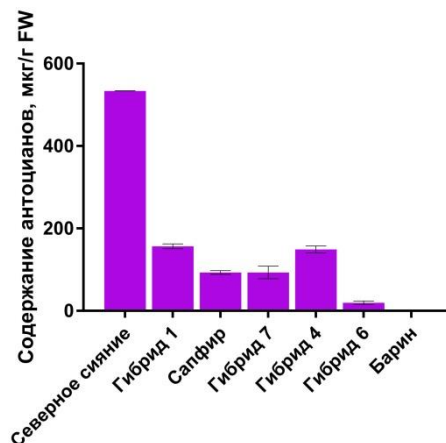


Рисунок 36 – Содержание антоцианов (мкг/г свежей ткани) в анализируемых клубнях картофеля.

Для анализа экспрессии были взяты 6 структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StF3'5'H*, *StDFR*, *StANS*, контролирующих весь путь биосинтеза антоцианов (рис. 37).

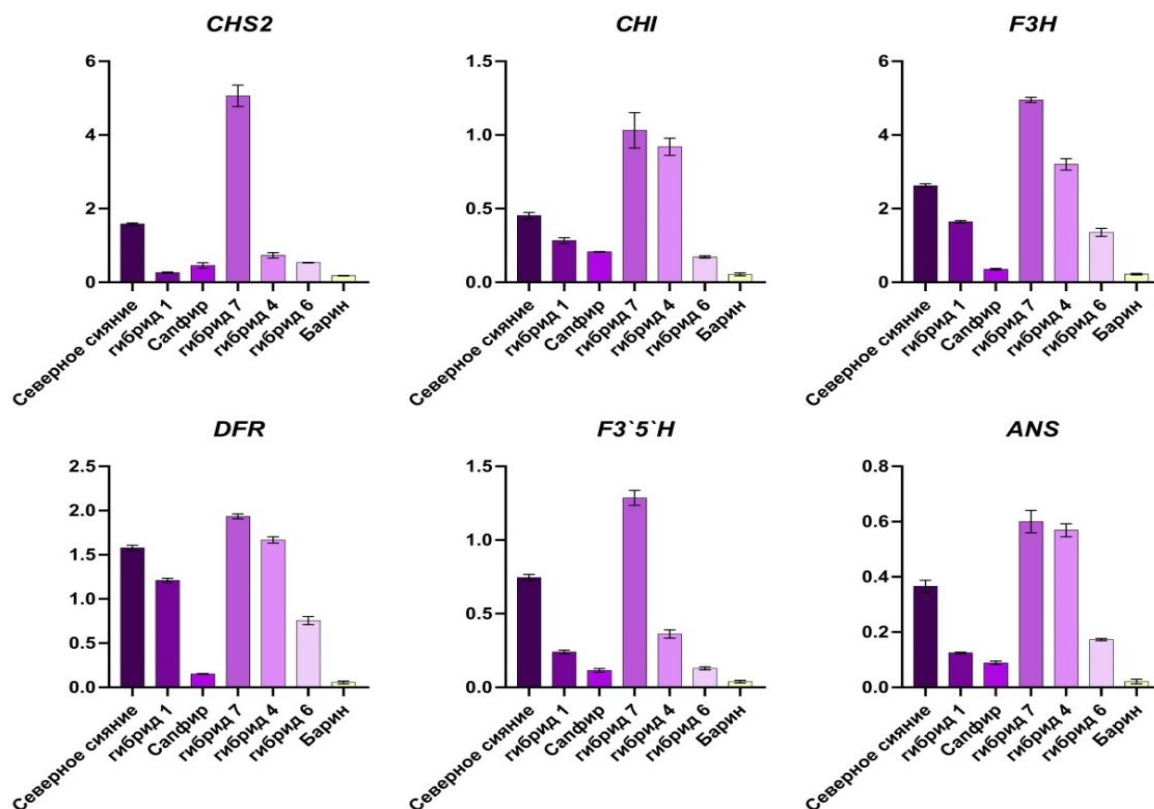


Рисунок 37 – Уровни транскрипции структурных генов биосинтеза антоцианов у анализируемых сортов и гибридов картофеля.

Анализ экспрессии структурных генов показал, что зависимость количества антоцианов/окраски мякоти клубня от уровня экспрессии анализируемых генов наблюдается только в случае сравнения образцов «белый vs. фиолетовый». Такая зависимость показана для образцов Северное сияние, Гибрид 1, Сапфир, Барин, в то время как три образца (Гибрид 7, Гибрид 4, Гибрид 6) не вписывались в общую корреляцию, но при этом внутри своей группы они ее показывали (рис. 37).

Помимо структурных в анализ были взяты два регуляторных гена-активатора синтеза флавоноидов *StHY5* и *StJAF13(=GL3)*. Для регуляторных генов зависимости уровня экспрессии от содержания антоцианов в клубне выявлено не было (рис. 38), в том числе включая сопоставление «белый vs. фиолетовый».

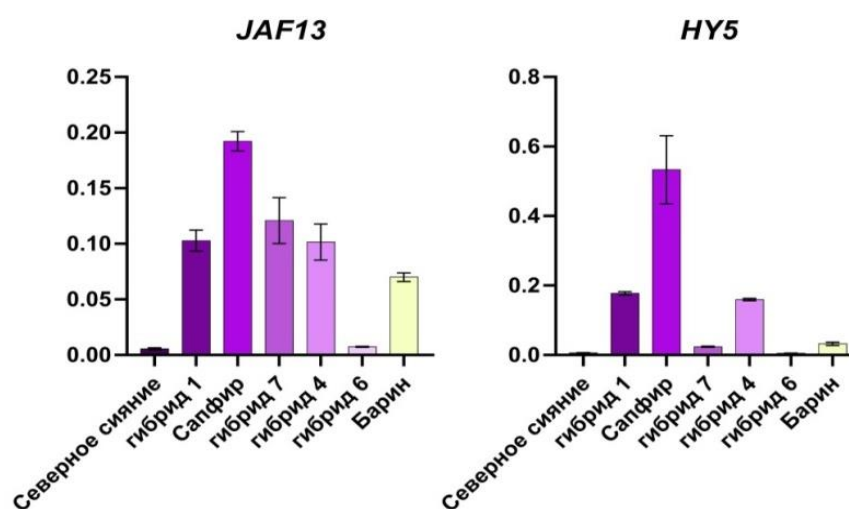


Рисунок 38 – Экспрессия регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов у сортов и гибридов картофеля.

Таким образом, впервые была охарактеризована активность ключевых структурных и регуляторных генов, ответственных за синтез антоцианов, у различных сортов картофеля, отличающихся цветом мякоти и содержанием в ней антоцианов. Это исследование существенно углубляет понимание экспрессии этих генов в клубнях картофеля и может быть применено в селекции сортов с цветной мякотью.

*Определение паттернов экспрессии генов биосинтеза антоцианов и их содержания в клубнях сорта Северное сияние при долговременном холодовом стрессе (+3°C, 7 месяцев).* Были определены изменения транскрипции двух генов биосинтеза антоцианов – «раннего» *StCHS2* и «позднего» *StDFR* в динамике длительного холодового стресса. Для анализа был взят сорт Северное сияние, для которого была характерна фиолетовая окраска мякоти и кожуры клубня (приложение, табл. П1) как результат высокого содержания антоцианов (рис. 36). Так как остальные четыре сорта, клубни которых были использованы в экспериментах по долговременному холодовому

стрессу, были с белой/кремовой окраской мякоти и содержали в лучшем случае следовые количества антоцианов, то они не рассматривались. Для биохимического и экспрессионного анализов использовалась та же проба клубней сорта Северное сияние в трех точках отбора, что и для исследования генов углеводного обмена и каротиногенеза.

Проведенный биохимический анализ содержания антоцианов в клубнях сорта Северное сияние в динамике длительного холодоговго стресса показал, что содержание этого метаболита в клубнях, отобранных в феврале после 4 месяцев инкубации при +3°C, падало (на 29%) и продолжало незначительно (на 8,4%) сокращаться после 7 месяцев стресса (рис. 39А).

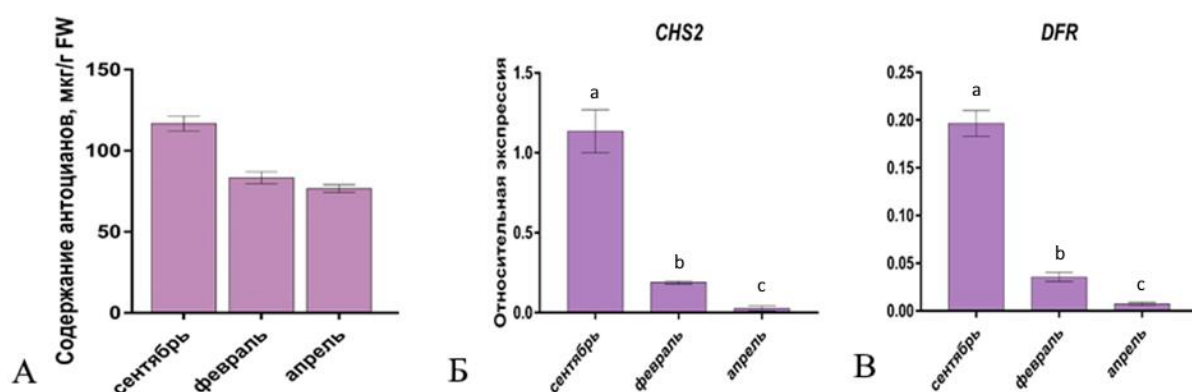


Рисунок 39 — Изменение содержания антоцианов (А) и экспрессии генов *StCHI* (Б) и *StDFR* (В) в клубнях сорта Северное сияние в ответ на длительный холодоговго стресс (+3°C; 4 и 7 месяцев). Значимые различия экспрессии между органами растения при  $p < 0,05$ .

Как видно из рисунка 39, если содержание антоцианов в период сентябрь-февраль сократилось на треть, то экспрессия и гена *StCHS2*, и *StDFR* резко падала (в 6 раз) после 4 месяцев инкубации клубней при +3°C, доходя до следовых количеств после 7 месяцев холодоговго стресса. Полученные экспрессионные данные в целом совпадали с данными по сокращению содержания антоцианов в клубнях сорта Северное сияние при длительном низкотемпературном хранении. Некоторое сокращение количества антоцианов и изменение экспрессии некоторых генов биосинтеза было ранее показано для холодоговго хранения плодов манго в течение 1,5 месяцев (Sudheeran et al., 2018).

*Определение содержания антоцианов и паттернов экспрессии структурных и регуляторных генов в листьях S. tuberosum при кратковременном холодоговго стрессе (+3°C).* В случае антоцианов было интересно определить ответную реакцию генов антоцианового пути на кратковременный холодоговго стресс в листьях сортов

картофеля, которые отличаются окраской и, соответственно, содержанием антоцианов. Для исследования были выбраны растения сорта Леди Клэр с зеленой окраской листовой пластины и линии Гибрид 1 с фиолетовой окраской листьев (рис. 40).



Рисунок 40 – Окраска листовой пластины растений сорта Леди Клэр (А) и линии Гибрид 1 (Б).

Определение содержания антоцианов и выделение РНК проводили на тех же листовых пробах сорта Леди Клэр и при тех же условиях кратковременного холодового стресса  $+3^{\circ}\text{C}$ , что и для каротиноидов (рис. 8): 'к0' (контроль при  $+20^{\circ}\text{C}$ ), '6h', '24h', '48h' (стресс в динамике) и 'в12' (восстановление после стресса). Для линии Гибрид 1 отбор проб проводился в тех же условиях.

Аналогично определению каротиноидов в листьях растений сорта Леди Клэр был проведен анализ содержания антоцианов методом спектрофотометрии. Биохимический анализ показал, что содержание антоцианов в листьях сорта Леди Клэр увеличивалось после 6 часов холодовой инкубации, затем падало после 24 часов стресса и повторно увеличивалось после 48 часов стресса (рис. 41А). Все выявленные различия в изменениях содержания пигментов в анализируемых точках были достоверны ( $p < 0,005$ ).

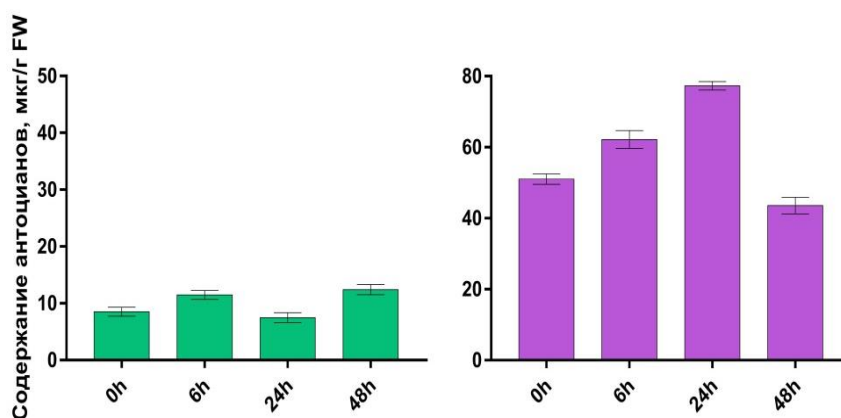


Рисунок 41 — Изменение содержания антоцианов в листьях проростков картофеля сорта Леди Клэр (А) и Гибрид 1 (Б) в ответ на кратковременный холодовый стресс ( $+3^{\circ}\text{C}$ ). 0h – контроль ( $+20^{\circ}\text{C}$ ), 6h, 24h, 48h – холодовый стресс 6, 24, 48ч, соответственно.

Изменение содержания антоцианов в ответ на воздействия стрессорных факторов было показано для других растений, в том числе в листьях при холодовом стрессе (Zhu et al., 2013; Ahmed et al., 2015). В случае картофеля в листьях нами также отмечено повышение синтеза антоцианов, что можно рассматривать как защитную реакцию от стрессорных воздействий.

Таким образом, под действием холодового стресса в листьях проростков картофеля как у зеленолиственного сорта Леди Клэр, так и у фиолетоволиственного Гибрида 1 наблюдается увеличение содержания антоцианов, которые оказывают протекторные функции в качестве антиоксидантов, снижают осмотический потенциал клеток и защищают растения от холодового стресса. В то же время содержание каротиноидов в листьях достоверно не изменяется, тем самым можно предположить, что именно антоцианы и, скорее всего аскорбат (данные нашей лаборатории), являются основными антиоксидантами при кратковременном холодовом стрессе в листьях картофеля.

*Экспрессия генов биосинтеза антоцианов в условиях кратковременного холодового стресса в листьях зеленолиственного сорта Леди Клэр и фиолетоволиственной линии Гибрид 1.* Для характеристики паттернов экспрессии генов биосинтеза антоцианов в зеленолиственных растениях сорта Леди Клэр в условиях кратковременного холодового стресса были выбраны пять ключевых генов биосинтеза (*StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*, *StANS*), охватывающие весь путь метаболизма (рис. 34). Также в анализ были взяты гены транскрипционных факторов *StJAF13* и *StHY5*.

Анализ экспрессии в листьях сорта Леди Клэр показал, что у всех генов происходит увеличение транскрипции при кратковременной инкубации растения при +3°C (рис. 42). При этом следует отметить, что при холодовом стрессе наблюдался сходный паттерн экспрессии структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* и *StDFR*: спустя 6 часов стресса уровень транскрипции всех генов повышался 2-5 раз, через 24 и 48 часов наблюдалось снижение транскрипции или достаточно резкое, как в случае генов *StCHS2* и *StDFR*, или плавное, как в случае генов *StCHI* и *StF3H* (рис. 42). Интересно, что в случае *StDFR* значительное снижение при 24 ч сопровождается повторным увеличением экспрессии после 48 ч стресса. Как и в случае поведения при холодовом стрессе генов фитоинсинтаз *StPSY*, в восстановительный период для генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* наблюдалось значительное увеличение (в 1,5-11 раз) транскрипции в сравнении контрольным уровнем до стресса (рис. 42). Несколько неожиданно было отсутствие достоверных изменений экспрессии гена *StANS* в ответ на холодовый

стресс, так как транскрипция гена во всех анализируемых точках, включая контроль, оставалась практически неизменной (рис. 42).

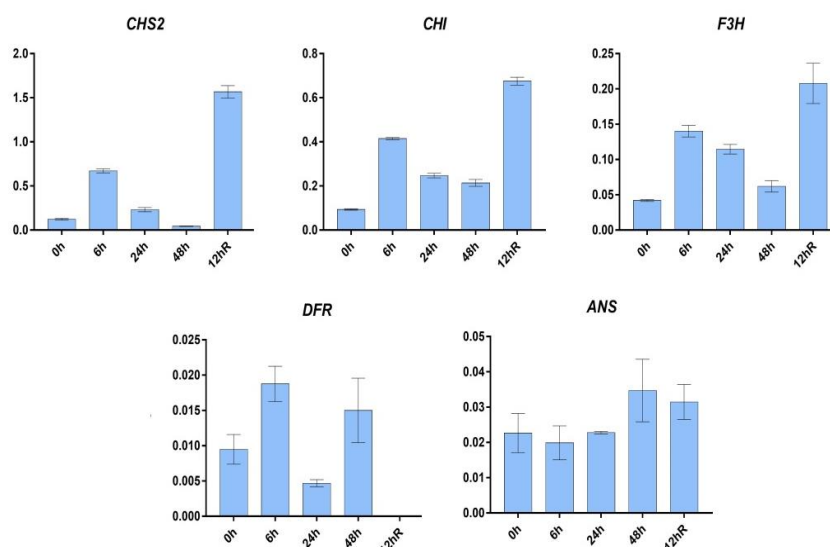


Рисунок 42 – Изменение транскрипции генов биосинтеза антоцианов в листьях сорта Леди Клэр в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C) (обозначения см. рис. 30).

В случае с фиолетоволиственными растениями Гибрида 1 отмечался гораздо более высокий уровень транскрипции всех анализируемых структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR* и *StANS*, до 7,5-100 раз превышающий таковой в зеленых листьях сорта Леди Клэр даже в отсутствии стресса. Это коррелировало с содержанием антоцианов в листьях, где содержание антоцианов у Гибрида 1 в 10 раз превосходило их количество в листьях сорта Леди Клэр (рис. 43).

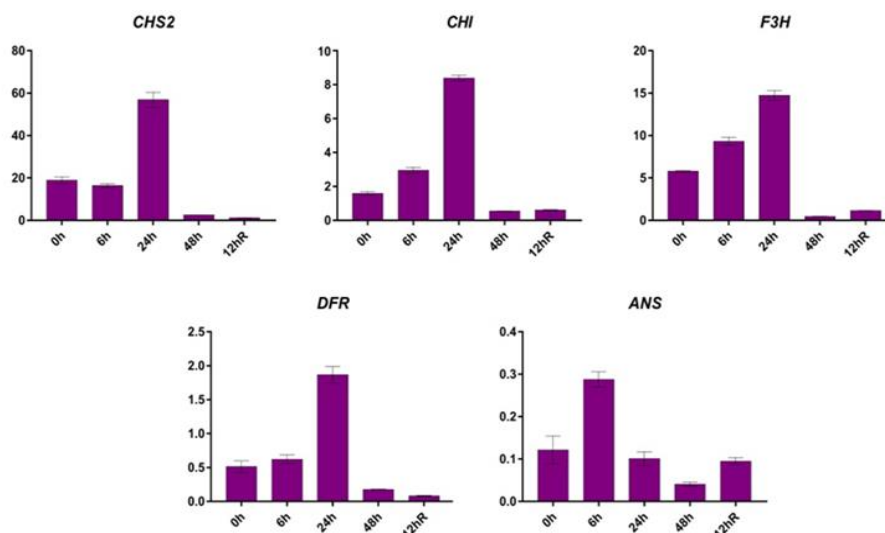


Рисунок 43 – Изменение транскрипции генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR* и *StANS* в листьях с антоциановой окраской Гибрида 1 в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C) (обозначения см. рис. 30).

Анализ экспрессии в богатых антоцианами листьях линии Гибрид 1 показал, что, так же как и в случае растений Леди Клэр, у всех анализируемых генов биосинтеза антоцианов показано увеличение транскрипции при холодовом стрессе. Причем, так же как и в листьях зеленолистного растения, паттерн экспрессии структурных генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* и *StDFR* у Гибрида 1 также сходен. Но, в отличие от растений Леди Клэр, где наблюдался быстрый ответ, то есть максимальное увеличение экспрессии через 6 часов стресса, в листьях Гибрида 1 максимальное (в 3 раза) увеличение экспрессии наблюдается через 24 часа (рис. 42 и 43).

Паттерны транскрипции гена *StANS* отличались временем ответа, и максимум мРНК был отмечен через 6 часов стресса.

Интересно, что через 48 часов стресса для всех структурных генов в листьях Гибрида 1 было детектировано резкое падение уровня транскрипции, которое не сопровождалось увеличением уровней мРНК в восстановительный период.

Также помимо структурных генов в анализ было взято два гена транскрипционных факторов *StHY5* и *StJAF13*, которые считаются активаторами биосинтеза антоцианов и для которых показано участие в ответе растений на действие различных абиотических стрессоров (Jin et al., 2022; Zhan et al., 2023) (рис. 44).

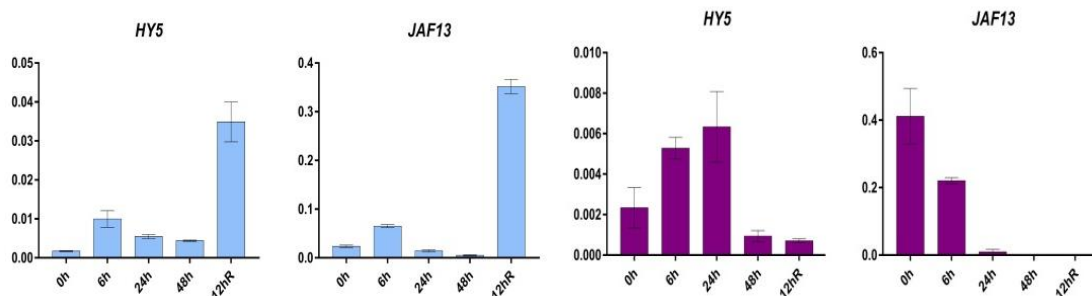


Рисунок 44 – Изменение экспрессии регуляторных генов *StHY5* и *StJAF13* биосинтеза антоцианов листьях сорта Леди Клэр (голубой график) и Гибрид 1 (фиолетовый график) в ответ на кратковременный холодовый стресс (+3°C) (обозначения см. рис. 30)

Кратковременный холодовый стресс в листьях растений с разным содержанием антоцианов приводил к изменению транскрипции регуляторных генов *StHY5* и *StJAF13*. При этом интересно, что транскрипция гена *StHY5* коррелировала с профилем экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов: у зеленолистного сорта Леди Клэр наблюдалось значительное повышение уровня транскрипции через 6 ч холодового стресса; которое сопровождалось резким снижением уровня транскрипции спустя 24 ч и 48 ч холодового стресса и увеличением транскрипции (11-22 раз) в восстановительный период. В случае Гибрида 1 повышение транскрипции было более

плавным и, как в случае структурных генов, достигало максимума через 12 часов стресса, далее с резким падением без повышения в период восстановления после стресса (рис. 44).

В случае ТФ *StJAF13* у зеленолистного растения при холодовом стрессе полностью повторяется паттерн структурных генов, в то время как у фиолетоволистного наблюдается уменьшение экспрессии после 6 часов стресса и резкое падение в остальных точках (рис. 44).

Антоцианы, являясь эффективными антиоксидантами, за счет своих гидроксильных групп поглощают АФК и нейтрализуют радикалы, поэтому обычно растения вырабатывают антоцианы для уменьшения окислительного повреждения, вызванного напрямую или косвенно низкотемпературным стрессом (Chinnusamy et al., 2007; Zhang et al., 2019). Поэтому выработка антоцианов положительно регулируется ТФ, которые активируют экспрессию генов биосинтеза антоцианов.

Ранее для ряда видов растений (виноград, яблоня, апельсин, кукуруза, табак, чай и др.) была показана связь индукции синтеза антоцианов при холодовом стрессе с повышением экспрессии структурных и регуляторных генов их биосинтеза (Mori et al., 2005; Crifò et al., 2012; Li et al., 2017). В случае картофеля мы также наблюдаем, вне зависимости от исходного уровня содержания антоцианов, увеличение синтеза антоцианов в листьях при низкотемпературном стрессе, как результат повышения транскрипции генов ТФ и регулируемых ими «ранних» и «поздних» генов биосинтеза антоцианов.

Таким образом, впервые для *S. tuberosum* проведен анализ транскрипции 7 генов, определяющий синтез антоцианов в листьях при холодовом стрессе; показано, что в листьях картофеля, вне зависимости от содержания в них антоциана, кратковременный холодовый стресс приводил к значительной активации транскрипции структурных (*StCHS*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*) и регуляторных (*StHY5*, *StGL3*) генов пути: через 6 часов (в случае зеленолистного растения) или через 24 часа (в случае фиолетоволистного растения) стресса – уровень транскриптов повысился в 2-5 раз и затем снижался.

В обоих случаях выявлена корреляция между содержанием антоцианов и паттернами экспрессии генов их биосинтеза при кратковременном холодовом стрессе.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе влияния кратковременного и длительного холодового стресса и процесса холодового осахаривания у сортов и гибридов картофеля, является важной научной и практической задачей. В связи с этим целью данной работы стала оценка функциональной активности генов углеводного метаболизма и генов вторичного метаболизма *S. tuberosum* в ответ на длительный и кратковременный низкотемпературный стресс.

Для определения генов, изменяющих экспрессию при длительном холодовом стрессе, был проведен транскрипционный анализ клубней картофеля сорта Леди Клэр, отобранных в трех временных точках: до помещения на +3°C (0 мес), через 3,5 месяцев (3,5 мес) и 6,5 месяцев (6,5 мес) хранения при +3°C. Секвенирование шести библиотек на платформе Illumina HiSeq 2500 и последующий биоинформационный анализ позволил идентифицировать 23 425 (0 мес), 22 601 (3,5 мес) и 22 576 (6,5 мес) генов, что охватывает 24 957 из 32 873 аннотированных генов картофеля. Примерно 500–600 генов были коэкспрессированы между парами стадий. Было выявлено, что в образцах 3,5 мес и 6,5 мес против 0 мес основные изменения в регуляции генов и метаболизма во время холодового хранения выражаются в активации ДЭГ, связанных с метаболическими путями, транскрипционным аппаратом, трансляцией, посттрансляционными модификациями, а также в понижающей регуляции ДЭГ, связанных с фотосинтетическими путями и вторичным метаболизмом. Обнаруженные изменения в экспрессии были количественно схожи для пар 3,5 мес vs. 0 мес и 6,5 мес vs. 0 мес, но в то же время были выше, чем для пар 6,5 мес vs. 3,5 мес, что может свидетельствовать о том, что наиболее существенные изменения транскрипционной активности происходят в клубнях в период первых 3,5 месяцев холодового хранения.

Помимо ожидаемых изменений в экспрессии генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз, инвертаз, крахмал- и сахарозосинтаз и других известных генов углеводного обмена, для ряда генов/семейств генов *S. tuberosum*, таких как гены транслокаторы семейства SWEET (*SWEET10*, 12, 15), глюкан эндо-1,3- $\beta$ -глюкозидаз 8, 13,  $\alpha$ - галактозидазы 3 (*AGAL3*), галактуронозил трансферазы 8 (*GAUT8*), фруктозо-1,6-бисфосфатазы (*FBPase*), фосфоглюканфосфатазы (*DSP4*) впервые было показано участие в ответе на холодовый стресс в клубнях. Следует отметить, что для некоторых этих генов, например, для генов *SWEET10*, 12, 15 вообще была неизвестна их функция у растений, а транскриптомный анализ не только показал их вовлеченность в холодовый ответ, но и то, что гены *SWEET12* и *SWEET15* картофеля индуцируются холодовым стрессом.

Так как каротиноиды и флавоноиды являются вторичными метаболитами, участвующие в антистрессорной защите растительных клеток, был проведен детальный анализ экспрессии генов их биосинтеза в условиях длительного холодового стресса.

Проведенный транскриптомный анализ выявил 14 ДЭГ, связанных с синтезом каротиноидов в динамике холодового хранения, для большинства которых было показано значительное уменьшение транскрипционной активности в клубнях уже через 3,5 месяцев холодового хранения. Также анализ транскриптомов выявил 29 ДЭГ, связанных с синтезом флавоноидов, которые можно разделить на две группы по профилю изменений экспрессии: одна включает 14 генов начала флавоноидного пути, для которых характерно резкое уменьшение уровней транскрипции уже через 3,5 мес холодового стресса, которое сохраняется до 6,5 мес, другая включает 11 генов, в том числе биосинтеза антоцианов, для которых показано увеличение экспрессии через 3,5 мес и/или 6,5 мес стресса.

Аналогичный эксперимент с длительным холодовым воздействием был проведен с использованием пяти сортов картофеля: Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние, Надежда, различающихся по срокам холодоустойчивости, содержанию крахмала в клубнях, содержанию каротиноидов и антоцианов. В условиях длительной (4 и 7 мес) холодовой инкубации (+3°C) в клубнях пяти сортов картофеля были определены паттерны экспрессии девяти генов углеводного обмена, *StGBSS*, *StSUS4*, *StAGPase*, *PAIN-1(StVinv)*, *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*, связанные с метаболизмом крахмала и для которых по транскриптомным и литературным данным показана связь с холодовым стрессом и/или устойчивостью к CIS. Для ряда генов наблюдались сортоспецифичные паттерны. Было показано сходство паттернов экспрессии для *StSUS4*, *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI*. У всех сортов наблюдались значительные изменения уровней экспрессии (повышения в случае *StSUS4*, *StGWD*, *StAmy23*, понижение в случае *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*) в клубнях после 7 месяцев холодового стресса, в сравнении с сентябрьским до закладки на +3°C. Паттерны экспрессии совпадали данными анализа транскриптома.

Для генов *StGWD*, *StAmy23*, *StBAM1*, *StBAM9*, *StAI* впервые показана корреляция (положительная и отрицательная) с изменением содержания крахмала и моносахаров (глюкоза, фруктоза) в динамике длительного холодового стресса.

Основываясь на транскриптомных данных, для более детального структурно-функционального анализа решено было сфокусироваться на генах ингибитора амилаз

*StAI*, гена  $\alpha$ -амилазы *StAmy23*, как значимых, но малоисследованных генах углеводного метаболизма, а также основных генах биосинтеза каротиноидов и антоцианов.

Впервые были получены (амплифицированы, клонированы, секвенированы) и охарактеризованы последовательности генов ингибиторов амилаз *AI* у образцов 12 видов клубнеобразующих дикорастущих и культивируемых видов картофеля различных серий секции *Petota*. Показан высокий меж- и внутривидовой уровень полиморфизма, выявлено 42 аллельных варианта гена *AI* и 36 вариантов белковых последовательностей. Был проведен анализ доменов и мотивов, а также сравнительное моделирование третичной (3D) структуры белка. Выявленное сходство доменов и мотивов *AI* белков и их третичной структуры у всех анализируемых видов указывает на функционально правильный белок; присутствие/отсутствие мотива 7 значительно не влияет на функциональность белка и не мешает формированию трансмембранной спирали. Сходство доменов и мотивов у клубнеобразующих видов картофеля, у неклубнеобразующего вида *S. etuberosum* и у видов томатов говорит о важности данного белка для углеводного обмена растений.

Впервые проведенный анализ последовательностей генов *AI* у 36 сортов и линий картофеля также выявил крайне высокий как нуклеотидный (21,3%), так и аминокислотный полиморфизм (33,0%). В результате исследования сортов было обнаружено 70 вариантов нуклеотидной последовательности и 69 вариантов аминокислотной последовательности.

У всех образцов взятых в анализ видов картофеля наиболее высокий уровень транскрипции был детектирован в клубнях. У сорта Надежда экспрессия *StAI* была выявлена во всех анализируемых органах, кроме стебля, с максимумом в клубне.

Впервые был охарактеризован профиль экспрессии гена  $\alpha$ -амилазы *StAmy23* в различных органах и тканях (лист, стебель, плод, стolon, корень и клубень (мякоть, кожура)) растений картофеля у трех сортов, различающихся содержанием крахмала в клубнях. Показано, что *StAmy23* транскрибируется во всех анализируемых органах и не характеризуется преимущественной экспрессией в клубнях: у всех трех сортов картофеля в вегетативных органах и в плодах, экспрессия *StAmy23* была в 1,5-2,7 раза выше, чем в клубнях (суммарно в кожуре и мякоти). Высокий уровень транскриптов *StAmy23* в фотосинтезирующих тканях растений картофеля свидетельствует об участии фермента в регуляции метаболизма крахмала не только в клубнях, но также и в других как вегетативных, так и генеративных органах для поддержания процессов роста растения, а также в формировании ответа на абиотические стрессы.

Проведенный корреляционный анализ между биохимическими и транскрипционными данными в клубнях позволил выявить положительную корреляцию между уровнем транскрипции *StAmy23* и содержанием крахмала, но не содержанием редуцирующих сахаров, что может говорить о том, что, по всей видимости, активность  $\alpha$ -амилазы Amy23 дополняется также активностью  $\beta$ -амилаз, а также другими ферментами метаболизма крахмала, прежде всего, ингибиторами амилаз и различных инвертаз.

Впервые получена и охарактеризована последовательность генов фитоинсинтазы *StPSY1* и *StPSY2* у пяти сортов картофеля, отличающихся содержанием каротиноидов в клубне, и определена их вариабельность. Межсортовой полиморфизм экзонов обоих генов оказался крайне низким: было выявлено 9 (*StPSY1*) и 14 (*StPSY2*) SNPs, большинство из которых было локализовано в первых экзонах.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фитоинсинтаз картофеля подтверждают данные о возможном возникновении PSY1 и PSY2 в результате дупликации гена-предшественника с возможной последующей функциональной диверсификацией.

Впервые был проведен анализ транскрипции генов фитоинсинтаз при кратковременном холодовом стрессе (+3°C, 48 часов) в листьях сорта Леди Клэр. Показано, что в ответ на кратковременный холодовый стресс содержание каротиноидов существенно не меняется. При этом показана активация экспрессии всех трех генов PSY в листьях картофеля. Впервые была выявлена мРНК гена *StPSY3* в тканях листа картофеля, так как ранее считалось, что этот ген транскрибируется только в корнях. Экспрессия всех трех генов *StPSY* усиливается при воздействии холода, но в разной степени: *StPSY1* – в значительно большей, чем *StPSY2* и *StPSY3*, при этом ген *StPSY1* отвечает за «быстрый» ответ на действие стрессового фактора (6 ч стресса), а *StPSY2* – за более «поздний» ответ при продолжающемся воздействии стресса (24 ч). И в результате такое тандемное изменение уровней транскрипции может привести к активному синтезу фитоина – предшественника всех каротиноидов, и, как результат, защите клеток от стрессового воздействия. Выявленный впервые паттерн экспрессии *StPSY3* не повторял профили транскрипции двух других генов фитоинсинтаз и достаточно сильно изменялся при стрессовом воздействии.

Также впервые был проведен анализ транскрипции генов фитоинсинтаз и других 13 генов, охватывающих весь путь биосинтеза каротиноидов, при длительном (+3°C, 7 месяцев) холодовом стрессе в клубнях пяти сортов картофеля, различающихся

содержанием каротиноидов в клубнях. Все сорта характеризовались снижением экспрессии генов, отвечающих за синтез и распад каротиноидов (за исключением отдельных случаев), через 4 и 7 месяцев хранения клубней при низких температурах. Динамика общего содержания этих пигментов при длительном холодовом воздействии зависит от генетических особенностей сорта, что подчеркивает роль генотипа в устойчивости к внешним условиям. За исключением положительной корреляции средней силы для гена *StPDS*, зависимости между уровнями транскрипции отдельных генов и суммарным содержанием каротиноидов выявлено не было.

Также впервые для *S. tuberosum* проведен анализ транскрипции семи генов, определяющий синтез антоцианов при кратковременном (48 часов, +3°C) холодовом стрессе в листьях двух сортов, отличающихся содержанием антоцианов и показано, что в листьях картофеля кратковременный холодовый стресс приводил к значительной активации транскрипции структурных и регуляторных генов биосинтеза антоцианов: через 6 часов (в случае зеленолистного растения) или через 24 часа (в случае фиолетоволистного растения) стресса, уровень транскриптов повысился в 2-5 раз. В обоих случаях выявлена корреляция между содержанием антоцианов и паттернами экспрессии генов их биосинтеза при кратковременном холодовом стрессе.

Содержание антоцианов в фиолетовоокрашенных клубнях сорта Северное сияние в динамике *длительного холодового стресса* (+3°C, 7 месяцев) в клубнях через 4-7 месяцев холодовой инкубации сократилось на треть, при этом экспрессия генов биосинтеза антоцианов *StCHS2* и *StDFR* резко падала (в 6 раз) после 4 месяцев инкубации клубней при +3°C, доходя до следовых количеств после 7 месяцев стресса.

Таким образом, в данной диссертационной работе проведена оценка функциональной активности генов углеводного вторичного метаболизма в клубнях и листьях сортов и гибридов картофеля в ответ на длительный и кратковременный низкотемпературный стресс, что может способствовать лучшему пониманию молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе стрессоустойчивости и процесса холодового осахаривания у растений *S. tuberosum*.

Кратко полученные результаты можно сформулировать в виде следующих **ВЫВОДОВ:**

1. Проведен анализ транскриптомов клубней картофеля в процессе 6,5 месяцев холодового хранения (3°C). Наиболее существенные изменения транскрипционной активности обнаружены в период первых 3,5 месяцев. Определены дифференциально экспрессирующиеся гены, транскрипция которых изменилась

более чем в два раза, связанные с углеводным обменом (37 ДЭГ) и биосинтезом каротиноидов (14 ДЭГ) и антоцианов (29 ДЭГ). Для ряда генов углеводного обмена (SWEET-унипортеров (*SWEET 10*, *12* и *15*), глюкан эндо-1,3-β-глюкозидаз 8 и 13, α-галактозидазы 3 (*AGAL3*), галактуринозил трансферазы 8 (*GAUT8*), фруктозо-1,6-бифосфатазы (*FBPase*), фосфоглюканфосфатазы (*DSP4*)) впервые показано участие в ответе на холододовый стресс в клубнях картофеля. Гены *StSWEET 12* и *StSWEET 15* картофеля индуцируются холододовым стрессом.

2. В ответ на длительный холододовый стресс в клубнях пяти сортов картофеля показаны значительные изменения экспрессии генов углеводного метаболизма: повышение (*StSUS4*, *StGWD*, *StAmy23*) или понижение (*StBAM1*, *StBAM9*, *StAI*) в сравнении с предстрессовым уровнем; выявлена корреляция с изменением содержания крахмала и редуцирующих сахаров. Различия паттерна экспрессии данных генов в клубнях различных сортов картофеля могут свидетельствовать о генотип-зависимой регуляции ответа на длительный холододовый стресс.
3. Идентифицирована (амплифицирована, клонирована, секвенирована) и охарактеризована последовательность гена ингибитора амилаз AI у образцов 12 дикорастущих видов и 36 сортов *S. tuberosum*. Показана высокая межвидовая вариабельность гена, а также крайне высокий полиморфизм, как нуклеотидный (21,3%), так и аминокислотный (33,0%) у сортов.
4. В ответ на длительный холододовый стресс в клубнях пяти сортов картофеля показано уменьшение содержания общих каротиноидов с характерным резким снижением через 4 месяца стресса. Изменения содержания антоцианов не имели общего паттерна и были сортоспецифичны.
5. Идентифицированы и охарактеризованы последовательности генов фитоинсинтаз *StPSY1*, *StPSY2* и *StPSY3*. Показана активация экспрессии всех трех генов в листьях картофеля в ответ на кратковременный холододовый стресс (3°C, 48 ч). При этом *StPSY2* участвует в быстром ответе на стрессор (6 ч), *StPSY1* реагирует позднее (24 ч), тогда как *StPSY3* вовлечен и в ранний (6 ч), и наиболее поздний (48 ч) ответы на стресс.
6. Анализ экспрессии 16 генов биосинтеза каротиноидов в клубнях пяти сортов картофеля в динамике длительного холододового хранения выявил общую для всех сортов тенденцию к резкому снижению уровня транскриптов генов в период первых 4 месяцев стресса, что коррелировало с изменением содержания каротиноидов.

7. Анализ экспрессии 7 генов биосинтеза антоцианов у сортов картофеля с разным содержанием антоцианов в листьях при кратковременном холодовом стрессе (+3°C, 48 ч) показал значительную активацию транскрипции структурных (*StCHS*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*) и регуляторных (*StHY5*, *StJAF13*) генов пути: через 6 ч (зеленолистное растение) или 24 ч (фиолетоволистное растение) стресса уровень транскриптов повысился в 2-5 раз.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гавриленко Т. А., Ермишин А. П. Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – №. 1. – С. 16-29.
2. Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Мелешин А.А., Кочиева Е.З. Аллельная вариабельность гена ингибитора амилаз AI у сортов и линий картофеля // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – №. 5. – С. 970-977.
3. Егорова А.А., Сабоиев И.А., Костина Н.Е. и др. Генотип-специфические особенности регуляции процесса холодового осахаривания клубней картофеля //Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57. – №. 2. – С. 197-208.
4. Зейрук В. Н., Белов Г.Л., Мальцев С.В., и др. Защита картофеля при хранении //Картофель и овощи. – 2019. – Т. 4. – С. 33-34.
5. Сергеева Е. М., Ларичев К. Т., Салина Е. А., и др. Метаболизм крахмала у картофеля *Solanum tuberosum* L. //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – №. 3. – С. 250-263.
6. Слугина М. А., Филюшин М. А., Мелешин А. А., и др. Различия в экспрессии гена ингибитора амилаз SbAI при длительном низкотемпературном хранении клубней и кратковременном холодовом стрессе у картофеля //Генетика. – 2020. – Т. 56. – №. 3. – С. 361-365.
7. Слугина М.А., Шмелькова Е.О., Мелешин А.А., Кочиева Е.З. Аллельный полиморфизм фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов и линий картофеля *Solanum tuberosum* L. //Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – №. 1. – С. 132-139.
8. Филюшин, М. А., Джос, Е. А., Щенникова, А. В., Кочиева, Е. З. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов //Физиология растений. – 2020. – Т. 67. – №. 6. – С. 644-653.
9. Abe J., Sidenius U., Svensson B. Arginine is essential for the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds //Biochemical Journal. – 1993. – Т. 293. – №. 1. – С. 151-155.
10. Adegbaju M. S., Morenikeji O. B., Borrego E. J., et al. Differential Evolution of  $\alpha$ -Glucan Water Dikinase (GWD) in Plants //Plants. – 2020. – Т. 9. – №. 9. – С. 1101.
11. Agarwal S. A., Chakrabarti S. K., Shikha Misra S. M., et al. A biotechnological approach for reduction of cold-induced sweetening in potato tubers //Potato J. – 2003. – Т. 30. – С. 39-40.



12. Ahmad D., Ying Y., Bao J. Understanding starch biosynthesis in potatoes for metabolic engineering to improve starch quality: A detailed review //Carbohydrate Polymers. – 2024. – C. 122592.
13. Ahmed S., Ru W., Han H., et al. Fine molecular structure and its effects on physicochemical properties of starches in potatoes grown in two locations //Food Hydrocolloids. – 2019. – T. 97. – C. 105172.
14. Ahmed, N. U., Park, J. I., Jung, H. J., et al. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa* //Functional & integrative genomics. – 2015. – T. 15. – C. 383-394.
15. Ahmed, N. U., Park, J. I., Jung, H. J., et al. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes and their association with cold and freezing stress in *Brassica rapa* //Gene. – 2014. – T. 550. – №. 1. – C. 46-55.
16. Ahrazem O., Diretto G., Argandoña Picazo J., et al. The specialized roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron //Frontiers in Plant Science. – 2019. – T. 10. – C. 249.
17. Altenbach S. B., Vensel W. H., Dupont F. M. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86 //BMC research notes. – 2011. – T. 4. – C. 1-12.
18. Andersson M., Turesson H., Arrivault S., et al. Inhibition of plastid PPase and NTT leads to major changes in starch and tuber formation in potato //Journal of experimental botany. – 2018. – T. 69. – №. 8. – C. 1913-1924.
19. Arango, J., Jourdan, M., Geoffriau, E., et al. Carotene hydroxylase activity determines the levels of both  $\alpha$ -carotene and total carotenoids in orange carrots //The Plant Cell. – 2014. – T. 26. – №. 5. – C. 2223-2233.
20. Bagnaresi P., Moschella A., Beretta O., et al. Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening //Bmc Genomics. – 2008. – T. 9. – C. 1-23.
21. Bahaji A., Li J., Sánchez-López Á. M., et al. Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields //Biotechnology Advances. – 2014. – T. 32. – №. 1. – C. 87-106.
22. Baldwin S. J., Dodds K. G., Auvray B., et al. Association mapping of cold-induced sweetening in potato using historical phenotypic data //Annals of Applied Biology. – 2011. – T. 158. – №. 3. – C. 248-256.

23. Ball S. G., Morell M. K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule //Annual review of plant biology. – 2003. – T. 54. – №. 1. – C. 207-233.
24. Ballicora M. A., Dubay J. R., Devillers C. H., Preiss J. Resurrecting the Ancestral Enzymatic Role of a Modulatory Subunit //Journal of Biological Chemistry. – 2005. – T. 280. – №. 11. – C. 10189-10195.
25. Ballicora M. A., Iglesias A. A., Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis //Photosynthesis research. – 2004. – T. 79. – C. 1-24.
26. Barbosa A. E., Albuquerque É. V., Silva M. C., et al.  $\alpha$ -Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits  $\alpha$ -amylases from the coffee berry borer pest //BMC biotechnology. – 2010. – T. 10. – C. 1-8.
27. Batailler B., Lemaitre T., Vilaine F., et al. Soluble and filamentous proteins in Arabidopsis sieve elements //Plant, cell & environment. – 2012. – T. 35. – №. 7. – C. 1258-1273.
28. Batra R., Saripalli G., Mohan A., et al. Comparative analysis of AGPase genes and encoded proteins in eight monocots and three dicots with emphasis on wheat //Frontiers in Plant Science. – 2017. – T. 8. – C. 19.
29. Baunsgaard L., Lütken H., Mikkelsen R., et al. A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated  $\alpha$ -glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis* //The Plant Journal. – 2005. – T. 41. – №. 4. – C. 595-605.
30. Beckles D. M., Smith A. M., ap Rees T. A cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs //Plant Physiology. – 2001. – T. 125. – №. 2. – C. 818-827.
31. Benkeblia N., Alexopoulos A. A., Passam H. C. Physiological and biochemical regulation of dormancy and sprouting in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) //Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. – 2008. – T. 2. – №. 1. – C. 54-68.
32. Bertoft E. Understanding starch structure: Recent progress //Agronomy. – 2017. – T. 7. – №. 3. – C. 56.
33. Bertoft E., Blennow A. Structure of potato starch //Advances in potato chemistry and technology. – Academic Press, 2016. – C. 57-73.
34. Bhaskar P. B., Wu L., Busse J. S., et al. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato //Plant physiology. – 2010. – T. 154. – №. 2. – C. 939-948.

35. Blenkinsop R. W., Copp L. J., Yada R. Y., Marangoni A. G. A proposed role for the anaerobic pathway during low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum* // *Physiologia plantarum*. – 2003. – T. 118. – №. 2. – C. 206-212.
36. Brummell D. A., Chen R. K., Harris J. C., et al. Induction of vacuolar invertase inhibitor mRNA in potato tubers contributes to cold-induced sweetening resistance and includes spliced hybrid mRNA variants // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – T. 62. – №. 10. – C. 3519-3534.
37. Bulgakov, V. P., Fialko, A. V., Yugay, Y. A. Involvement of epigenetic factors in flavonoid accumulation during plant cold adaptation // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2024. – C. 109096.
38. Burke R. The examination of potato starch granules under the microscope. – 2023.
39. Bustos R., Fahy B., Hylton C. M., et al. Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – T. 101. – №. 7. – C. 2215-2220.
40. Cai, D., Rodríguez, F., Teng, Y., et al. Single copy nuclear gene analysis of polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*) // *BMC evolutionary biology*. – 2012. – T. 12. – C. 1-16.
41. Carpenter M.A., Joyce N.I., Genet R.A., et al. Starch phosphorylation in potato tubers is influenced by allelic variation in the genes encoding glucan water dikinase, starch branching enzymes I and II, and starch synthase III // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – T. 6. – C. 143.
42. Castellanos J. F., Khan A., Fettke J. Gradual Analytics of Starch-Interacting Proteins Revealed the Involvement of Starch-Phosphorylating Enzymes during Synthesis of Storage Starch in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers // *Molecules*. – 2023. – T. 28. – №. 17. – C. 6219.
43. Cenci U., Nitschke F., Steup M., et al. Transition from glycogen to starch metabolism in Archaeplastida // *Trends in plant science*. – 2014. – T. 19. – №. 1. – C. 18-28.
44. Chandler J. W., Apel K., Melzer S. A novel putative  $\beta$ -amylase gene and AT $\beta$ -Amy from *Arabidopsis thaliana* are circadian regulated // *Plant Science*. – 2001. – T. 161. – №. 5. – C. 1019-1024.
45. Chen X., Salamini F., Gebhardt C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2001. – T. 102. – C. 284-295.

46. Chen X., Song B., Liu J., et al. Modulation of gene expression in cold-induced sweetening resistant potato species *Solanum berthaultii* exposed to low temperature //Molecular Genetics and Genomics. – 2012. – T. 287. – C. 411-421.
47. Chen Y., Sun X., Zhou X., et al. Highly phosphorylated functionalized rice starch produced by transgenic rice expressing the potato GWD1 gene //Scientific Reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 3339.
48. Chi Z., Xie CongHua X., BoTao S., et al. RNAi effects on regulation of endogenous acid invertase activity in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers //Chinese Journal of Agricultural Biotechnology. – 2008. – T. 5. – №. 2. – C. 107-112.
49. Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., et al. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night //The Plant Journal. – 2004. – T. 37. – №. 6. – C. 853-863.
50. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants //Trends in plant science. – 2007. – T. 12. – №. 10. – C. 444-451.
51. Cho Y. G., Kang K. K. Functional analysis of starch metabolism in plants //Plants. – 2020. – T. 9. – №. 9. – C. 1152.
52. Clasen B. M., Stoddard T. J., Luo S., et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout //Plant biotechnology journal. – 2016. – T. 14. – №. 1. – C. 169-176.
53. Compart J., Apriyanto A., Fettke J. Glucan, water dikinase (GWD) penetrates the starch granule surface and introduces C6 phosphate in the vicinity of branching points //Carbohydrate Polymers. – 2023. – T. 321. – C. 121321.
54. Copp L. J., Blenkinsop R. W., Yada R. Y., Marangoni A. G. The relationship between respiration and chip color during long-term storage of potato tubers //American journal of potato research. – 2000. – T. 77. – C. 279-287.
55. Crifò, T., Petrone, G., Lo Cicero, L., Lo Piero, A. R. Short cold storage enhances the anthocyanin contents and level of transcripts related to their biosynthesis in blood oranges //Journal of agricultural and food chemistry. – 2012. – T. 60. – №. 1. – C. 476-481.
56. Cui, G., Zhou, T., Liu, Z. et al. Deciphering the regulatory mechanisms of potato cold-induced sweetening via integrated time-course transcriptome and metabolome analysis //Frontiers in Plant Science. – 2025. – T. 16. – C. 1551265.

57. D'Amelia, V., Villano, C., Batelli, G., et al. Genetic and epigenetic dynamics affecting anthocyanin biosynthesis in potato cell culture //Plant Science. – 2020. – T. 298. – C. 110597.
58. D'Amelia, V., Aversano, R., Ruggiero, A., et al. Subfunctionalization of duplicate MYB genes in *Solanum commersonii* generated the cold-induced ScAN2 and the anthocyanin regulator ScAN1 //Plant, cell & environment. – 2018. – T. 41. – №. 5. – C. 1038-1051.
59. Datir S. S. Invertase inhibitors in potato: towards a biochemical and molecular understanding of cold-induced sweetening //Critical reviews in food science and nutrition. – 2021. – T. 61. – №. 22. – C. 3804-3818.
60. de Pater S., Caspers M., Kottenhagen M., et al. Manipulation of starch granule size distribution in potato tubers by modulation of plastid division //Plant Biotechnology Journal. – 2006. – T. 4. – №. 1. – C. 123-134.
61. Derde L. J., Gomand S. V., Courtin C. M., Delcour J. A. Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable  $\beta$ -amylase, maltotetraogenic and maltogenic  $\alpha$ -amylases //Food chemistry. – 2012. – T. 135. – №. 2. – C. 713-721.
62. Dharshini, S., Chakravarthi, M., Manoj, V. M. et al. De novo sequencing and transcriptome analysis of a low temperature tolerant *Saccharum spontaneum* clone IND 00-1037 //Journal of biotechnology. – 2016. – T. 231. – C. 280-294.
63. Diaz-Baca J. A., Fatehi P. Production and characterization of starch-lignin based materials: A review //Biotechnology Advances. – 2024. – T. 70. – C. 108281.
64. Ding L., Liang W., Qu J., et al. Effects of natural starch-phosphate monoester content on the multi-scale structures of potato starches //Carbohydrate Polymers. – 2023. – T. 310. – C. 120740.
65. Douches D. S., Freyre R. Identification of genetic factors influencing chip color in diploid potato (*Solanum* spp.) //American Potato Journal. – 1994. – T. 71. – C. 581-590.
66. Doyle E. A., Lane A. M., Sides J. M., et al. An  $\alpha$ -amylase (At4g25000) in Arabidopsis leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress //Plant, cell & environment. – 2007. – T. 30. – №. 4. – C. 388-398.
67. Draffehn, A. M., Meller, S., Li, L., Gebhardt, C. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases //BMC Plant Biology. – 2010. – T. 10. – C. 1-15.
68. Duan D., Thalmann M., Sparla F., et al. *Arabidopsis thaliana* AMY3 is a unique redox-regulated chloroplastic  $\alpha$ -amylase //Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 288. – №. 47. – C. 33620-33633.

69. Duan Y., Jin L. Genome-Wide Identification and Expression Profiling of the  $\alpha$ -Amylase (AMY) Gene Family in Potato //Genes. – 2024. – T. 15. – №. 6. – C. 793.
70. Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2003. – T. 83. – №. 5. – C. 369-382.
71. Edner C., Li J., Albrecht T., et al. Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial  $\beta$ -amylases //Plant physiology. – 2007. – T. 145. – №. 1. – C. 17-28.
72. Efremov, G. I., Slugina, M. A., Shchennikova, A. V., Kochieva, E. Z. Differential regulation of phytoene synthase *PSY1* during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) //Plants. – 2020. – T. 9. – №. 9. – C. 1169.
73. Evers T., Millar S. Cereal grain structure and development: some implications for quality //Journal of cereal science. – 2002. – T. 36. – №. 3. – C. 261-284.
74. Eyers P. A., Murphy J. M. The evolving world of pseudoenzymes: proteins, prejudice and zombies //BMC biology. – 2016. – T. 14. – C. 1-6.
75. Fan Z. Q., Ba L. J., Shan W., et al. A banana R2R3-MYB transcription factor MaMYB3 is involved in fruit ripening through modulation of starch degradation by repressing starch degradation-related genes and MaBHLH6 //The Plant Journal. – 2018. – T. 96. – №. 6. – C. 1191-1205.
76. Ferreira S. J. Transcriptome based analysis of starch metabolism in *Solanum tuberosum*. – Friedrich-Alexander-Universitaet Erlangen-Nuernberg (Germany), 2012.
77. Fettke J., Leifels L., Brust H. Two carbon fluxes to reserve starch in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber cells are closely interconnected but differently modulated by temperature //Journal of experimental botany. – 2012. – T. 63. – №. 8. – C. 3011-3029.
78. Figueroa C. M., Asencion Diez M. D., Ballicora M. A., Iglesias A. A. Structure, function, and evolution of plant ADP-glucose pyrophosphorylase //Plant Molecular Biology. – 2022. – T. 108. – №. 4. – C. 307-323.
79. Fogelman, E., Oren-Shamir, M., Hirschberg, J., et al. Nutritional value of potato (*Solanum tuberosum*) in hot climates: anthocyanins, carotenoids, and steroidal glycoalkaloids //Planta. – 2019. – T. 249. – C. 1143-1155.
80. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Grossi-de-Sá M. F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: Structure, function and potential for crop protection //European journal of biochemistry. – 2002. – T. 269. – №. 2. – C. 397-412.

81. Fukumoto L.R., Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds //Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds //Journal of agricultural and food chemistry. – 2000. – T. 48. – №. 8. – C. 3597-3604.
82. Fulton D. C., Stettler M., Mettler T., et al.  $\beta$ -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active  $\beta$ -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts //The Plant Cell. – 2008. – T. 20. – №. 4. – C. 1040-1058.
83. Gavrilenko T. Application of molecular cytogenetics in fundamental and applied research of potato //Genetics, genomics and breeding of potato. Science Publishers, Enfield. – 2011. – C. 184-206.
84. George G. M., van der Merwe M. J., Nunes-Nesi A., et al. Virus-induced gene silencing of plastidial soluble inorganic pyrophosphatase impairs essential leaf anabolic pathways and reduces drought stress tolerance in *Nicotiana benthamiana* //Plant physiology. – 2010. – T. 154. – №. 1. – C. 55-66.
85. Giorio G., Stigliani A. L., D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)—new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns //The FEBS Journal. – 2008. – T. 275. – №. 3. – C. 527-535.
86. Glaring M. A., Baumann M. J., Hachem M. A., et al. Starch-binding domains in the CBM45 family—low-affinity domains from glucan, water dikinase and  $\alpha$ -amylase involved in plastidial starch metabolism //The FEBS Journal. – 2011. – T. 278. – №. 7. – C. 1175-1185.
87. Gong X., Westcott S., Zhang X. Q., et al. Discovery of novel Bmy1 alleles increasing  $\beta$ -amylase activity in Chinese landraces and Tibetan wild barley for improvement of malting quality via MAS //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 9. – C. e72875.
88. Greiner S., Rausch T., Sonnewald U., Herbers K. Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers //Nature biotechnology. – 1999. – T. 17. – №. 7. – C. 708-711.
89. Hajhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, et al. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana* //Frontiers in plant science. – 2018. – T. 9. – C. 1430.
90. Hardigan M. A., Bamberg J., Buell C. R., Douches D. S. Taxonomy and genetic differentiation among wild and cultivated germplasm of *Solanum* sect. *Petota* //The Plant Genome. – 2015. – T. 8. – №. 1. – C. plantgenome2014.06.0025.
91. Hawkes J. G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. – 1990. – C. viii+259 pp.

92. Hill L. M., Reimholz R., Schröder R., et al. The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase //Plant, Cell & Environment. – 1996. – T. 19. – №. 11. – C. 1223-1237.
93. Hirose T., Aoki N., Harada Y., et al. Disruption of a rice gene for  $\alpha$ -glucan water dikinase, OsGWD1, leads to hyperaccumulation of starch in leaves but exhibits limited effects on growth //Frontiers in Plant Science. – 2013. – T. 4. – C. 147.
94. Höcker B., Beismann-Driemeyer S., Hettwer S., et al. Dissection of a ( $\beta\alpha$ ) 8-barrel enzyme into two folded halves //Nature structural biology. – 2001. – T. 8. – №. 1. – C. 32-36.
95. Hoover R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review //Carbohydrate polymers. – 2001. – T. 45. – №. 3. – C. 253-267.
96. Horrer D., Flütsch S., Pazmino D., et al. Blue light induces a distinct starch degradation pathway in guard cells for stomatal opening //Current Biology. – 2016. – T. 26. – №. 3. – C. 362-370.
97. Hou J., Liu T., Reid S., et al. Silencing of  $\alpha$ -amylase StAmy23 in potato tuber leads to delayed sprouting //Plant Physiology and Biochemistry. – 2019. – T. 139. – C. 411-418.
98. Hou J., Zhang H., Liu J., et al. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways //Journal of Experimental Botany. – 2017. – T. 68. – №. 9. – C. 2317-2331.
99. Howitt C. A., Pogson B. J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues //Plant, cell & environment. – 2006. – T. 29. – №. 3. – C. 435-445.
100. Huang N., Stebbins G. L., Rodriguez R. L. Classification and evolution of alpha-amylase genes in plants //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – T. 89. – №. 16. – C. 7526-7530.
101. Huang N., Sutliff T. D., Litts J. C., Rodriguez R. L. Classification and characterization of the rice  $\alpha$ -amylase multigene family //Plant Molecular Biology. – 1990. – T. 14. – C. 655-668.
102. Huang, B., Ruess, H., Liang, Q., et al. Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of Solanum section Petota //Scientific reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 4454.



103. Hussain H., Mant A., Seale R., et al. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans //The Plant Cell. – 2003. – T. 15. – №. 1. – C. 133-149.
104. Hwang S. J., Chun J. H., Kim S. J. Effect of cold stress on carotenoids in kale leaves (*Brassica oleracea*) //Korean Journal of Environmental Agriculture. – 2017. – T. 36. – №. 2. – C. 106-112.
105. Hwang S. K., Salamone P. R., Okita T. W. Allosteric regulation of the higher plant ADP-glucose pyrophosphorylase is a product of synergy between the two subunits //FEBS letters. – 2005. – T. 579. – №. 5. – C. 983-990.
106. Iulek J., Franco O. L., Silva M., et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye) //The international journal of biochemistry & cell biology. – 2000. – T. 32. – №. 11-12. – C. 1195-1204.
107. Jacobsen J. V., Hanson A. D., Chandler P. C. Water stress enhances expression of an  $\alpha$ -amylase gene in barley leaves //Plant Physiology. – 1986. – T. 80. – №. 2. – C. 350-359.
108. Jansky S. H., Fajardo D. A. Tuber starch amylose content is associated with cold-induced sweetening in potato //Food Science & Nutrition. – 2014. – T. 2. – №. 6. – C. 628-633.
109. Jeon J. S., Ryoo N., Hahn T. R. Starch biosynthesis in cereal endosperm //Plant physiology and Biochemistry. – 2010. – T. 48. – №. 6. – C. 383-392.
110. Jin X., Ballicora M. A., Preiss J., Geiger J. H. Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase //The EMBO journal. – 2005. – T. 24. – №. 4. – C. 694-704.
111. Jin, J., Sun, W., Wu, J., et al. Hypocotyl elongation based on HY5 transcription factor in cold resistant winter rapeseed (*Brassica napus* L.) //Oil Crop Science. – 2022. – T. 7. – №. 1. – C. 40-52.
112. Ju L., Pan Z., Zhang H., et al. New insights into the origin and evolution of  $\alpha$ -amylase genes in green plants //Scientific reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 4929.
113. Kamon M., Sumitani J.I., Tani S., Kawaguchi T. Characterization and gene cloning of a maltotriose-forming exo-amylase from *Kitasatospora* sp. MK-1785 //Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – T. 99. – C. 4743-4753.
114. Kang Y. N., Adachi M., Utsumi S., Mikami B. The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean  $\beta$ -amylase //Journal of molecular biology. – 2004. – T. 339. – №. 5. – C. 1129-1140.

115. Kaplan F., Guy C. L.  $\beta$ -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock //Plant physiology. – 2004. – T. 135. – №. 3. – C. 1674-1684.
116. Kaplan F., Sung D. Y., Guy C. L. Roles of  $\beta$ -amylase and starch breakdown during temperatures stress //Physiologia Plantarum. – 2006. – T. 126. – №. 1. – C. 120-128.
117. Kasar S. S., Maheshwari V. L., Pawar P. K. Bioactive  $\alpha$ -amylase inhibitors: Sources, mechanism of action, biochemical characterization, and applications //Natural Products as Enzyme Inhibitors: An Industrial Perspective. – 2022. – C. 59-104.
118. Kashtoh H., Baek K. H. New insights into the latest advancement in  $\alpha$ -amylase inhibitors of plant origin with anti-diabetic effects //Plants. – 2023. – T. 12. – №. 16. – C. 2944.
119. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis //Nature protocols. – 2015. – T. 10. – №. 6. – C. 845-858.
120. Kitajima A., Asatsuma S., Okada H., et al. The rice  $\alpha$ -amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory pathway to the plastids //The Plant Cell. – 2009. – T. 21. – №. 9. – C. 2844-2858.
121. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development //Current opinion in plant biology. – 2004. – T. 7. – №. 3. – C. 235-246.
122. Koide T., Ohnishi Y., Horinouchi S. Characterization of recombinant  $\beta$ -amylases from *Oryza sativa* //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2011. – T. 75. – №. 4. – C. 793-796.
123. Kotting O., Santelia D., Edner C., et al. STARCH-EXCESS4 is a laforin-like phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana* //The Plant Cell. – 2009. – T. 21. – №. 1. – C. 334-346.
124. Kozlov S. S., Blennow A., Krivandin A. V., Yuryev V. P. Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines //International journal of biological macromolecules. – 2007. – T. 40. – №. 5. – C. 449-460.
125. Krause K. P., Hill L., Reimholz R., et al. Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase //Plant, Cell & Environment. – 1998. – T. 21. – №. 3. – C. 285-299.
126. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets //Molecular biology and evolution. – 2016. – T. 33. – №. 7. – C. 1870-1874.

127. Kumari B., Sharma P., Nath A. K.  $\alpha$ -Amylase inhibitor in local Himalyan collections of Colocasia: isolation, purification, characterization and selectivity towards  $\alpha$ -amylases from various sources //Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2012. – T. 103. – №. 1. – C. 49-55.
128. Lafiandra D., Riccardi G., Shewry P. R. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health //Journal of cereal science. – 2014. – T. 59. – №. 3. – C. 312-326.
129. Lay F. T., Anderson M. A. Defensins-components of the innate immune system in plants //Current protein and peptide science. – 2005. – T. 6. – №. 1. – C. 85-101.
130. Li F., Vallabhaneni R., Wurtzel E. T. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis //Plant Physiology. – 2008. – T. 146. – №. 3. – C. 1333-1345.
131. Li H., Brouwer M., Pup E. D., et al. Allelic variation in the autotetrAGPaseLoid potato: genes involved in starch and steroidal glycoalkaloid metabolism as a case study //BMC genomics. – 2024. – T. 25. – №. 1. – C. 274.
132. Li J., Francisco P., Zhou W., et al. Catalytically-inactive  $\beta$ -amylase BAM4 required for starch breakdown in Arabidopsis leaves is a starch-binding-protein //Archives of biochemistry and biophysics. – 2009. – T. 489. – №. 1-2. – C. 92-98.
133. Li J.W., Zhou P., Deng Y.J. et al. Overexpressing CsPSY1 Gene of Tea Plant, Encoding a Phytoene Synthase, Improves  $\alpha$ -Carotene and  $\beta$ -Carotene Contents in Carrot //Molecular Biotechnology. — 2023. — C. 1—12.
134. Li X., Ahmad A. M., Zhong Y., et al. Starch phosphorylation regulates starch granule morphological homogeneity in *Arabidopsis thaliana* //Plant Physiology. – 2024. – T. 194. – №. 4. – C. 2600-2615.
135. Li, L., Ban, Z. J., Li, X. H., et al. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes and transcription factor PcMYB10 in pears (*Pyrus communis* L.). – 2012.
136. Li, N., Yang, Y., Ye, J., et al. Effects of sunlight on gene expression and chemical composition of light-sensitive albino tea plant //Plant growth regulation. – 2016. – T. 78. – C. 253-262.
137. Li, P., Li, Y. J., Zhang, F. J., et al. The *Arabidopsis* UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation //The Plant Journal. – 2017. – T. 89. – №. 1. – C. 85-103.
138. Li, Z., Vickrey, T. L., McNally, M. G., et al. Assessing anthocyanin biosynthesis in Solanaceae as a model pathway for secondary metabolism //Genes. – 2019. – T. 10. – №. 8. – C. 559.

139. Lin, Q., Xie, Y., Guan, W. et al. Combined transcriptomic and proteomic analysis of cold stress induced sugar accumulation and heat shock proteins expression during postharvest potato tuber storage //Food chemistry. – 2019. – T. 297. – C. 124991.
140. Lisboa, M. P., Canal, D., Filgueiras, J. P. C., Turchetto-Zolet, A. C. Molecular evolution and diversification of phytoene synthase (*PSY*) gene family //Genetics and Molecular Biology. – 2022. – T. 45. – №. 4. – C. e20210411.
141. Liu X., Lin Y., Liu J., et al. StInvInh2 as an inhibitor of Stvac INV 1 regulates the cold-induced sweetening of potato tubers by specifically capping vacuolar invertase activity //Plant biotechnology journal. – 2013. – T. 11. – №. 5. – C. 640-647.
142. Liu, B., Wang, X. Y., Cao, Y., et al. Factors affecting freezing tolerance: a comparative transcriptomics study between field and artificial cold acclimations in overwintering evergreens //The Plant Journal. – 2020. – T. 103. – №. 6. – C. 2279-2300.
143. Liu, X., Chen, L., Shi, W. et al. Comparative transcriptome reveals distinct starch-sugar interconversion patterns in potato genotypes contrasting for cold-induced sweetening capacity //Food Chemistry. – 2021. – T. 334. – C. 127550.
144. Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review //Frontiers in chemistry. – 2018. – T. 6. – C. 52.
145. López-González C., Juárez-Colunga S., Morales-Elías N. C., Tiessen A. Exploring regulatory networks in plants: transcription factors of starch metabolism //PeerJ. – 2019. – T. 7. – C. e6841.
146. Lu C. A., Ho T. H. D., Ho S. L., Yu S. M. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of  $\alpha$ -amylase gene expression //The Plant Cell. – 2002. – T. 14. – №. 8. – C. 1963-1980.
147. Lv Y., Luo D., Jia Z., et al. The  $\beta$ -Amylase Gene Family in Brassica Napus: Genome Wide Analysis and Expression Profiles in Response to Abiotic Stresses. – 2020.
148. Lv Y., Yang M., Hu D., et al. The OsMYB30 transcription factor suppresses cold tolerance by interacting with a JAZ protein and suppressing  $\beta$ -amylase expression //Plant physiology. – 2017. – T. 173. – №. 2. – C. 1475-1491.
149. Ly D. N. P., Iqbal S., Fosu-Nyarko J., et al. Multiplex CRISPR-Cas9 gene-editing can deliver potato cultivars with reduced browning and acrylamide //Plants. – 2023. – T. 12. – №. 2. – C. 379.
150. Machida-Hirano R. Diversity of potato genetic resources //Breeding science. – 2015. – T. 65. – №. 1. – C. 26-40.

151. Macz3 A., Cucu T., De Meulenaer B., Gelencs3r 3. Comparison of the alpha-amylase inhibitor-1 from common beans and transgenic pea expressing the bean alpha-amylase inhibitor-1 by means of LC-TOF-MS //Food Research International. – 2015. – T. 76. – C. 86-91.
152. Maeo K., Tomiya T., Hayashi K., et al. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for  $\beta$ -amylase of sweet potato //Plant molecular biology. – 2001. – T. 46. – C. 627-637.
153. Mahlow S., Hejazi M., Kuhnert F., et al. Phosphorylation of transitory starch by  $\alpha$ -glucan, water dikinase during starch turnover affects the surface properties and morphology of starch granules //New Phytologist. – 2014. – T. 203. – №. 2. – C. 495-507.
154. Mahlow S., Orzechowski S., Fettke J. Starch phosphorylation: insights and perspectives //Cellular and molecular life sciences. – 2016. – T. 73. – C. 2753-2764.
155. Malinova I., K3ssler S., Orawetz T., et al. Identification of two *Arabidopsis thaliana* plasma membrane transporters able to transport glucose 1-phosphate //Plant and Cell Physiology. – 2020. – T. 61. – №. 2. – C. 381-392.
156. Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins //Nucleic acids research. – 2010. – T. 39. – №. suppl\_1. – C. D225-D229.
157. Markets, R. A. Global potato starch market, size, analysis, & forecasts 2022–2023 & 2027: Confectionery and drinks industry exhibits dominance, supported by widespread use of potato starch. – 2023.
158. Marshall J. J., Lauda C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* //Journal of Biological Chemistry. – 1975. – T. 250. – №. 20. – C. 8030-8037.
159. Maruyama K., Takeda M., Kidokoro S., et al. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A //Plant physiology. – 2009. – T. 150. – №. 4. – C. 1972-1980.
160. Mason-Gamer R. J. The  $\beta$ -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) //American Journal of Botany. – 2005. – T. 92. – №. 6. – C. 1045-1058.
161. Matsuura-Endo C., Kobayashi A., Noda T., et al. Changes in sugar content and activity of vacuolar acid invertase during low-temperature storage of potato tubers from six Japanese cultivars //Journal of plant research. – 2004. – T. 117. – C. 131-137.

162. Mazur M., Matoša Kočar M., Jambrović A. et al. Crop-specific responses to cold stress and priming: Insights from chlorophyll fluorescence and spectral reflectance analysis in maize and soybean //Plants. – 2024. – T. 13. – №. 9. – C. 1204.
163. McKenzie M. J., Chen R. K., Harris J. C., et al. Post-translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold-induced sweetening of potato tubers //Plant, Cell & Environment. – 2013. – T. 36. – №. 1. – C. 176-185.
164. McKenzie M. J., Sowokinos J. R., Shea I. M., et al. Investigations on the role of acid invertase and UDP-glucose pyrophosphorylase in potato clones with varying resistance to cold-induced sweetening //American Journal of Potato Research. – 2005. – T. 82. – C. 231-239.
165. Melo F.R., Sales M. P., Pereira L. S., et al.  $\alpha$ -Amylase inhibitors from cowpea seeds //Protein and Peptide Letters– 1999. – T. 6. – C. 385-390.
166. Menéndez C. M., Ritter E., Schäfer-Pregl R., et al. Cold sweetening in diploid potato: mapping quantitative trait loci and candidate genes //Genetics. – 2002. – T. 162. – №. 3. – C. 1423-1434.
167. Merida A., Fettke J. Starch granule initiation in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts //The Plant Journal. – 2021. – T. 107. – №. 3. – C. 688-697.
168. Mikami B., Degano M., Hehre E. J., Sacchettini J. C. Crystal structures of soybean beta-amylase reacted with beta-maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis //Biochemistry. – 1994. – T. 33. – №. 25. – C. 7779-7787.
169. Mikami B., Hehre E. J., Sato M., et al. The 2.0-Å resolution structure of soybean beta-amylase complexed with alpha-cyclodextrin //Biochemistry. – 1993. – T. 32. – №. 27. – C. 6836-6845.
170. Mikami B., Yoon H. J., Yoshigi N. The crystal structure of the sevenfold mutant of barley  $\beta$ -amylase with increased thermostability at 2.5 Å resolution //Journal of molecular biology. – 1999. – T. 285. – №. 3. – C. 1235-1243.
171. Mitsui T., Ochiai A., Yamakawa H., et al. Novel molecular and cell biological insights into function of rice  $\alpha$ -amylase //Amylase. – 2018. – T. 2. – №. 1. – C. 30-38.
172. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. Questions and future challenges //Trends in Plant Science. – 2004. – T. 9. – №. 10. – C. 490-498.
173. Mobini-Dehkordi M., Javan F. A. Application of alpha-amylase in biotechnology //J. Biol. Today World. – 2012. – T. 1. – №. 1. – C. 39-50.

174. Monroe J. D. Involvement of five catalytically active *Arabidopsis*  $\beta$ -amylases in leaf starch metabolism and plant growth // *Plant Direct*. – 2020. – T. 4. – №. 2. – C. e00199.
175. Monroe J. D., Storm A. R. The *Arabidopsis*  $\beta$ -amylase (BAM) gene family: Diversity of form and function // *Plant Science*. – 2018. – T. 276. – C. 163-170.
176. Monroe J. D., Storm A. R., Badley E. M., et al.  $\beta$ -Amylase1 and  $\beta$ -amylase3 are plastidic starch hydrolases in *Arabidopsis* that seem to be adapted for different thermal, pH, and stress conditions // *Plant Physiology*. – 2014. – T. 166. – №. 4. – C. 1748-1763.
177. Mori K., Sugaya S., Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition // *Scientia horticulturae*. – 2005. – T. 105. – №. 3. – C. 319-330.
178. Morris, W. L., Ducreux, L., Griffiths, D. W., et al. Carotenogenesis during tuber development and storage in potato // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – T. 55. – №. 399. – C. 975-982.
179. Murphy J. M., Farhan H., Evers P. A. Bio-Zombie: the rise of pseudoenzymes in biology // *Biochemical Society Transactions*. – 2017. – T. 45. – №. 2. – C. 537-544.
180. Naing A. H., Kim C. K. Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses // *Physiologia Plantarum*. – 2021. – T. 172. – №. 3. – C. 1711-1723.
181. Nakamura Y., Ono M., Sawada T. Characterization of the functional interactions of plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice endosperm during reserve starch biosynthesis // *Plant Science*. – 2017. – T. 264. – C. 83-95.
182. Neeraj, Siddiqui S., Dalal N., et al. Physicochemical, morphological, functional, and pasting properties of potato starch as a function of extraction methods // *Journal of Food Measurement and Characterization*. – 2021. – T. 15. – C. 2805-2820.
183. Neilson J., Lagüe M., Thomson S., et al. Gene expression profiles predictive of cold-induced sweetening in potato // *Functional & integrative genomics*. – 2017. – T. 17. – C. 459-476.
184. Nguyen-Quoc B., Foyer C. H. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – T. 52. – №. 358. – C. 881-889.
185. Nielsen P. K., Bønsager B. C., Fukuda K., Svensson B. Barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2004. – T. 1696. – №. 2. – C. 157-164.

186. Noda T., Takigawa S., Matsuura-Endo C., et al. Physicochemical properties and amylopectin structures of large, small, and extremely small potato starch granules //Carbohydrate Polymers. – 2005. – T. 60. – №. 2. – C. 245-251.
187. Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A. Effect of short-term cold treatment on carbohydrate metabolism in potato leaves //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 13. – C. 7203.
188. Oufir, M., Legay, S., Nicot, N. et al. Gene expression in potato during cold exposure: changes in carbohydrate and polyamine metabolisms //Plant Science. – 2008. – T. 175. – №. 6. – C. 839-852.
189. Payan F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-proteins and proteomics. – 2004. – T. 1696. – №. 2. – C. 171-180.
190. Payyavula, R. S., Navarre, D. A., Kuhl, J. C., et al. Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression //BMC plant biology. – 2012. – T. 12. – C. 1-17.
191. Peng T., Zhu X., Duan N., Liu J. H. PtrBAM 1, a  $\beta$ -amylase-coding gene of *Poncirus trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels //Plant, Cell & Environment. – 2014. – T. 37. – №. 12. – C. 2754-2767.
192. Pfister B., Zeeman S. C. Formation of starch in plant cells //Cellular and molecular life sciences. – 2016. – T. 73. – C. 2781-2807.
193. Pinhero R. G., Copp L. J., Amaya C. L., et al. Roles of alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in low-temperature sweetening in tolerant and susceptible varieties of potato (*Solanum tuberosum*) //Physiologia plantarum. – 2007. – T. 130. – №. 2. – C. 230-239.
194. Preiss J., Danner S., Summers P. S., et al. Molecular characterization of the Brittle-2 gene effect on maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunits //Plant Physiology. – 1990. – T. 92. – №. 4. – C. 881-885.
195. Puchooa D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) //African Journal of Biotechnology. – 2004. – T. 3. – №. 4. – C. 253-255.
196. Radchuk V. V., Borisjuk L., Sreenivasulu N., et al. Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain //Plant physiology. – 2009. – T. 150. – №. 1. – C. 190-204.



197. Ramli, N. S., Zin, N. H. M. Alpha-amylase inhibitory activity of inhibitor proteins in different types of commercial rice //Science Heritage Journal. – 2018. – T. 2. – №. 2. – C. 27-29.
198. Rekha, M. R., Padmaja, G. Alpha-amylase inhibitor changes during processing of sweet potato and taro tubers //Plant Foods for Human Nutrition. – 2002. – T. 57. – C. 285-294.
199. Ritte G., Lloyd J. R., Eckermann N., et al. The starch-related R1 protein is an  $\alpha$ -glucan, water dikinase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99. – №. 10. – C. 7166-7171.
200. Robertson, M., Walker-Simmons, M., Munro, D., Hill, R. D. Induction of  $\alpha$ -amylase inhibitor synthesis in barley embryos and young seedlings by abscisic acid and dehydration stress //Plant Physiology. – 1989. – T. 91. – №. 1. – C. 415-420.
201. Rodríguez, F., Ghislain, M., Clausen, A. M., et al. Hybrid origins of cultivated potatoes //Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – T. 121. – C. 1187-1198.
202. Rodríguez-Villalón A., Gas E., Rodríguez-Concepción M. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown Arabidopsis seedlings //The Plant Journal. – 2009. – T. 60. – №. 3. – C. 424-435.
203. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color //Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function. – 2016. – C. 35-69.
204. Ruan Y. L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling //Annual review of plant biology. – 2014. – T. 65. – №. 1. – C. 33-67.
205. Rubio S., Donoso A., Pérez F. J. The dormancy-breaking stimuli “chilling, hypoxia and cyanamide exposure” up-regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes in grapevine buds //Journal of Plant Physiology. – 2014. – T. 171. – №. 6. – C. 373-381.
206. Sahni T. K., Goel A. Microbial enzymes with special reference to  $\alpha$ -amylase //Bio Evol. – 2015. – T. 2. – C. 19-25.
207. Šamec, D., Ljubej, V., Redovniković, et al. Low temperatures affect the physiological status and phytochemical content of flat leaf kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) sprouts //Foods. – 2022. – T. 11. – №. 3. – C. 264.
208. Samodien E., Jewell J. F., Loedolff B., et al. Repression of Sex4 and Like Sex Four2 orthologs in potato increases tuber starch bound phosphate with concomitant alterations in starch physical properties //Frontiers in plant science. – 2018. – T. 9. – C. 1044.

209. Santelia D., Kötting O., Seung D., et al. The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in *Arabidopsis* //The Plant Cell. – 2011. – T. 23. – №. 11. – C. 4096-4111.
210. Saripalli G., Gupta P. K. AGPase: its role in crop productivity with emphasis on heat tolerance in cereals //Theoretical and Applied Genetics. – 2015. – T. 128. – C. 1893-1916.
211. Schreier T. B., Umhang M., Lee S. K., et al. LIKE SEX4 1 acts as a  $\beta$ -amylase-binding scaffold on starch granules during starch degradation //The Plant Cell. – 2019. – T. 31. – №. 9. – C. 2169-2186.
212. Schwall G. P., Safford R., Westcott R. J., et al. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B //Nature biotechnology. – 2000. – T. 18. – №. 5. – C. 551-554.
213. Seddigh S., Darabi M. Structural and phylogenetic analysis of  $\alpha$ -glucosidase protein in insects //Biologia. – 2015. – T. 70. – №. 6. – C. 812-825.
214. Seung D., Boudet J., Monroe J., et al. Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH control starch granule initiation in *Arabidopsis* leaves //The Plant Cell. – 2017. – T. 29. – №. 7. – C. 1657-1677.
215. Seung D., Smith A. M. Starch granule initiation and morphogenesis—progress in *Arabidopsis* and cereals //Journal of Experimental Botany. – 2019. – T. 70. – №. 3. – C. 771-784.
216. Shah A., Smith D. L. Flavonoids in agriculture: Chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations //Agronomy. – 2020. – T. 10. – №. 8. – C. 1209.
217. Shannon J. C., Garwood D. L., Boyer C. D. Genetics and physiology of starch development //Starch. – 2009. – C. 23-82.
218. Shapter F. M., Henry R. J., Lee L. S. Endosperm and starch granule morphology in wild cereal relatives //Plant Genetic Resources. – 2008. – T. 6. – №. 2. – C. 85-97.
219. Sharma S., Friberg M., Vogel P., et al. Pho1a (plastid starch phosphorylase) is duplicated and essential for normal starch granule phenotype in tubers of *Solanum tuberosum* L. //Frontiers in Plant Science. – 2023. – T. 14. – C. 1220973.
220. Shen H., Ge X., Zhang B., et al. Preparing potato starch nanocrystals assisted by dielectric barrier discharge plasma and its multiscale structure, physicochemical and rheological properties //Food Chemistry. – 2022. – T. 372. – C. 131240.

221. Shewry P. R., Morell M. Manipulating cereal endosperm structure, development and composition to improve end-use properties //Advances in Botanical Research . – 2001. – T. 36. – C. 165-235.
222. Shirani-Bidabadi M., Nazarian-Firouzabadi F., Sorkheh K., et al. Transcriptomic analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber development reveals new insights into starch biosynthesis //Plos one. – 2024. – T. 19. – №. 4. – C. e0297334.
223. Shoaib N., Liu L., Ali A. Molecular functions and pathways of plastidial starch phosphorylase (PHO1) in starch metabolism: current and future perspectives //International journal of molecular sciences. – 2021. – T. 22. – №. 19. – C. 10450.
224. Shumskaya, M., Bradbury, L. M., Monaco, R. R., Wurtzel, E. T. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity //The Plant Cell. – 2012. – T. 24. – №. 9. – C. 3725-3741.
225. Singh J., Colussi R., McCarthy O. J., Kaur L. Potato starch and its modification //Advances in potato chemistry and technology. – Academic Press, 2016. – C. 195-247.
226. Singh N., Singh J., Kaur L., et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources //Food chemistry. – 2003. – T. 81. – №. 2. – C. 219-231.
227. Skeffington A. W., Graf A., Duxbury Z., et al. Glucan, water dikinase exerts little control over starch degradation in *Arabidopsis* leaves at night //Plant Physiology. – 2014. – T. 165. – №. 2. – C. 866-879.
228. Slugina M. A., Melechin A. A., Kochieva E. Z., Shchennikova A. V. The opposite effect of low temperature on the Pho1a starch phosphorylase gene expression in *Solanum tuberosum* L. tubers and Petota species leaves //American Journal of Potato Research. – 2020. – T. 97. – C. 78-87.
229. Smith A. M., Zeeman S. C., Smith S. M. Starch degradation //Annual Review of Plant Biology – 2005. – T. 56. – №. 1. – C. 73-98.
230. Smith S. M., Fulton D. C., Chia T., et al. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves //Plant physiology. – 2004. – T. 136. – №. 1. – C. 2687-2699.
231. Soccol C. R., Rojan P. J., Patel A. K., et al. Glucoamylase //Enzyme technology. – 2006. – C. 221-237.

232. Solovchenko, A. E., Chivkunova, O. B., Merzlyak, M. N., Reshetnikova, I. V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples //Russian Journal of Plant Physiology. – 2001. – T. 48. – C. 693-700.
233. Song BoTao S. B. T., Xie CongHua X. C. H., Liu Jun L. J. Expression of potato sAGP gene and its effects on contents of starch and reducing sugar of transgenic potato tubers. – 2005.
234. Sowokinos J. R. Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes //American Journal of Potato Research. – 2001. – T. 78. – C. 221-236.
235. Soyk S., Šimková K., Zürcher E., et al. The enzyme-like domain of *Arabidopsis* nuclear  $\beta$ -amylases is critical for DNA sequence recognition and transcriptional activation //The Plant Cell. – 2014. – T. 26. – №. 4. – C. 1746-1763.
236. Stanley D., Fitzgerald A. M., Farnden K. J. Characterisation of putative alpha-amylases from apple (*Malus domestica*) and *Arabidopsis thaliana* //BIOLOGIA-BRATISLAVA. – 2002. – T. 57. – №. SUP/2. – C. 137-148.
237. Stauder, R., Welsch, R., Camagna, M., et al. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the PHYTOENE SYNTHASE gene family //Frontiers in Plant Science. – 2018. – T. 9. – C. 255.
238. Steidle E. A. Investigation of the role of BAM9 in starch metabolism in *Arabidopsis thaliana*. – 2010.
239. Stra, A., Almarwaey, L. O., Alagoz, et al. Carotenoid metabolism: New insights and synthetic approaches //Frontiers in Plant Science. – 2023. – T. 13. – C. 1072061.
240. Streb S., Zeeman S. C. Starch metabolism in *Arabidopsis* //The arabidopsis book/American society of plant biologists. – 2012. – T. 10. – C. e0160.
241. Strygina K. V., Kochetov A. V., Khlestkina E. K. Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues //BMC genetics. – 2019. – T. 20. – C. 35-43.
242. Sudheeran, P. K., Feygenberg, O., Maurer, D., Alkan, N. Improved cold tolerance of mango fruit with enhanced anthocyanin and flavonoid contents //Molecules. – 2018. – T. 23. – №. 7. – C. 1832.
243. Sugiyama A., Ikoma Y., Fujii H., et al. Allelic diversity of phytoene synthase gene influences the transcription level in citrus fruit among a citrus F1 hybrid population //Breeding science. – 2017. – T. 67. – №. 4. – C. 382-392.
244. Szymońska J., Targosz-Korecka M., Krok F. Characterization of starch nanoparticles //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2009. – T. 146. – №. 1. – C. 012027.

245. Takaha T., Critchley J., Okada S., Smith S. M. Normal starch content and composition in tubers of antisense potato plants lacking D-enzyme (4- $\alpha$ -glucanotransferase) // *Planta*. – 1998. – T. 205. – C. 445-451.
246. Takashima Y., Senoura T., Yoshizaki T., et al. Differential chain-length specificities of two isoamylase-type starch-debranching enzymes from developing seeds of kidney bean // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2007. – T. 71. – №. 9. – C. 2308-2312.
247. Tengkun, N., Dongdong, W., Xiaohui, M., et al. Analysis of key genes involved in potato anthocyanin biosynthesis based on genomics and transcriptomics data // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – T. 10. – C. 603.
248. Tester R. F., Karkalas J., Qi X. Starch—composition, fine structure and architecture // *Journal of cereal science*. – 2004. – T. 39. – №. 2. – C. 151-165.
249. Tetlow I. J., Beisel K. G., Cameron S. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes // *Plant physiology*. – 2008. – T. 146. – №. 4. – C. 1878-1891.
250. Tetlow I. J., Bertoft E. A review of starch biosynthesis in relation to the building block-backbone model // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21. – №. 19. – C. 7011.
251. Tetlow I. J., Morell M. K., Emes M. J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants // *Journal of experimental botany*. – 2004. – T. 55. – №. 406. – C. 2131-2145.
252. Tetlow I. J., Wait R., Lu Z., et al. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein–protein interactions // *The Plant Cell*. – 2004. – T. 16. – №. 3. – C. 694-708.
253. Thakur M., Sharma N., Rai A. K. A novel cold-active type I pullulanase from a hot-spring metagenome for effective debranching and production of resistant starch // *Bioresource Technology*. – 2021. – T. 320. – C. 124288.
254. Thalmann M., Coiro M., Meier T., et al. The evolution of functional complexity within the  $\beta$ -amylase gene family in land plants // *BMC evolutionary biology*. – 2019. – T. 19. – C. 1-18.
255. Thalmann M., Pazmino D., Seung D., et al. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants // *The Plant Cell*. – 2016. – T. 28. – №. 8. – C. 1860-1878.
256. Thalmann M., Santelia D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress // *New phytologist*. – 2017. – T. 214. – №. 3. – C. 943-951.

257. Tiessen A., Hendriks J. H., Stitt M., et al. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply //The Plant Cell. – 2002. – T. 14. – №. 9. – C. 2191-2213.
258. Tjaden J., Möhlmann T., Kampfenkel K., et al. Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch //The Plant Journal. – 1998. – T. 16. – №. 5. – C. 531-540.
259. Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Rodríguez-Concepción, M. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 25. – C. 11626-11631.
260. Tong C., Ma Z., Chen H., Gao H. Toward an understanding of potato starch structure, function, biosynthesis, and applications //Food Frontiers. – 2023. – T. 4. – №. 3. – C. 980-1000.
261. Uitdewilligen J. G. A. M. L., Wolters A. M. A., van Eck H. J., Visser R. G. F. Allelic variation for alpha-Glucan Water Dikinase is associated with starch phosphate content in tetraAGPaseLoid potato //Plant Molecular Biology. – 2022. – C. 1-12.
262. Vajravijayan S., Pletnev S., Mani N., et al. Structural insights on starch hydrolysis by plant  $\beta$ -amylase and its evolutionary relationship with bacterial enzymes //International journal of biological macromolecules. – 2018. – T. 113. – C. 329-337.
263. Valcarcel, J., Reilly, K., Gaffney, M., O'Brien, N. M. Levels of potential bioactive compounds including carotenoids, vitamin C and phenolic compounds, and expression of their cognate biosynthetic genes vary significantly in different varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown under uniform cultural conditions //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2016. – T. 96. – №. 3. – C. 1018-1026.
264. van Berkel J., Salamini F., Gebhardt C. Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes //Plant physiology. – 1994. – T. 104. – №. 2. – C. 445-452.
265. Van Harsselaar J. K., Lorenz J., Senning M., et al. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.) //BMC genomics. – 2017. – T. 18. – C. 1-18.
266. Vatansever R., Koc I., Ozyigit I. I., et al. Genome-wide identification and expression analysis of sulfate transporter (SULTR) genes in potato (*Solanum tuberosum* L.) //Planta. – 2016. – T. 244. – C. 1167-1183.

267. Ventriglia T., Kuhn M.L., Ruiz M.T., et al. Two *Arabidopsis* ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits (AGPASEL1 and AGPASEL2) are catalytic //Plant physiology. – 2008. – T. 148. – №. 1. – C. 65-76.
268. Viksø-Nielsen A., Blennow A., Jørgensen K., et al. Structural, Physicochemical, and pasting properties of starches from potato plants with repressed  $\alpha$ -1-gene //Biomacromolecules. – 2001. – T. 2. – №. 3. – C. 836-843.
269. Vogel J.P., Garvin D.F., Mockler T.C., et al. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* //Nature. – 2010. – T. 463. – C. 763–768.
270. Wang C., Tang C. H., Fu X., et al. Granular size of potato starch affects structural properties, octenylsuccinic anhydride modification and flowability //Food chemistry. – 2016. – T. 212. – C. 453-459.
271. Wang S., Chao C., Cai J., et al. Starch–lipid and starch–lipid–protein complexes: A comprehensive review //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2020. – T. 19. – №. 3. – C. 1056-1079.
272. Wang Y., Zhang C., Xu B., et al. Temperature regulation of carotenoid accumulation in the petals of sweet osmanthus via modulating expression of carotenoid biosynthesis and degradation genes //BMC genomics. – 2022. – T. 23. – №. 1. – C. 418.
273. Wang Z., Chen X., Wang J., et al. Increasing maize seed weight by enhancing the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in transgenic maize plants //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2007. – T. 88. – C. 83-92.
274. Wegrzyn T., Reilly K., Cipriani G., et al. A novel  $\alpha$ -amylase gene is transiently upregulated during low temperature exposure in apple fruit //European Journal of Biochemistry. – 2000. – T. 267. – №. 5. – C. 1313-1322.
275. Welsch, R., Medina, J., Giuliano, G., et al. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana* //Planta. – 2003. – T. 216. – №. 3. – C. 523-534.
276. Welsch, R., Wust, F., Bar, C., et al. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes //Plant Physiology. – 2008. – T. 147. – №. 1. – C. 367-380.
277. Whan A., Dielen A. S., Mieog J., et al. Engineering  $\alpha$ -amylase levels in wheat grain suggests a highly sophisticated level of carbohydrate regulation during development //Journal of experimental botany. – 2014. – T. 65. – №. 18. – C. 5443-5457.

278. Wiberley-Bradford A. E., Bethke P. C. Suppression of the vacuolar invertase gene delays senescent sweetening in chipping potatoes //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2018. – T. 98. – №. 1. – C. 354-360.
279. Wiberley-Bradford A. E., Busse J. S., Jiang J., Bethke P. C. Sugar metabolism, chip color, invertase activity, and gene expression during long-term cold storage of potato (*Solanum tuberosum*) tubers from wild-type and vacuolar invertase silencing lines of Katahdin //BMC Research Notes. – 2014. – T. 7. – C. 1-10.
280. Wickramasinghe H. A. M., Blennow A., Noda T. Physico-chemical and degradative properties of in-planta re-structured potato starch //Carbohydrate Polymers. – 2009. – T. 77. – №. 1. – C. 118-124.
281. Williamson M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins //Biochemical journal. – 1994. – T. 297. – №. Pt 2. – C. 249.
282. Xiao Q., Wang Y., Du J., et al. Zm MYB 14 is an important transcription factor involved in the regulation of the activity of the Zm BT 1 promoter in starch biosynthesis in maize //The FEBS journal. – 2017. – T. 284. – №. 18. – C. 3079-3099.
283. Xie X., Chen J., Cheng L., et al. Physicochemical properties of different size fractions of potato starch cultivated in Highland China //International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – T. 256. – C. 128065.
284. Xu C., Coleman W. K., Meng F. R., et al. Relationship between glucose accumulation and activities of acid invertase and its inhibitors in potatoes under simulated commercial conditions //Potato Journal. – 2009. – T. 36. – №. 1 and 2. – C. 35-44.
285. Yamagata H., KUNIMATSU K., Kamasaka H., et al. Rice bifunctional  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1998. – T. 62. – №. 5. – C. 978-985.
286. Yang L., Xia Y., Junejo S. A., Zhou Y. Composition, structure and physicochemical properties of three coloured potato starches //International Journal of Food Science & Technology. – 2018. – T. 53. – №. 10. – C. 2325-2334.
287. Yang T., Li H., Li L., et al. Genome-wide characterization and expression analysis of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase genes underlying drought tolerance in cassava //BMC genomics. – 2023. – T. 24. – №. 1. – C. 190.
288. Yang Y. Z., Li T., Teng R. M. et al. Low temperature effects on carotenoids biosynthesis in the leaves of green and albino tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) //Scientia Horticulturae. – 2021. – T. 285. – C. 110164.

















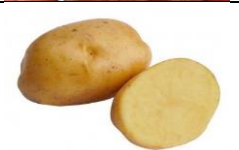





289. Yang, H., Wang, T., Yu, X. et al. Enhanced sugar accumulation and regulated plant hormone signalling genes contribute to cold tolerance in hypoploid *Saccharum spontaneum* //BMC genomics. – 2020. – T. 21. – №. 1. – C. 507.
290. Yasmeen A., Shakoob S., Azam S., et al. CRISPR/Cas-mediated knockdown of vacuolar invertase gene expression lowers the cold-induced sweetening in potatoes //Planta. – 2022. – T. 256. – №. 6. – C. 107.
291. Yu T. S., Kofler H., Hausler R. E., et al. The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter //The Plant Cell. – 2001. – T. 13. – №. 8. – C. 1907-1918.
292. Yu T. S., Zeeman S. C., Thorneycroft D.  $\alpha$ -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves //Journal of Biological Chemistry. – 2005. – T. 280. – №. 11. – C. 9773-9779.
293. Yue C., Cao H., Lin H., et al. Expression patterns of alpha-amylase and beta-amylase genes provide insights into the molecular mechanisms underlying the responses of tea plants (*Camellia sinensis*) to stress and postharvest processing treatments //Planta. – 2019. – T. 250. – C. 281-298.
294. Yue C., L. Cao H., Wang L., et al. Effects of cold acclimation on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season //Plant molecular biology. – 2015. – T. 88. – C. 591-608.
295. Yusuph M., Tester R. F., Ansell R., Snape C. E. Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions //Food Chemistry. – 2003. – T. 82. – №. 2. – C. 283-289.
296. Zeeman S. C., Kossmann J., Smith A. M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants //Annual review of plant biology. – 2010. – T. 61. – №. 1. – C. 209-234.
297. Zhan, M., Gao, J., You, J., et al. The transcription factor SbHY5 mediates light to promote aluminum tolerance by activating SbMATE and SbSTOP1s expression //Plant Physiology and Biochemistry. – 2023. – T. 205. – C. 108197.
298. Zhang D. L., Wang Y., Jia B. C., et al. Genome-wide identification and expression analysis of the  $\beta$ -amylase gene family in chenopodium quinoa //DNA and Cell Biology. – 2021. – T. 40. – №. 7. – C. 936-948.
299. Zhang H. Expression patterns of the genes related to Cold-induced sweetening and function dissection of two starch degradation genes in potato //Dissertation, Huazhong Agricultural University. – 2013.

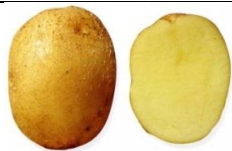










300. Zhang H., Hou J., Liu J., et al. Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting //Potato research. – 2014(a). – T. 57. – C. 47-58.
301. Zhang H., Liu J., Hou J., et al. The potato amylase inhibitor gene SbAI regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity //Plant Biotechnology Journal. – 2014(b). – T. 12. – №. 7. – C. 984-993.
302. Zhang H., Liu, X. Liu J., et al. A novel RING finger gene, SbRFP1, increases resistance to cold-induced sweetening of potato tubers //FEBS letters. – 2013. – T. 587. – №. 6. – C. 749-755.
303. Zhang Q., Zhai J., Shao L., et al. Accumulation of anthocyanins: an adaptation strategy of *Mikania micrantha* to low temperature in winter //Frontiers in Plant Science. – 2019. – T. 10. – C. 1049.
304. Zhang, H., Hou, J., Liu, J., et al. The roles of starch metabolic pathways in the cold-induced sweetening process in potatoes //Starch-Stärke. – 2017. – T. 69. – №. 1-2. – C. 1600194.
305. Zhao X., Jayarathna S., Turesson H., et al. Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato //Scientific reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 4311.
306. Zhong Y., Qu J. Z., Liu X., et al. Different genetic strategies to generate high amylose starch mutants by engineering the starch biosynthetic pathways //Carbohydrate Polymers. – 2022. – T. 287. – C. 119327.
307. Zhou W., He S., Naconsie M., et al. Alpha-glucan, water dikinase 1 affects starch metabolism and storage root growth in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 9863.
308. Zhu J. J., Li Y. R., Liao J. X. Involvement of anthocyanins in the resistance to chilling-induced oxidative stress in *Saccharum officinarum* L. leaves //Plant physiology and biochemistry. – 2013. – T. 73. – C. 427-433.
309. Zhu X., Richael C., Chamberlain P., et al. Vacuolar invertase gene silencing in potato (*Solanum tuberosum* L.) improves processing quality by decreasing the frequency of sugar-end defects //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 4. – C. e93381
310. Zrenner R., Schöler K., Sonnewald U. Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers //Planta. – 1996. – T. 198. – C. 246-252.

## ПРИЛОЖЕНИЕ


Таблица П1 – Сорта картофеля, взятые в анализ.

Сорт/вид	Созревание	Окраска кожуры/ мякоти клубня	Содержание крахмала (%)*	Внешний вид
Леди Клэр	Очень ранний	Желтая/ светло-желтая	11,6-16,2	
Барин	Среднеспелый	Светло- бежевая/ белая	13,4-14,6	
Красавчик	Среднеранний	Красная/ кремовая	12,4-17,8	
Утро	Среднеспелый	Светло- бежевая/ светло-желтая	15,0-18,0	
Северное сияние	Среднеспелый	Синяя/ сине-пёстрая	14,7-15,7	
Надежда	Среднеспелый	Светло- бежевая/ кремовая	13,9-17,9	
Гибрид 1	Нет данных	Фиолетовый/ фиолетовый	Нет данных	
Сапфир	Среднепоздний	Фиолетовый/ фиолетовый	15-16	
Гибрид 7	Нет данных	Желтая/ красная с желтым обрамлением у кожуры	Нет данных	
Гибрид 4	Нет данных	Красная/ красная	Нет данных	

Гибрид 6	Нет данных	Розовая с желтыми пятнами/ розовая с желтым обрамлением у кожуры	Нет данных	
Сатурна	Среднепоздний	Желтая/светло- желтая	16,5-21,4	
Гала	Среднеранний	Желтая/темно- желтая	10,2-13,2	
Крепыш	Ранний	Желтая/кремо- вая	10,0-12,1	
Любава	Раннеспелый	Красная/белая	11,2-16,9	
Метеор	Очень ранний	Желтая/светло- желтая	12,0-14,9	
Жигулевский	Среднеспелый	Желтая/светло- желтая	12,5-15,0	
Фаворит	Среднеспелый	Красная/ кремовая	12,6-16,4	
Великан	Среднеспелый	Светло- бежевая/ кремовая	15,9-18,9	
Фиолетовый	Среднепоздний	Синяя/синяя	10,5-14,4	
Вымпел	Среднеспелый	Желтая/светло- желтая	13,2-16,6	

Колобок	Среднеспелый	Желтая/ желтая	11,4-13	
Василек	Среднеранний	Синяя/ кремовая	12,6-15,9	
Гулливер	Раннеспелый	Светло- бежевая/ кремовая	14,1-15,4	
Фрителла	Среднеспелый	Светло- бежевая/ кремовая	15-19	
Голубизна	Среднеспелый	Светло- бежевая/ кремовая	17-19	
Люкс	Раннеспелый	Красная/желтая	11-15	
Старт	Среднеспелый	Желтая/белая	13-15	
Браво	Среднеранний	Красная/светло- желтая	13,1-15,2	
Горняк	Среднеранний	Желтая/светло- желтая	15,1-16,8	
Ирбитский	Среднеспелый	Красная/светло- желтая	13,0-16,5	
Кортни	Среднеранний	Желтая/светло- желтая	14,8-17,6	
3-43-2	Нет данных	Нет данных	Нет данных	
3-43-6	Нет данных	Нет данных	Нет данных	

Самба	Среднеранний	Желтая/светло-желтая	14-17,8	
Гала	Среднеранний	Желтая/темно-желтая	10,2-13,2	
Импала	Раннеспелый	Желтая/светло-желтая	10,5-14,6	
Ред Скарлет	Раннеспелый	Красная/желтая	10,1-15,6	
Невский	Среднеранний	Светло-бежевая/белая	10-12	
Матушка	Раннеспелый	Красная/кремовая	16,3-18,2	
Русский сувенир	Среднеранний	Желтая/кремовая	14,4-17,4	
Арлекин	Среднеранний	Желтая/белая	14,1-17,6	
Бабушка	Среднеранний	Желтая/белая	15,5-18,5	
Кузнечанка	Среднеранний	Красная/кремовая	12,7-16,2	
Кемеровчанин	Среднеранний	Желтая/желтая	15,5-16,4	
Танай	Среднеранний	Желтая/желтая	14,1-17	
Саровский	Раннеспелый	Красная/желтая	13,9-18,4	

Сударыня	Среднеранний	Желтая/светло-желтая	13,9-14,8	
----------	--------------	----------------------	-----------	---

\*Данные Госсортокмиссии (gossortrf.ru)

Таблица П2 – Виды картофеля и томата, взятые в анализ.

Вид	Каталожный номер	Плоидность; W/C
<i>Solanum gourlay</i> (= <i>Solanum brevicaula Bitter</i> )	CGN 18038	2X/4X; W (4 south)
<i>Solanum jamesii</i> Torr.	ВИР 15203	2X; W (1 + 2)
<i>Solanum kurtzianum</i> Bitter & Wittm.	ВИР 11969	2X; W (4 south)
	ВИР 12483	
<i>Solanum stoloniferum</i> Schltdl. & Bouchet	ВИР 21618	4X; W (1+2, 3, 4 south)
<i>Solanum sucrense</i> Hawkes	ВИР 23598	4X; W (4 B)
<i>Solanum vernei</i> Bitter & Wittm.	ВИР 20332	2X; W (4 south; 4B)
<i>Solanum verrucosum</i> Schltdl.	ВИР 24467	2X; W (4 south; 4B)
<i>Solanum tuberosum</i> L.	GeneID: 102591697 NW_006239139.1 (302246..304341)	cv. DM 1-3 516 R44
<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Heinz 1706	Gene ID: 101255064 NC_015440.3 (122217..124105)	
<i>Solanum pennellii</i> Correll.	LA0716	

Таблица П3 – Последовательности праймеров, использованных в работе.

Название	Последовательность (5' → 3') F	Последовательность (5' → 3') R
SbAlr	TTGTAACATGGCTCGCGTTC	TGTTGGTGAAGCACTTGGAG
ef1α	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
sec3	GCTTGCACACGCCATATCAAT	TGGATTTTACCACCTTCCGCA
SbaI	ACTATGGCTTTTCATTACTCTA	TTACATCAAAGAATAGTTGTATAAC
SbaI_in1R		TCGTGAGAATAGTCTCTTGC
SbaI_ex1F	GTAACATGGCTCGCGTTC	
SbaI_ex3F	AACAGAGGCTCCAAGTGC	
SbaI_in3R		GGATAGTTTGAGCAACATAACTT
StBAM1	CCGGGAGAGTATAATTGGGG	ACAACCCACCTTGAAGAGG
StBAM9	GATGGAAAGACTCCGGTTCAAG	ATGGATTGTGATGAGAAGGATAGC
StAI	TTGTAACATGGCTCGCGTTC	TGTTGGTGAAGCACTTGGAG
SUS4/SS16	ATGGCGCTTGATGAAAGTCAGC	CCAGACTTTGCAATATCAGGAAC
Amy23	ATGGCGCTTGATGAAAGTCAGC	CCAGACTTTGCAATATCAGGAAC
GWD	TGAGTTATGACCGTGCTATC	GACTCAAGATCTGCACCTG
Pain1	TGCTATGCTTAGCTGGCAAAGA	AACCGAGATGACATACCCGA
PSY1	ATGCTCGATGGTGCTTTGT	GACTTCCTCAAGTCCATACGCA
PSY2	AACTGAGCTCTGCTAGTAGATG	GCACTAGAGATCTTGCAATAAGCA
PSY3	GCCTAGTTTAGCCATTCAATAGAC	GCCTAGAGTTGATCGAACGATTC
OR1	GTGGACTTCTAGCACCCAGT	AGAGATCACCCCAACTGCAC



OR2	GGTCAGATGCAGTTTCAAGAAATC	TGGCATCTCATTTTCATCTTCACC
PDS	GAAGCTTTACCCGCTCCTTTAAA	CTTGCTTTCTCATCCAGTCCTT
ZDS	CAGCAGATACGCAATCTAGAT	ACAGTCAATGAATCCAAGAGCA
Z-ISO	GGATTGACAATTCTACTGGATTGG	CTAGCAAGACCACTGTGGACT
CRTISO	ATGAAGCGAAGAAAGAGCTTGT	GCAAGGTATCGTCTGTGGGTCT
LCYB1	TGTCTTCATGGTGAGCACTTACT	CAGGATTTCAAGAAAGTTCCCTAC
LCYB2	CAAGATTATAGGACCCCATTTGC	GGCTTCACAGAGCTAAAGGTAC
LCYE	TATGTCAGACACGACGCTCAAT	CATGCTAGCAGCAGCACCA
VDE	CCTGATGAAACAGAATGTCAG	AGTCACCAACATCAGATTTACGA
ZEP	ATGAATGCTGGCTGCATCACT	AAGTCCACGTTCCACTGCT
NSY	TCGGGCTCAATTTCGACGTGA	ATGGCCTATGACTTGTGTACATAT
NCED1	TGCTCTTAGCTACGATGTGAT	GCGAAATCATGCATCATTGTTGG
NCED2	TATGCCCCTGGAGTTTTTCGG	GTTTGAAGATCGCCAGAAGGCAA
NCED6	GTGGTATTCAAGTTATCCGAG	CACTACATTTTGGCCATGGTTC
DFR	GCTGGATTTATCGGCTCTTGG	GTCTGCTTTCCACAGCGTTAA
ANS	TGGCCTAAAACCCCTGCTGA	GCCTCCAACCTTCCTTCTCTAG
CHI	GGTGCCTCCATCCTTTTTACTC	GTGCTTGCCAATTATGGAATCC
F3H	GGATCACGGTTAAGCCCATTTG	TGCTATTTCGAGTTCACCACTGC
CHS2	CTGTGTTGATCAAGCCACCTATC	CTAGCATCAAGAGAAGGAGCCA

Таблица П4 – Характеристики гомологов *SbAl* у анализируемых видов рода *Solanum*.

Вид	Каталожный номер/ NCBI ID	CR*	Аллели ген/ белок	Длина гена, п.н.	Длина кДНК п.н.	Белок число а.о.	Замещения/индели а.о.	
<i>Solanum acaule</i> Bitter.	ВИР 9784/ MT074624 - MT074626	++	1/1	1817	630	209	<b>S94P</b> ; A133T; A136P; E163A; A205V	5/0
			2/2	1868	618	205	<b>V15G</b> ; <b>P130S</b> ; E163V; F192L / P134_S137del	4/1
			3/3	1868	618	205	<b>V15G</b> ; G67A; E163V; F192L / P134_S137del	4/1
	CGN 31- 2012/ MT074627 - MT074629		4/4	1868	618	205	<b>V15G</b> ; <b>R63I</b> ; E163V; F192L / P134_S137del	4/1
	5/5		1818	630	209	A133T; A136P; E163A; N172S; A205V	5/0	
	6/6		1867	618	205	M149V; E163V; F192L / P134_S137del	3/1	
<i>Solanum rybinii</i> Juz&Bukasov. (= <i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> <i>Andigenum</i> group)	CGN 9342/ MT074630 - MT074632	+	7/7	1763	618	205	S78T; E163V / P134_S137del	2/1
			8/8	1763	618	205	S78T; E163V; A196V / P134_S137del	3/1
			9/9	1807	630	209	A136P; E163V	2/0
<i>Solanum berthaultii</i> Hawkes.	ВИР 24267/ MT074633 - MT074636	-	10/7	1803	627	208	A136P; E163V / S137del	2/1
			11/8	1811	630	209	T123R; A136P; E163V	3/0
			12/9	1801	627	208	<b>V15G</b> ; A136P; E163V / S137del	3/1
			13/10	1802	630	209	A136P; E163V; M207I	3/0
<i>Solanum chacoense</i> Bitter.	CGN 3678/ MT074637 - MT074638	+	14/11	1781	621	206	A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_I204del	7/1
			15/12	1781	621	206	<b>P86A</b> ; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_I204del	8/1
<i>Solanum demissum</i> Lindl.	CGN 15176/34/ MT074639 - MT074640	+	16/13	1822	630	209	A133T; A136P; E163A; A205V	4/0
			17/17	1858	609	202	<b>V15G</b> ; E163V / T135_P138del; G202_I204del	2/2



<i>Solanum gourlay</i> Hawkes(= <i>Solanum brevicaule</i> Bitter)	CGN 18038/ MT074641 - MT074642	+	18/ <b>9</b>	1796	630	209	A136P; E163V	2/0	
			19/18	1869	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0	
<i>Solanum jamesii</i> Torr.	BIP 15203/ MT074643 - MT074644	-	20/19	1808	618	205	A17V; T53A; E163V; P179S; T181I / P134_S137del	5/1	
			21/19	1813	618	205	A17V; T53A; E163V; P179S; T181I / P134_S137del	5/1	
<i>Solanum kurtzianum</i> Bitter & Wittm.	BIP 11969/ MT074645 - MT074646	+	22/18	1788	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0	
			23/20	1788	630	209	T64A; A136P; E163V; P179S; G189S	5/0	
	BIP 12483/ MT074647 - MT074648		24/21	1795	630	209	A136P; E163V; P179S; F201V	4/0	
	25/18		1795	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0		
<i>Solanum stoloniferum</i> Schltdl. & Bouchet	BIP 21618/ MT074649 - MT074651	-	26/22	1857	642	213	T53A; E124K; T135S; E163V; P179S / P138_S139insTSAP	5/1	
			27/23	1805	630	209	A136P; E163V	2/0	
			28/24	1858	642	213	T53A; T135S; E163V; P179S/ P138_S139insTSAP	4/1	
<i>Solanum sucrense</i> Hawkes	BIP 23598/ MT074652 - MT074653	-	29/25	1797	621	206	<b>L35Q</b> ; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_I204del	8/1	
			30/26	1797	621	206	A2D; Q84H; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_I204del	9/1	
<i>Solanum vernei</i> Bitter & Wittm.	BIP 20332/ MT074654 - MT074656	++	31/27	1779	621	206	A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_I204del	7/1	
			32/28	1781	621	206	H4R; S46T; <b>C74W</b> ; T92A; A136P; A152T; E163V; P179S; N180Y; M207I / G202_I204del	10/1	
			33/29	1777	621	206	S46T; G57D; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I / G202_I204del	9/1	
<i>Solanum verrucosum</i> Schltdl.	BIP 24467/ MT074657 - MT074659	+	34/ <b>30</b>	1805	630	209	A136P; E163V; F201L	3/0	
			35/31	1805	630	209	T27A; A136P; E163V; A185T; F201L	5/0	
			36/ <b>30</b>	1805	630	209	A136P; E163V; F201L	3/0	
<i>Solanum tuberosum</i> L.	GeneID: 102591697 NW_00623 9139.1 (302246.. 304341) <sup>***</sup>	n/a	37/-	1848	630	209	-		
<i>Solanum pinnatisectum</i> Dunal	JAWPEI010 000002.1 (406600..40 8850) <sup>***</sup>	n/a	39/33	1843	618	205	T53A; P134_S137del	1/1	
<i>Solanum bulbocastanum</i> Dunal	JAVBHT01 0000005.1 (54363000.. 54365500) <sup>***</sup>	n/a	40/34	2040	618	205	T53A; P120L; P134_S137del	2/1	
<i>Solanum commersonii</i> Poir.	JXZD01154 325.1	n/a	41/35	1769	609	202	A128T; A152T; A196V; F197L; G202_I204del	4/1	
<i>Solanum megistacrolobum</i> Bitter	JAJOON01 0023531.1	n/a	42/36	1820	618	205	A133T; V163A	2/0	

<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Heinz 1706	Gene ID: 101255064 NC_015440 .3 (122217.. 124105) ***	n/a	-	1670	627	208	T53A; S78T; M93L; T112S; P113V; S132P; A133S; T135S; A136P; A145P; A152T; E163V; F192L; I198S; F201V; A205V; F206V; M207L; L208V / Y209del	19/1
<i>Solanum pennellii</i> LA0716	Gene ID: 107012074 NC_028639 .1 (120187.. 122094) ***	n/a	-	1706	627	208	T53A; S78T; M93L; T112S; P113A; S132P; T135S; A136P; A145P; A152T; E163V; F192L; A205V; F206V; M207L; L208V / Y209del	16/1
<i>Solanum etuberosum</i> Lindl.	JAJONR01 0006682.1	n/a	38/32	1764	618	205	T53A; R97Q; P179S	3/0

Примечания. \*Kelley et al., 2015; \*\*Cai et al., 2012; Huang et al., 2019; Rodríguez et al., 2010; Hawkes J. G. \*\*\* согласно GenBank NCBI. CR – cold resistance (холодоустойчивость). W – дикорастущие, С – культивируемые. Замещения приведены сравнении с гомологом *SbAI Solanum tuberosum* cv. DM 1-3 516 R44. Радикальные замещения выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты.

Объект	Аллея	5	25	27	28	37	44	54	65	66	75	77	80	81	84	100	105	110	111	116	131	140	142	153	158	160	165	168	182	183	184	187	190	192	197	198	203	207	209	216	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354
Крелш 1*	A1	С	Т	С	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354	
Крелш 2	A2	С	Т	С	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354	
Любава 1	A3	С	Т	С	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354	
Любава 2	A4	С	Т	С	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354	
Любава 3	A5	С	Т	Т	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354	
Метеор 1	A6	С	Т	С	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278	282	284	288	291	294	300	301	304	307	309	311	330	331	334	342	353	354	
Метеор 2	A7	С	Т	С	С	А	Т	Т	А	Т	Т	С	А	Т	А	Г	Г	С	Т	А	Г	Г	С	С	С	Т	С	А	С	А	А	А	Т	Г	А	С	С	Т	Т	218	219	221	222	223	233	234	237	242	243	247	255	264	268	270	276	278																		



#### Экзон IV

#### Экзон IV