


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля

А.В. Кулакова, Г.И. Ефремов , А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

 gleb_efremov@mail.ru

Аннотация. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – первая по важности незерновая крахмалоносная культура с уровнем потенциальной урожайности 38–48 т/га и содержанием крахмала 13.2–18.7%. Клубни картофеля хранятся при низкой температуре (2–4 °С), что обеспечивает состояние физиологического покоя. Недостатком такого хранения являются распад крахмала и, как следствие, накопление редуцирующих сахаров (холодовое осахаривание), в том числе за счет роста активности β -амилаз, гидролизующих крахмал до мальтозы. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ динамики экспрессии генов β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*), а также содержания крахмала и редуцирующих сахаров в процессе длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель) клубней пяти сортов картофеля (Надежда, Барин, Красавчик, Утро и Северное сияние). Гены β -амилаз – *StBAM9* и один из двух гомологов *StBAM1* (с наибольшей степенью гомологии с *AtBAM1*) – выбраны на основе данных филогенетического анализа. Оценка экспрессии этих генов, а также гена ингибитора амилаз показала тенденцию к снижению уровня транскрипции для всех анализируемых сортов. Обнаружено, что содержание крахмала в процессе хранения клубней также существенно падает. В то же время количество редуцирующих сахаров увеличивается в период сентябрь–апрель, тогда как в период февраль–апрель их содержание не меняется (Красавчик), снижается (Барин, Северное сияние) или продолжает расти (Утро, Надежда). Можно предположить, что активность генов *StBAM1* и *StBAM9* коррелирует с количеством крахмала (положительно) и моносахаридов (отрицательно). А уровень экспрессии *StAI*, в свою очередь, находится в прямой зависимости от уровня экспрессии *StBAM1*. При этом зависимость между степенью предрасположенности сорта к холодovому осахариванию и профилем экспрессии генов *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI* отсутствует.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; сорта картофеля; хранение клубней; катаболизм крахмала; экспрессия гена; β -амилаза.

Для цитирования: Кулакова А.В., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):507-514. DOI 10.18699/VJGB-22-62

Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of β -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers

A.V. Kulakova, G.I. Efremov , A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

Institute of Bioengineering, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

 gleb_efremov@mail.ru

Abstract. *Solanum tuberosum* L. is the most important non-grain starch crop with a potential yield of 38–48 t/ha and a starch content of 13.2–18.7%. Potato tubers are stored at a low temperature (2–4 °C) in a state of physiological dormancy. A disadvantage of this type of storage is the degradation of starch and the accumulation of reducing sugars (cold-induced sweetening), including due to an increase in the activity of β -amylases that hydrolyze starch to maltose. In this study, a comparative analysis of the β -amylase (*StBAM1*, *StBAM9*) and amylase inhibitor (*StAI*) gene expression, as well as starch and reducing sugar content in tubers during long-term low-temperature storage (September, February, April) was performed using potato cultivars Nadezhda, Barin, Krasavchik, Severnoe siyanie and

Utro. The β -amylase genes, *StBAM9* and one of the two *StBAM1* homologs (with the highest degree of homology with *AtBAM1*), were selected based on phylogenetic analysis data. Evaluation of the expression of these genes and the amylase inhibitor gene showed a tendency to decrease in transcription for all analyzed cultivars. The starch content also significantly decreased during tuber storage. The amount of reducing sugars increased in the September–April period, while in February–April, their content did not change (Krasavchik), decreased (Barin, Severnoe siyanie) or continued to grow (Utro, Nadezhda). It can be assumed that the gene activity of *StBAM1* and *StBAM9* correlates with the amount of starch (positively) and monosaccharides (negatively). The level of *StAI* expression, in turn, may be directly dependent on the level of *StBAM1* expression. At the same time, there is no relationship between the degree of cultivar predisposition to cold-induced sweetening and the expression profile of the *StBAM1*, *StBAM9*, and *StAI* genes. Key words: *Solanum tuberosum*; potato cultivars; tuber storage; starch catabolism; gene expression; β -amylase.

For citation: Kulakova A.V., Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of β -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):507-514. DOI 10.18699/VJGB-22-62

Введение

Крахмал представляет собой гомополисахарид глюкозы и входит в число трех основных природных полисахаридов. В отличие от структурных биополимеров целлюлозы и хитина, крахмал является основным запасным углеводом и содержится в больших количествах в пластидах гетеротрофных органов растений: клубней и корней (клубне- и корнеплодные), зерен (злаковые и бобовые), зрелых и/или незрелых плодов (Benkeblia et al., 2008; Bello-Perez et al., 2020).

Наличие крахмала в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) – четвертой (после зерновых) по значимости культуры в мире, определяет ее универсальное использование как продовольственной, кормовой и технической культуры. Несмотря на то что возделываемые злаки также имеют высокое содержание этого полисахарида в зернах, преимущество использования картофельного крахмала обеспечивается его физико-химическими свойствами (структура гранул, физико-химические свойства, соотношение полисахаридов амилозы и амилопектина, степень полимеризации молекул и др.). Сорта картофеля различаются количеством крахмала в клубнях, однако в пищу употребляются сорта практически с любым содержанием крахмала и характеристиками, от которых зависят выбор способа приготовления, а также усвояемость и гликемический ответ (Bello-Perez et al., 2020).

Содержание крахмала в клубнях определяется в первую очередь генетической составляющей, а именно активностью более 70 генов, включая гены ключевых ферментов биосинтеза (крахмалсинтаза и др.) и распада (крахмалфосфоорилаза, аденилаткиназа, амилаза и др.) (Van Harsselaar et al., 2017). На количество полисахарида также влияет послеуборочное хранение клубней в картофелехранилище при пониженных положительных температурах (2–4 °C). Таким образом, поддерживается состояние физиологического покоя, замедляется прорастание, высыхание и развитие инфекций. При этом к концу срока хранения (ближе к сезону посадки) происходит распад части крахмала с образованием глюкозы, необходимой для стимулирования роста побегов (Benkeblia et al., 2008). Однако для ряда сортов характерно так называемое холодовое осахаривание (CIS) – значительное увеличение содержания редуцирующих сахаров в ответ на низкие температуры (Fischer et al., 2013), что приводит к ухудшению питательных и диетических качеств, в частности за счет образования акрил-

амида при жарке (Sonnevald S., Sonnevald U., 2014; Hou et al., 2019; Tai et al., 2020). Вместе с тем существуют CIS-устойчивые сорта, которые используются для производства картофеля «фри».

Катаболизм крахмала важен как для роста растения, так и с точки зрения потребительских свойств. Степень подверженности крахмала к деградации зависит от состава и структуры гранул, обуславливает усвояемость крахмала и гликемический ответ (Bello-Perez et al., 2020). Под действием α -глюкоанов водной дикиназы (GWD; EC 2.7.9.4) и фосфоглюкоанов водной дикиназы (PWD; EC 2.7.9.5) крахмал разлагается на разветвленные и линейные глюканы (Fettke et al., 2007; Shoaib et al., 2021). Разложение до олигосахаридов и молекул мальтозы катализируется фосфоролитическими (фосфоорилазы крахмала, EC 2.4.1.1) и гидролитическими (α -амилазы, или 1,4- α -D-глюкоан-глюкогидролазы, AMY, EC 3.2.1.1; β -амилазы, или 1,4- α -D-глюкоан-мальтогидролазы, BAM или Bmy, EC 3.2.1.2) ферментами (Solomos, Mattoo, 2005; Zeeman et al., 2007; Shoaib et al., 2021). AMY гидролизует эндо- α -1,4-гликозидные связи, образуя олигосахариды различной длины, тогда как BAM отщепляет вторую с конца α -1,4-гликозидную связь, высвобождая дисахариды (Zeeman et al., 2007; Shoaib et al., 2021). Выход молекул глюкозы происходит под экзодействием α -глюкозидаз (1,4- α -d-глюкан-глюкогидролаза, EC 3.2.1.20), которые разрывают крайние α -1,4- и α -1,6-гликозидные связи (Taylor et al., 2000). Пониженная активность как α -амилаз, так и α -глюкозидаз существенно снижает скорость гидролиза крахмала, что является позитивным эффектом как для предотвращения холодового осахаривания клубней при хранении, так и для повышения диетической ценности картофеля (Riyaphan et al., 2018).

Согласно исследованиям β -амилаз у различных видов растений, данные гидролазы также высоко значимы для гидролиза крахмала. У модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. охарактеризовано семейство β -амилаз, состоящее из девяти ферментов с разной локализацией и функциональной нагрузкой (Mongro, Storm, 2018). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей β -амилаз 136 различных видов водорослей и наземных растений показал, что современные покрытосеменные содержат восемь клад β -амилаз, а также кладу неактивных ферментов BAM10, отсутствующую у *Arabidopsis* (Thalman et al., 2019). При этом гомологи BAM4 *Arabidopsis*

отсутствуют у многих крахмалистых сельскохозяйственных культур, что предполагает видоспецифичное регулирование расщепления крахмала (Thalmann et al., 2019).

Функциональная активность отдельных ферментов семейства ВАМ выяснили с помощью различных подходов и методов. Так, продемонстрирована важность уровня экспрессии генов специфичной для эндосперма β-амилазы (*Bmy1*) и конститутивной *Bmy2* во время развития зерна ячменя для определения качества соложения (Vinje et al., 2019). Показана значимая роль гена *PbrBAM3* (груша березоволистная *Pyrus betulaefolia* Bunge) в устойчивости растения к холоду за счет повышения уровня растворимых сахаров (Zhao et al., 2019). Больше всего работ (в основном 1990-х годов) опубликовано по β-амилазам батата (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), результаты которых свидетельствуют о важности этого фермента для модуляции свойств крахмала сладкого картофеля с целью повышения потребительских качеств (Guo et al., 2019).

Несмотря на показанное на примере других растений участие β-амилаз в распаде крахмала, в случае картофеля работы по их изучению немногочисленны. Показано, что данные ферменты способны без остатка гидролизовать до мальтозы амилозу клубней картофеля (Hopkins et al., 1948). Активность β-амилаз значительно растет при снижении температуры хранения клубней с 20 до 3–5 °С (Nielsen et al., 1997), а также при прорастании клубней, вышедших из состояния физиологического покоя (Vajravijayan et al., 2018). Транскриптомный и протеомный анализы клубней картофеля, хранящихся при 15, 4 и 0 °С, подтвердили, что регуляция накопления редуцирующих сахаров положительно связана с экспрессией β-амилаз (Lin et al., 2019).

С накоплением редуцирующих сахаров в клубнях, хранящихся при низких температурах, положительно коррелирует уровень генной экспрессии *StBAM1* и *StBAM9* (Zhang et al., 2014a). Фермент *StBAM1* может быть инактивирован при взаимодействии с ингибитором амилаз *SbAI* (Zhang et al., 2014b), а также путем убиквитинирования и деградации *StBAM1*, запускаемых транскрипционным фактором *SbRFP1* (Zhang et al., 2019).

В связи с этим целью настоящей работы были изучение динамики экспрессии генов β-амилаз *StBAM1*, *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* и оценка изменения содержания крахмала и редуцирующих сахаров в клубнях пяти сортов картофеля (Надежда, Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние) в условиях длительного низкотемпературного хранения. Выбор сортов был обусловлен различиями по количеству крахмала в клубнях.

Материалы и методы

В работе задействовали клубни пяти сортов картофеля (Надежда, Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние), различающихся, по данным оригинаторов (<https://reestr.gossortrf.ru/>), содержанием крахмала в клубнях и назначением (табл. 1). Растения выращивали в 2021 г. в полевых условиях Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (Московская область, Россия). В конце августа по два растения каждого сорта переносили в условия экспериментальной установки искусственного климата (Институт биоинжене-

Таблица 1. Сорта картофеля, использованные в работе

Сорт	Код сорта*	Содержание крахмала*, %	Назначение*
Надежда	9463920	13.9–17.9	Картофель «фри»
Красавчик	9553926	12.4–17.8	
Северное сияние	8558886	14.7–15.7	
Барин	8854151	13.4–14.6	Столовый
Утро	9253216	15.0–18.0	

* Согласно <https://reestr.gossortrf.ru/>.

Таблица 2. Праймеры, использованные для РВ-ПЦР

Ген	Праймер	Последовательность (5'→3')
<i>StBAM1</i> ³	Forw/Rev	CCGGGAGAGTATAATTGGGG ACAACCCACCTTGAAGAGG
<i>StBAM9</i> ³	Forw/Rev	GATGGAAGACTCCGGTTCAAG ATGGATTGTGATGAGAAGGATAGC
<i>StAI</i> ¹	Forw/Rev	TTGTAACATGGCTCGCGTTC TGTTGGTGAAGCACTTGGAG
<i>ef1</i> ²	Forw/Rev	ATTGGAACCGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>SEC3A</i> ²	Forw/Rev	GCTTGCACACGCCATATCAAT TGGATTTTACCACCTTC-CGCA

¹ Dyachenko et al., 2021; ² Lopez-Pardo et al., 2013; Tang et al., 2017;

³ праймеры для анализа экспрессии разработаны в настоящем исследовании.

рии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук). В сентябре отделяли клубни, гомогенизировали и использовали (вместе кожура и мякоть) для последующего анализа экспрессии генов β-амилаз (*StBAM1* и *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*), а также для определения содержания крахмала и редуцирующих сахаров (глюкоза и фруктоза).

Суммарную РНК выделяли из 50–100 мг ткани клубней (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия), дополнительно очищали от примесей ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия) и применяли для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США), согласно протоколам производителей. Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле. Концентрацию РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США)).

Анализ экспрессии генов *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI* в клубнях картофеля осуществляли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с нормализацией данных по референсным генам *elongation factor 1-alpha* (*ef1*; LOC102600998) и *SEC3A* (LOC102599118) (Lopez-Pardo et al., 2013; Tang et al., 2017) (табл. 2). Для РВ-ПЦР использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (см. табл. 2),

набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 5 мин при 95 °С, 40 циклов (15 с при 95 °С; 50 с при 62 °С).

Последовательности генов β-амилаз *S. tuberosum* (*BAM1*, gene ID 102598794; *BAM1*, 102584887; *BAM8*, 102598339; *PCT-BMY1*, 102577806; *BAM3*, 102594291; *BAM-like*, 102584563; *BAM7*, 102593066; *BAM9*, 102590483) и модельного вида *A. thaliana* (*BAM1*, 821975; *BAM2*, At2g45880, 827959; *BMY2* (*BAM8*), 834566; *CT-BMY* (*BAM3*), 827419; *BAM4*, AT5G55700, 835664; *BAM5*, 827185; *BAM6*, 817789; *BAM7*, AT2G45880, 819196; *BAM9* (*BMY3*), At5g18670, 831985) извлекали из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогению последовательностей кодируемых ими белков оценивали для определения гомологов β-амилаз *Arabidopsis*, наиболее значимых в процессе деградации крахмала, у *S. tuberosum*. Анализ проводили с помощью MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) методом максимального правдоподобия (maximum likelihood), основанным на модели JTT; бутстрэп – 1000 реплик. Используя последовательности транскриптов генов β-амилаз *S. tuberosum*, разрабатывали праймеры для анализа экспрессии *StBAM1* (gene ID 102584887) и *StBAM9* (gene ID 102590483) (см. табл. 2) таким образом, чтобы прямой и обратный праймеры были разделены как минимум одним интроном. Специфичность праймеров к соответствующему гену проверяли посредством сравнительного выравнивания их последовательностей с транскриптами *S. tuberosum* в программе NCBI-primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Содержание крахмала (мг/г свежей ткани) определяли с помощью спектрофотометра Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия; λ = 340 нм) и ферментного теста Starch (Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG, Швейцария) с некоторыми модификациями протокола производителя.

Материал клубней (вместе мякоть и кожура, ~0.02 г; количество определяли, основываясь на известных данных о среднем содержании крахмала в клубнях картофеля (13–20 %) и требованиях теста по количеству крахмала в пробе) гомогенизировали, суспендировали в 1 мл диметилсульфоксида, добавляли 0.25 мл концентрированной соляной кислоты и инкубировали при 60 °С в течение 60 мин при постоянном встряхивании. Затем охлаждали до 25 °С, добавляли 2.5 мл воды (milliQ), перемешивали и доводили pH до 4.5 с использованием 2N гидроксида натрия. Суспензию отстаивали или фильтровали через Miracloth (Merck, США). Аликвоту надосадочной жидкости разводили в 5, 10, 20 и 100 раз; 0.05 мл получившегося раствора применяли для ферментного теста и последующей спектрофотометрии. В расчет брали значения, соответствующие ΔA = 0.115 ± 0.035 (по рекомендациям производителя теста). Анализ выполняли в двух биологических и трех технических повторах.

Содержание редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) (мг/г свежей ткани) измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по-

средством хроматографа Varian ProStar (Varian Inc., США), дифференциального рефрактометрического детектора 102 М для хроматографа (модель Стайер, ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) и колонки Agilent Pursuit 200Å PFP (4.6 × 150 mm, 5 μm HPLC Column, A3050150X046, Agilent, США). Для этого 1 г материала клубней (вместе мякоть и кожура) растирали в жидком азоте, суспендировали в 10 мл 80 % этанола и центрифугировали при 16000 г в течение 15 мин. Супернатант использовали для ВЭЖХ анализа. Изократическое элюирование выполняли со смесью ацетонитрил:вода (75:25 v/v) в качестве подвижной фазы; скорость потока – 1.5 мл/мин, температура – 30 °С. Анализ проводили в двух биологических и трех технических повторах.

Для статистической обработки результатов РВ-ПЦР и анализа содержания крахмала и сахаров применяли программу GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение (M) со стандартным отклонением (± SD) на основе двух биологических и трех технических повторов для каждого варианта измерения. Для оценки различий в экспрессии генов и содержании углеводов использовали *t*-критерий Уэлча (unequal variance, Welch's *t*-test) ($p < 0.05$ указывает на статистическую значимость различий).

Результаты

Исследование сфокусировано на характеристике экспрессии трех генов, *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI*. Ген ингибитора амилаз (*StAI*, gene ID 102591697) присутствует в геноме картофеля в одной копии (Zhang et al., 2014b; Dyachenko et al., 2021), тогда как семейство β-амилаз состоит из нескольких членов (Van Harselaar et al., 2017). С помощью анализа базы данных NCBI и сопутствующих литературных данных были экстрагированы доступные последовательности генов β-амилаз *S. tuberosum* и *A. thaliana*. Аминокислотные последовательности кодируемых ими ферментов были использованы для сравнительного структурно-филогенетического анализа, в результате которого последовательности β-амилаз *S. tuberosum* классифицировали по гомологии с белками *A. thaliana*, образующими девять клад (AtBAM1–AtBAM9) (рис. 1).

Для семи клад β-амилаз *A. thaliana* (исключение AtBAM2 и AtBAM4) были обнаружены гомологи из *S. tuberosum*. В том числе в геноме картофеля идентифицированы два гомолога *StBAM1* и один гомолог *StBAM9* (gene ID 102590483). На основе полученной дендрограммы из двух β-амилаз клады *BAM1* для работы была выбрана *StBAM1* (gene ID 102584887) с наибольшей степенью гомологии с AtBAM1 (см. рис. 1). Для отобранных генов *StBAM1* (gene ID 102584887) и *StBAM9* (gene ID 102590483) были разработаны праймеры, которые использовали для изучения их экспрессии.

Клубни пяти сортов картофеля, Надежда, Красавчик, Северное сияние, Барин, Утро (см. табл. 1), собраны в сентябре и заложены на хранение в картофелехранилище при температуре 3 °С. Ткани клубней отобраны на анализ (экспрессионный и биохимический) в сентябре (свежий урожай), феврале (5–6 мес. хранения) и апреле (8 мес. хранения).

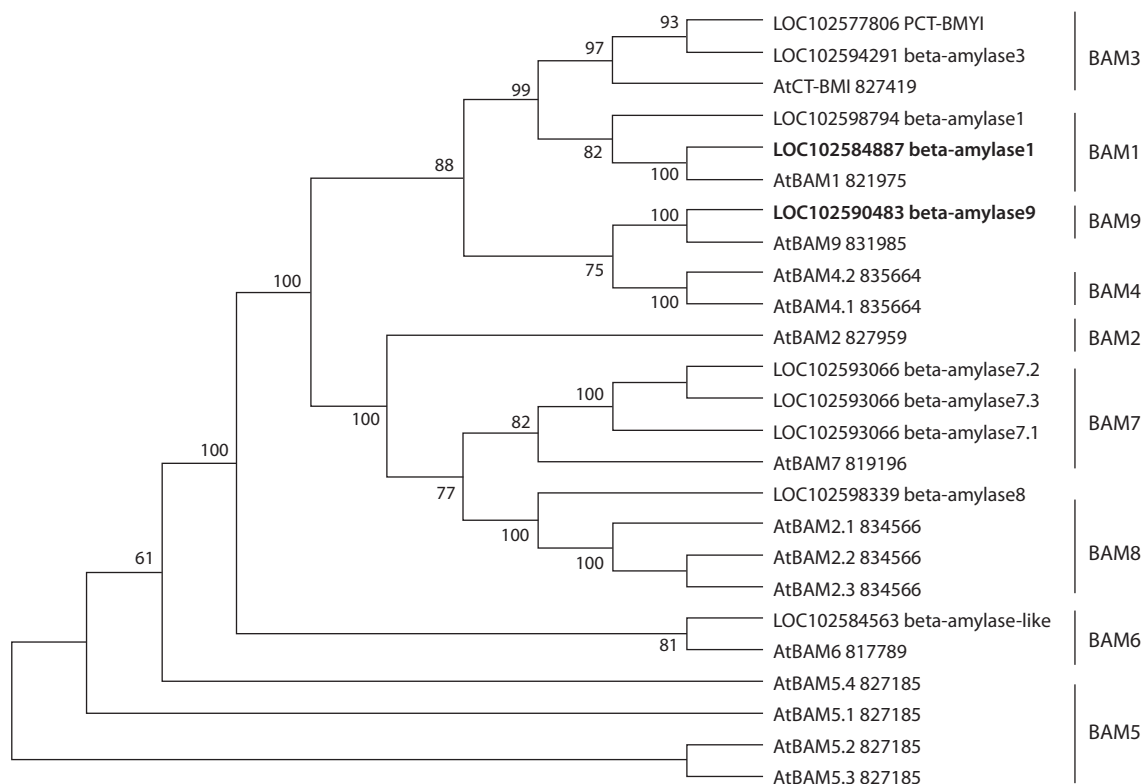


Рис. 1. Неукорененная консенсусная дендрограмма на основе выравнивания 25 аминокислотных последовательностей β-амилаз *S. tuberosum* (BAM1, gene ID 102598794; BAM1, 102584887; BAM8, 102598339; PCT-BMY1, 102577806; BAM3, 102594291; BAM-like, 102584563; BAM7, 102593066; BAM9, 102590483, включая изоформы) и модельного вида *A. thaliana* (BAM1, 821975; At2g45880 BAM2, 827959; BMY2 (BAM8), 834566; CT-BMY (BAM3), 827419; AT5G55700 BAM4, 835664; BAM5, 827185; BAM6, 817789; AT2G45880 BAM7, 819196; At5g18670 BAM9 (BMY3), включая изоформы).

Анализ проведен в программе MEGA 7.0 методом максимального правдоподобия, основанным на модели JTТ. Ветви, соответствующие кластерам, воспроизведенным менее чем в 50 % реплик начальной загрузки, свернуты. Процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показан рядом с ветвями.

С целью прояснить профиль активности *StBAM1* и *StBAM9*, а также ингибитора амилаз *StAI*, которые кодируют ключевые ферменты деградации крахмала (Zhang et al., 2014a, b), проведен анализ экспрессии этих генов в клубнях в динамике низкотемпературного хранения (3 °C; сентябрь, февраль, апрель) (рис. 2). Показано, что экспрессия гена *StBAM1* значительно снижается в апреле по сравнению с сентябрем (наиболее выражено у сортов Красавчик и Утро). При этом различия между февральским и апрельским значениями не столь существенны: уровень экспрессии гена продолжает незначительно снижаться или не меняется (см. рис. 2).

Экспрессия гена *StBAM9* также значительно снижается в феврале по сравнению с сентябрем, но не так резко, как экспрессия *StBAM1*. Исключение составляет сорт Красавчик, где уровень транскрипции не меняется. В апреле, по сравнению с февралем, экспрессия *StBAM9* немного вырастает (Надежда), не меняется (Утро, Барин, Северное сияние) или падает (Красавчик) (см. рис. 2).

Сходная динамика наблюдается и для гена ингибитора амилаз *StAI*. Его экспрессия резко падает в апреле, по сравнению с сентябрем, в клубнях сортов Северное сияние, Барин и Утро. В клубнях сортов Надежда и Красавчик уровень транскрипции *StAI* снижается плавно. В апреле, по сравнению с февралем, экспрессия *StAI* слегка выра-

стает (Утро), не меняется (Надежда, Красавчик и Барин) или резко падает (Северное сияние) (см. рис. 2).

Таким образом, прослеживается похожая тенденция к снижению уровня экспрессии для всех трех анализируемых генов по мере хранения клубней картофеля при низких температурах.

Для определения возможных корреляций уровней экспрессии генов β-амилаз и ингибитора амилаз с содержанием крахмала и редуцирующих сахаров в тех же тканях клубней проведен биохимический анализ профиля содержания крахмала, глюкозы и фруктозы в динамике холодового хранения (сентябрь, февраль, апрель) (рис. 3).

Как и ожидалось, в сравнении с сентябрем, в апреле содержание крахмала существенно снижается в клубнях всех сортов (см. рис. 3). В то же время содержание редуцирующих сахаров в феврале и апреле существенно больше, чем в сентябре, для всех сортов. В сравнении с февралем в апреле в клубнях сортов Утро, Надежда и Красавчик содержание глюкозы и фруктозы продолжает расти, тогда как у сортов Барин и Северное сияние – резко падает (см. рис. 3). При этом в феврале клубни сорта Барин отличаются самым высоким содержанием фруктозы и глюкозы – в 1.5–3.0 и 1.5–4.0 раза выше, чем у остальных сортов. Самые низкие показатели – в клубнях сорта Надежда. В апреле существенных межсортовых различий не

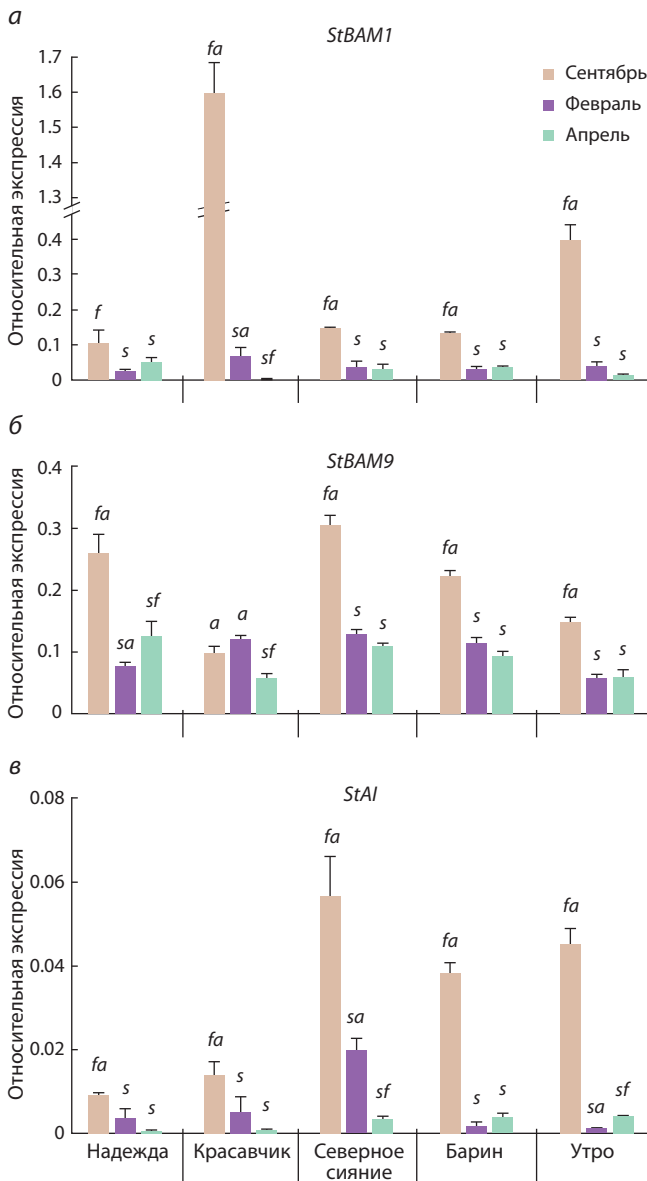


Рис. 2. Профиль экспрессии генов *StBAM1* (а), *StBAM9* (б) и *StAI* (в) в клубнях пяти сортов картофеля (Надежда, Красавчик, Северное сияние, Барин, Утро) в динамике низкотемпературного (3 °С) хранения (сентябрь, февраль, апрель).

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).

отмечено, за исключением пониженного (в сравнении с другими сортами) содержания глюкозы в клубнях сорта Северное сияние.

Таким образом, при низкотемпературном хранении с сентября по апрель содержание крахмала снижается в разной степени в клубнях всех сортов, в то время как содержание редуцирующих сахаров растет в клубнях сортов Надежда и Утро. 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).

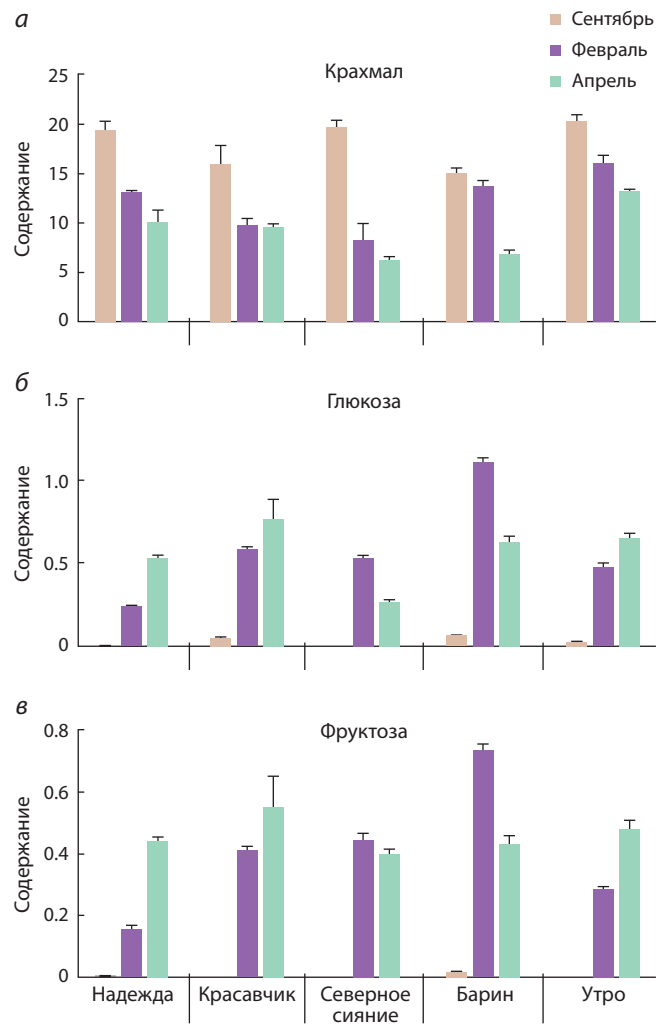


Рис. 3. Содержание крахмала и редуцирующих сахаров (глюкоза, фруктоза, мг/г свежей ткани) в клубнях картофеля пяти сортов – Надежда, Красавчик, Северное сияние, Барин, Утро, в динамике низкотемпературного, 3 °С, хранения (сентябрь, февраль, апрель).

Обсуждение

Клубни картофеля, хранящиеся при низкой температуре (3 °С), были охарактеризованы в динамике (сбор урожая, 5–6 и 8 мес. хранения) по профилю экспрессии генов β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*), а также по содержанию крахмала и редуцирующих сахаров. Выбранные для анализа пять сортов делятся на две группы, в зависимости от назначения: столовое (Барин и Утро) и картофель «фри» (Надежда, Красавчик, Северное сияние) (см. табл. 1). Такое деление связано со степенью чувствительности каждого сорта к холодовому осахариванию клубней – чем выше устойчивость, тем больше сорт подходит для производства картофеля «фри», поскольку у CIS-неустойчивых сортов жарка сопровождается повышенным образованием редуцирующих сахаров, приводящих к синтезу акриламида (Sonnwald S., Sonnwald U., 2014; Hou et al., 2019; Tai et al., 2020).

Известно, что накопление редуцирующих сахаров, свойственное как для холодового осахаривания, так и для выхода клубней из состояния покоя, положительно коррелирует с экспрессией генов β -амилаз (Zhang et al.,

2014a; Lin et al., 2019). Выбранные для анализа *StBAM1* и *StBAM9* являются гомологами генов *A. thaliana* *BAM1* и *BAM9* (см. рис. 1), для которых была показана пластидная локализация, а также наличие (*BAM1*) и отсутствие (*BAM9*) каталитической активности (Mongee, Storm, 2018). Предполагаемое функциональное сходство *StBAM1* и *StBAM9* с соответствующими ферментами у *A. thaliana* подкреплено и детализировано данными других исследований. Так, показано, что *StBAM1* и *StBAM9* вносят разный вклад в холодовое осахаривание клубней: *StBAM1* локализуется в строме амилопласта и гидролизует растворимый крахмал (Hou et al., 2017), *StBAM9* – неактивный фермент (Zhang et al., 2014b), однако играет доминирующую роль в осахаривании (Hou et al., 2017). Локализуясь на поверхности гранулы крахмала, *StBAM9* образует белковый комплекс с *StBAM1*, привлекая, таким образом, активную амилазу *StBAM1* к высвобождению молекул растворимого глюкоана с поверхности гранул (Hou et al., 2017). Фермент *StBAM1* может быть инактивирован при взаимодействии с ингибитором амилаз *SbAI* (Zhang et al., 2014b), а также путем убиквитинирования и деградации *StBAM1*, запускаемых транскрипционным фактором *SbRFP1* (Zhang et al., 2019).

С учетом подобных функциональных данных ожидалось рост уровня экспрессии генов *StBAM1* и *StBAM9* и снижение транскрипции гена *StAI* при долговременном воздействии (5–6 и 8 мес.) низких температур на клубни. Однако было определено, что экспрессия всех трех генов существенно снижается по мере хранения (см. рис. 2). Тем не менее при этом падает и содержание крахмала, а количество редуцирующих сахаров растет (см. рис. 3). Можно предположить, что генная активность *StBAM1* и *StBAM9* коррелирует с количеством крахмала (положительно) и моносахаридов (отрицательно). А уровень экспрессии *StAI*, в свою очередь, находится в прямой зависимости от уровня экспрессии *StBAM1* и генов α -амилаз.

Кроме того, показанный ранее рост экспрессии *StBAM1* и *StBAM9* наблюдался после 30 дней воздействия низких температур (Zhang et al., 2014a), тогда как в данном исследовании анализ проводился спустя 7 и 9 мес. после закладки на хранение. 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/дисахаридов и активностью деградирующих крахмал ферментов. Необходимо также учитывать активное участие в деградации запасаемого крахмала α -амилаз (гидролиз) (Zhang et al., 2014a) и пластидной фосфоорилазы крахмала (фосфоролит) (Slugina et al., 2020).

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод об отсутствии какой-либо зависимости между степенью предрасположенности сорта к холодовому осахариванию и профилем экспрессии генов β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*).

Список литературы / References

- Bello-Perez L.A., Flores-Silva P.C., Agama-Acevedo E., Tovar J. Starch digestibility: past, present, and future. *J. Sci. Food Agric.* 2020;100(14):5009-5016. DOI 10.1002/jsfa.8955.
- Benkeblia N., Alexopoulos A.A., Passam H.C. Physiology and biochemistry regulation of dormancy and sprouting in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Fruit Vegetable Cereal Sci. Biotechnol.* 2008;2(1):54-68.
- Dyachenko E.A., Kulakova A.V., Meleshin A.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Amylase inhibitor *SbAI* in potato species: structure, variability and expression pattern. *Russ. J. Genet.* 2021;57(1):36-46. DOI 10.1134/S102279542101004X.
- Fettke J., Eckermann N., Kötting O., Ritte G., Steup M. Novel starch-related enzymes and carbohydrates. *Cell. Mol. Biol.* 2007;52: 883-904.
- Fischer M., Schreiber L., Colby T., Kuckenberger M., Tacke E., Hoffert H.R., Schmidt J., Gebhardt C. Novel candidate genes influencing natural variation in potato tuber cold sweetening identified by comparative proteomics and association mapping. *BMC Plant Biol.* 2013;13:113. DOI 10.1186/1471-2229-13-113.
- Guo L., Tao H., Cui B., Janaswamy S. The effects of sequential enzyme modifications on structural and physicochemical properties of sweet potato starch granules. *Food Chem.* 2019;277:504-514. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.11.014.
- Hopkins R.H., Jelinek B., Harrison L.E. The action of β -amylase on potato amylose. *Biochem. J.* 1948;43(1):32-38. DOI 10.1042/bj0430032.
- Hou J., Liu T., Reid S., Zhang H., Peng X., Sun K., Du J., Sonnewald U., Song B. Silencing of α -amylase *StAmy23* in potato tuber leads to delayed sprouting. *Plant Physiol. Biochem.* 2019;139:411-418. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.03.044.
- Hou J., Zhang H., Liu J., Reid S., Liu T., Xu S., Tian Z., Sonnewald U., Song B., Xie C. Amylases *StAmy23*, *StBAM1* and *StBAM9* regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways. *J. Exp. Bot.* 2017;68:2317-2331. DOI 10.1093/jxb/erx076.
- Lin Q., Xie Y., Guan W., Duan Y., Wang Z., Sun C. Combined transcriptomic and proteomic analysis of cold stress induced sugar accumulation and heat shock proteins expression during postharvest potato tuber storage. *Food Chem.* 2019;297:124991. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.124991.
- Lopez-Pardo R., de Galarreta J.I.R., Ritter E. Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. 31(1):39-45. DOI 10.1007/s11032-012-9766-z. *Mol. Breed.* 2013;
- Monroe J.D., Storm A.R. Review: The Arabidopsis β -amylase (*BAM*) gene family: Diversity of form and function. *Plant Sci.* 2018;276: 163-170. DOI 10.1016/j.plantsci.2018.08.016.
- Nielsen T.H., Deiting U., Stitt M. A [β]-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol.* 1997;113(2): 503-510. DOI 10.1104/pp.113.2.503.
- Riyaphan J., Jhong C.H., Lin S.R., Chang C.H., Tsai M.J., Lee D.N., Sung P.J., Leong M.K., Weng C.F. Hypoglycemic efficacy of docking selected natural compounds against α -glucosidase and α -amylase. *Molecules.* 2018;23(9):2260. DOI 10.3390/molecules23092260.
- Shoab N., Liu L., Ali A., Mughal N., Yu G., Huang Y. Molecular functions and pathways of plastidial starch phosphorylase (*PHO1*) in starch metabolism: current and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10450. DOI 10.3390/ijms221910450.
- Slugina M.A., Meleshin 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. *Am. J. Potato Res.* 2020;97:78-87. DOI 10.1007/s12230-019-09758-z.
- Solomos T., Mattoo A.K. Starch-sugar metabolism in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers in response to temperature variations. In: Razdan M.K., Mattoo A.K. (Eds.). *Gene Improvement of Solanaceous Crops*. New York: Sci. Publ. Inc., 2005;1:209-234.
- Sonnewald S., Sonnewald U. Regulation of potato tuber sprouting. *Planta.* 2014;239(1):27-38. DOI 10.1007/s00425-013-1968-z.

- Tai H.H., Lagüe M., Thomson S., Aourousseau F., Neilson J., Murphy A., Bizimungu B., Davidson C., Deveaux V., Bègue Y., Wang H.Y., Xiong X., Jacobs J.M.E. Tuber transcriptome profiling of eight potato cultivars with different cold-induced sweetening responses to cold storage. *Plant Physiol. Biochem.* 2020;146:163-176. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.11.001.
- Tang X., Zhang N., Si H., Calderón-Urrea A. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress. *Plant Methods.* 2017;13(85):85. DOI 10.1186/s13007-017-0238-7.
- Taylor M.A., Ross H.A., McRae D., Stewart D., Roberts I., Duncan G., Wright F., Millam S., Davies H.V. A potato alpha-glucosidase gene encodes a glycoprotein-processing alpha-glucosidase II-like activity. Demonstration of enzyme activity and effects of down-regulation in transgenic plants. *Plant J.* 2000;24(3):305-316. DOI 10.1046/j.1365-3113x.2000.00873.x.
- Thalman M., Coiro M., Meier T., Wicker T., Zeeman S.C., Santelia D. The evolution of functional complexity within the β -amylase gene family in land plants. *BMC Evol. Biol.* 2019;19(1):66. DOI 10.1186/s12862-019-1395-2.
- Vajravijayan S., Pletnev S., Mani N., Pletneva N., Nandhagopal N., Gunasekaran K. Structural insights on starch hydrolysis by plant β -amylase and its evolutionary relationship with bacterial enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;113:329-337. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.138.
- Van Harselaar J.K., Lorenz J., Senning M., Sonnewald U., Sonnewald S. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics.* 2017;18(1):37. DOI 10.1186/s12864-016-3381-z.
- Vinje M.A., Walling J.G., Henson C.A., Duke S.H. Comparative gene expression analysis of the β -amylase and hordein gene families in the developing barley grain. *Gene.* 2019;693:127-136. DOI 10.1016/j.gene.2018.12.041.
- Zeeman S.C., Delatte T., Messerli G., Umhang M., Stettler M., Mettler T., Streb S., Reinhold H., Kötting O. Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Funct. Plant Biol.* 2007;34(6):465-473. DOI 10.1071/FP06313.
- Zhang H., Hou J., Liu J., Xie C., Song B. Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting. *Potato Res.* 2014a;57:47-58. DOI 10.1007/s11540-014-9252-6.
- Zhang H., Liu J., Hou J., Yao Y., Lin Y., Ou Y., Song B., Xie C. The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity. *Plant Biotechnol. J.* 2014b;12(7):984-993. DOI 10.1111/pbi.12221.
- Zhang H., Yao Y., Chen S., Hou J., Yu Y., Liu T., Du J., Song B., Xie C. SbRFP1 regulates cold-induced sweetening of potato tubers by inactivation of *StBAM1*. *Plant Physiol. Biochem.* 2019;136:215-221. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.01.019.
- Zhao L., Yang T., Xing C., Dong H., Qi K., Gao J., Tao S., Wu J., Wu J., Zhang S., Huang X. The β -amylase *PbrBAM3* from pear (*Pyrus betulaefolia*) regulates soluble sugar accumulation and ROS homeostasis in response to cold stress. *Plant Sci.* 2019;287:110184. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110184.

ORCID ID

A.V. Kulakova orcid.org/0000-0002-3124-525X
G.I. Efremov orcid.org/0000-0002-2943-5118
A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.03.2022. После доработки 30.05.2022. Принята к публикации 30.05.2022.