

УДК 581.1.575.113.1

ЭФФЕКТ НЕПОЛНОГО НОКАУТИРОВАНИЯ ГЕНА ПЛАСТИДНОЙ КРАХМАЛФОСФОРИЛАЗЫ *NtPHO1-L1* НА МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ И КАРОТИНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ *Nicotiana tabacum* L.¹

© 2024 г. А. В. Нежданова^а, А. В. Кулакова^{а,*}, М. А. Слугина^а, А. М. Камионская^а,
Е. З. Кочиева^а, А. В. Щенникова^а

^аИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия
*e-mail: kulakova_97@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

Метаболизм крахмала регулируется сложной каталитической сетью, одним из ключевых ферментов которой является пластидная крахмалфосфорилаза PHO1. В нашем исследовании с использованием системы CRISPR-Cas9 были получены растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) с неполным нокаутом гена *NtPHO1-L1* за счет делеционных вариантов каталитического домена белка *NtPHO1-L1*, приводящих к формированию нефункциональных форм фермента. Редактированные линии отличались от растений дикого типа повышенным накоплением крахмала и пониженным содержанием сахаров, хлорофиллов и каротиноидов в ткани листа. Показано, что в сравнении с контролем редактированные растения характеризовались дифференциальной экспрессией генов метаболизма крахмала (*NtPHO1-L1*, *NtGWD*, *NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtAI*) и каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtZDS*, *NtCRTISO*, *NtVDE*), а также генов, кодирующих MADS-доменные транскрипционные факторы (*NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*), которые предположительно участвуют в регуляции транскрипции исследуемых генов метаболизма. Предположено, что неполный нокаут *NtPHO1-L1* приводит к изменению функциональной активности крахмалфосфорилазы табака. Это, в свою очередь, может влиять на скоординированную работу ферментов катаболизма крахмала, а также синтеза хлорофиллов и каротиноидов, возможно, за счет дифференциальной экспрессии MADS-box генов. Наши результаты подчеркивают критическую регуляторную роль пластидной крахмалфосфорилазы в метаболизме транзитного крахмала, а также в стимулирующем влиянии на фотосинтез растения.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, CRISPR-Cas9, крахмалфосфорилаза, метаболизм крахмала, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324050091, EDN: MMAQSH

ВВЕДЕНИЕ

Крахмал представляет собой смесь полисахаридов – линейной амилозы и разветвленного амилопектина, состоящих из мономеров α -глюкозы, связанных α -1,4-глюкозидными связями [1]. В процессе фотосинтеза растения накапливают данный α -1,4-полиглюкан в хлоропластах и затем используют его в ночное время в качестве источника энергии (транзитный крахмал)

или хранят в гетеротрофных органах (запасаемый крахмал) [1]. От особенностей регуляции метаболизма крахмала зависит развитие, стрессоустойчивость и урожайность культурных растений, а также питательность клубней, плодов или зерен [2, 3].

Известны ферменты, участвующие в синтезе и деградации крахмала, а также молекулярно-генетические механизмы регуляции данных путей [1, 2, 4]. Синтез крахмала начинается с катализа АДФ-глюкозопирофосфорилазой (AGP) образования АДФ глюкозы, который утилизируется синтазами крахмала (SS) с образованием линейных цепей α -1,4-глюкана. Один изофермент

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324050091

Сокращения: ТФ – транскрипционные факторы.

синтазы крахмала отвечает за синтез амилозы, тогда как другие участвуют в инициации формирования гранул крахмала и синтезе амилопектина. Точки ветвления внутри амилопектина вводятся изоферментами разветвления крахмала (SBE), и лишние α -1,6-звенья удаляются изоамилазами [2].

Деградацию крахмала запускают α -глюкан водная дикиназа (GWD) и фосфоглюкан-водная дикиназа (PWD), которые нарушают поверхностную структуру гранулы крахмала, делая цепи доступными для α -, β - и изоамилаз [2, 5]. Образующиеся молекулы мальтозы и мальтотриозы расщепляются с высвобождением глюкозы с помощью диспропорционирующих ферментов DPE1 и DPE2, соответственно [5].

Помимо ферментов синтеза или распада крахмала существуют α -глюканфосфорилазы (крахмалфосфорилазы, КФ 2.4.1.1), которые могут участвовать в обоих процессах [6–8]. В зависимости от внутриклеточной локализации и сродства к молекуле крахмала выделяют цитозольные (Н-тип, PNO2, высокое сродство к линейным и разветвленным гликанам) и эволюционно более молодые пластидные (L-тип, PNO1, низкое сродство к разветвленным гликанам и гетерогликанам) изоферменты [6, 9]. Крахмалфосфорилаза PNO1 отличается от PNO2 наличием N-концевого транзитного пептида и характерной вставки L78 [10]. Обе формы способствуют распаду (фосфоролизу) амилопектина, амилозы и мальтодекстрина [11]. Изофермент PNO2 участвует в сложном метаболизме растворимых гетерогликанов в цитозоле, куда они экспортируются во время деградации крахмала [12, 13].

Изофермент PNO1 считается основной формой фосфорилазы в растении [4, 14], поскольку функционирует в пластидах, осуществляя 96% общей фосфорилазной активности у риса (*Oryza sativa*) [15] и являясь вторым по распространенности белком в строме амилопластов кукурузы *Zea mays* [16]. Между уровнем экспрессии гена *PNO1-L1* и содержанием крахмала в плодах тыквы (*Cucurbita* sp.) присутствует прямая взаимосвязь [17]. Показано участие PNO1 в инициации синтеза запасаемого крахмала в эндосперме ячменного (*Hordeum vulgare*) и рисового зерна [7, 15, 18], а также в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum*) [8, 19, 20].

Изменения метаболизма крахмала являются одной из первых биохимических реакций растений на сигналы окружающей среды. Фермент PNO1 может выступать как переключатель между синтезом и деградацией крахмала, необходимый для корректировки роста и развития растения в ответ на воздействие стрессовых факторов. К примеру, отсутствие экспрессии *PNO1 (PHS1)* делает растения *Arabidopsis thaliana* значительно более чувствительными к засухе [14]. Катали-

тическая активность и сродство изофермента PNO1 к разветвленным α -глюканам и глюкозо-1-фосфату зависят от температуры [15]. Если в нормальных условиях снижение экспрессии *PNO1* не меняет морфологию ячменного зерна [21] и клубней картофеля [9], то при низкой температуре это приводит к уменьшению размера рисового зерна и содержания крахмала в нем [15]. Рост экспрессии *PNO1* при низких температурах стимулирует синтез коротких цепей декстринов (основа молекул амилозы) [20] и сопровождается накоплением редуцирующих сахаров в клубнях картофеля [22].

У видов семейства Пасленовых (картофель и томат) описаны два изофермента пластидной крахмалфосфорилазы – PNO1a (L-1) и PNO1b (L-2) [9, 23–26]. Белки гомологичны (идентичность 81–84%) с наибольшей вариабельностью в области N-концевого транзитного пептида и домена L78 [23]. *PNO1a* транскрибируется как в листьях, так и в клубнях, тогда как *PNO1b* – в основном, в листьях; в клубнях белок PNO1a образует гомодимер, а в листьях – как гомодимер, так и гетеродимер с PNO1b [23]. Таким образом, из двух пластидных изоферментов роль PNO1a может быть более важна и функционально широка, чем PNO1b. В пользу этого свидетельствует прямая взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *PNO1a* и содержанием крахмала в плодах томата (*Solanum lycopersicum*) [24] и в листьях растений картофеля при воздействии холода [25]. Также продемонстрирована необходимость *PNO1a* для нормального формирования гранул крахмала в клубнях картофеля, подстрахованная наличием в геноме дублированной копии гена [27]. Нокаут *PNO1a* вызывает снижение содержания крахмала в клубнях в основном за счет уменьшения количества амилозы, при этом не отменяет, но усиливает эффект холодового осахаривания [27]. Миссенс-мутация G261V в функциональном домене PNO1a приводит к изменениям морфологии корней и надземной части растения картофеля, а также содержания крахмала и экспрессии генов метаболизма крахмала в корнях и листьях, в том числе в ответ на воздействие холодового стресса [26].

В данном исследовании мы использовали систему CRISPR-Cas9 для редактирования гена *PNO1-L1* (гомолога *PNO1a* картофеля) в геноме *Nicotiana tabacum* в рамках расширения данных о роли пластидной крахмалфосфорилазы в развитии растения. Нами были получены независимые трансгенные линии, химерные по нокауту *PNO1-L1* за счет нескольких одновременных делеций с последующим сдвигом рамки считывания. Неполный нокаут гена вызвал изменения в содержании углеводов (крахмал, сахароза, глюкоза, фруктоза), хлорофиллов и каротиноидов в листовой ткани проростков. Кроме того, об-

наружены сдвиги в уровне экспрессии *PHO1-L1*, других генов метаболизма крахмала (*NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtGWD*, *NtAI*) и каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtZDS*, *NtCRTISO*, *NtVDE*), а также генов MADS-доменных транскрипционных факторов (ТФ) (*NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*, *NtANR1*, *NtFUL1*). Наши результаты говорят о значимости изофермента *PHO1-L1* в метаболизме крахмала и развитии растения, включая фотосинтез и стрессовый ответ, а также допускают возможность непрямого участия *PHO1a* в регуляции стресс-чувствительных MADS-box генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В исследовании использована культура *in vitro* табака – растения *Nicotiana tabacum* L. (сорт Samsun) на стадии 5–7 листьев, выращенные на МС-среде (Sigma-Aldrich, США), содержащей 0.7% агара и 1.0% сахарозы, в климатической камере (16-часовой фотопериод; 21°C).

Геномное редактирование табака с помощью системы CRISPR-Cas9. Для геномного редактирования табака использовали бинарный вектор p201N-*PHO1a*-gRNA, полученный и успешно примененный ранее для редактирования гена *PHO1a* в геноме *S. tuberosum* [26].

Предварительно была проведена оценка соответствия последовательности гидовой РНК (gRNA) *PHO1a* картофеля соответствующему участку гена *NtPHO1-L1* табака (NCBI Gene ID 107814807). Конструкция собрана на основе бинарного вектора p201N_Cas9 (AddGene, Wattertown, MA, США; кат. № 59175; <https://www.addgene.org/>), Т-область которого включает гены *Cas9* (под контролем двойного промотора CaMV35S) и *NPTII* (устойчивость к канамицину (Km)), а также кассету экспрессии gRNA (промотор *U6.6 Medicago truncatula*) [28].

Конструкцией с gRNA, а также пустым вектором p201N, трансформировали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Суспензию агробактерии p201N-*NtPHO1-L1*-gRNA (опыт) и p201N (контроль), полученную из 5 мл ночной культуры, использовали для трансформации табака, как это описано ранее [29]. Вкратце: листовые экспланты табака, инфицированные соответствующим агробактериальным штаммом, культивировали на питательной среде А3 (минеральный состав и витамины как в МС-среде, 2% глюкоза, 0.7% Plant-агар, 0.1 мг/мл НУК, 1 мг/мл БАП, pH 5.5) для каллусо- и побегообразования [29], одновременно содержащей 500 мг/мл карбенициллина (подавление роста агробактерии) и 100 мг/мл канамицина (селективный антибиотик). Образующиеся на каллусе зеленые побеги срезали и укореняли на свежей среде А3, не содержащей фито-

гормонов. Регенеранты, устойчивые к канамицину, то есть укоренившиеся и давшие первые листья зеленой окраски, адаптировали к условиям теплицы (16-часовой фотопериод; 21°C) и выращивали до созревания семян. Из листовой ткани регенерантов выделяли геномную ДНК и с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности генов *NPTII* (канамицин-резистентность растения) и *virB* (ген агробактерии, участвующий в переносе Т-ДНК), подтверждали присутствие трансгена в геноме растения и отсутствие остаточного заражения агробактерией. Всего было получено 17 независимых регенерантов с конструкцией p201N-*NtPHO1-L1*-gRNA (опыт; Nt1–Nt17) и 13 – p201N (контроль), 12 и 8 из которых, соответственно, оказались трансгенными. У данных растений анализировали редактируемую область гена *NtPHO1-L1* (см. следующий пункт), на основе чего выбирали трансгенные линии, в геноме которых произошло событие редактирования *NtPHO1-L1*. Из 12 независимых трансгенных линий только растение Nt1 показало данный эффект. Семена данного растения проращивали на среде А3 с 100 мг/мл канамицина, и устойчивые проростки поколения T₁ в количестве 20 шт. адаптировали к теплице и анализировали в сравнении с контролем (сроки инициации цветения, морфологические характеристики; последовательность целевого сайта редактирования; уровень экспрессии генов). При анализе морфологических параметров использовали: среднее значение по 20 растениям контроля vs. средние значения по всем 20 растениям T₁; среднее значение по 20 растениям контроля vs. значение параметра для каждой отдельной отобранной линии T₁.

Анализ редактируемой области гена *NtPHO1-L1*. Геномную ДНК выделяли из листовой ткани трансгенного побега (первично полученные регенеранты поколения T₀) с помощью стандартного СТАВ-метода. С использованием соответствующих праймеров (табл. 1, Дополнительные материалы) амплифицировали участок гена *NtPHO1-L1*, содержащий сайт редактирования (последовательность гидовой РНК): программа ПЦР – 5 мин, 95°C; 35 циклов (30 с, 95°C; 30 с, 59°C; 1 мин, 72°C); 10 мин, 72°C. Продукты ПЦР ожидаемого размера (641 пн) очищали выделением из агарозного геля (QIAEX® II Gel Extraction Kit, QIAGEN, Германия), клонировали в вектор pGEM®-T Easy (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, США) и секвенировали по 10 плазмидных клонов (ABI PRISM 3730 DNA Analyzer, ЦКП “Биоинженерия”, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Анализ экспрессии генов. Верхушечные листья проростка (в фазе развития 5–7 листа) растирали в жидком азоте и из 0.2–0.5 г

выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия) с последующим синтезом кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Полученный препарат кДНК в количестве 3 нг использовали для проведения количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Последовательности ген-специфичных праймеров для ПЦР-РВ приведены в таблице 1 Дополнительных материалов [29]. Для реакции применены: стандартная программа (5 мин, 95°C, 40 циклов (15 с, 95°C; 40 с, 60°C)); “Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I” (кат. № R-402, Синтол, Россия); референсный ген *Actin-7* (LOC107831145) *N. tabacum* [29].

Анализ содержания каротиноидов, хлорофиллов и углеводов. Количество (мкг/г сырого веса) хлорофиллов (*a* и *b*) и каротиноидов определяли в ткани верхушечных листьев проростка (фаза развития 5–7 листа; те же тканевые пробы, что и для анализа экспрессии генов), согласно [29], с регистрацией спектров поглощения с помощью Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

В той же ткани определяли содержание крахмала и сахаров (мг/г сырого веса). В случае крахмала – ~0.5 г ткани растирали, суспендировали в 4.5 мл 33% (об./об.) ДМСО, содержащего 0.44 М соляной кислоты, инкубировали 30 мин при 60°C на водяной бане, охлаждали до 25°C и разводили водой в соотношении 1:5. Далее доводили рН до 4.5 с помощью 5 М NaOH и фильтровали суспензию через Miracloth (Merck, США). Содержание крахмала (мг/г сырого веса) измеряли в 100 мкл фильтрата с использованием набора Starch (BoehringerMannheim/R-Biopharm, Швейцария). Содержание сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) определяли с помощью тестов Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия).

Структурный анализ и статистическая обработка данных. Сравнительный анализ последовательностей ДНК и белков проводили с помощью NCBI-BLAST, NCBI-CDD (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для анализа влияния замещений аминокислотных остатков (ао) на структуру и функцию редактированных белков использовали PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>; “deleterious variant if score < -2.5”) и Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>; анализ 3D структуры белка). Поиск сайтов связывания с MADS-доменными ТФ в промоторе гена осуществляли с помощью программы PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>).

Данные биохимического и экспрессионного анализа статистически обрабатывали с помощью Graph Pad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>, США), применяя для оценки значимости различий One-way ANOVA (“multiple comparisons, corrected with Bonferroni test”). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) на основе двух биологических и трех технических повторов (различие достоверно при значении $P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Трансгенные линии табака *N. tabacum* с редактированным геном *NtPHO1-L1*. Поиск в геноме *N. tabacum* обнаружил два паралогичных гена пластидной формы крахмалфосфоорилазы *NtPHO1-L1*, гомологичной *PHO1a* картофеля: LOC107814807 (два варианта мРНК – X1 (XM_016640265.1) и X2 (XM_016640266.1)) и LOC107810306 (один вариант мРНК (XM_016635072.1)). Гены отличаются локализацией (разные скаффолды), количеством экзонов (16 и 15, соответственно) и размером (9533 и 9490 пн). В сравнении с изоферментом LOC107810306 (976 ао), изоформа X2 (977 ао, LOC107814807) характеризуется 13 замещениями ао и инсерцией E590. Обе последовательности отличаются от изоформы X1 (1011 ао, LOC107814807) размером (за счет делеции 34 ао E74–G107 в N-концевой области); остальная последовательность X2 идентична X1.

Сравнительный анализ всех трех возможных кодирующих последовательностей показал, что гидовая РНК (gRNA) 5'-gatcagatggaagaggattgg-3', которая была использована ранее для редактирования гена *PHO1a* картофеля [26], подходит и для редактирования обеих версий гена *NtPHO1-L1* табака. Данный участок локализован в положении 1109–1131 н (мРНК XM_016635072.1 гена LOC107810306; экзон XI) и 1141–1163/1039–1061 н (мРНК изоформ X1 (XM_016640265.1)/X2 (XM_016640266.1) гена LOC107814807; в экзонах VI и V, соответственно). В целевой последовательности мРНК гена LOC107810306 присутствовала замена (1124g→а положение в мРНК; или 16g→а – в gRNA).

Выбранная нами последовательность gRNA не совпадала по локализации с gRNA, использованной в недавнем исследовании нокаута *PHO1a* в геноме картофеля [27]. Участок gRNA (5'-gctgttgcaagaatgcctt-3') из этой работы локализуется в мРНК *NtPHO1-L1* табака в положениях 631–650 н (LOC107810306) и 663–682/561–580 н (изоформы X1/X2, LOC107814807). Поэтому в результате нокаута *NtPHO1-L1* растения табака должны формировать белковые молекулы в 2 раза длиннее, чем в работе [27].

Также было определено, что выбранная нами последовательность gRNA не гомологична кДНК гена *NtPHO1-L2* (XM_016590767.1, LOC107771409), кодирующего изофермент L-2 α -1,4-глюканфосфорилазы.

В результате агробактериальной трансформации табака векторной конструкцией, содержащей выбранную gRNA, было получено 12 независимых, устойчивых к антибиотику канамицину регенерантов T₀ и с помощью ПЦР на геномной ДНК подтверждено присутствие в геноме переносимой кассеты для редактирования. Внешне растения T₀ не отличались по морфологическим признакам ни от нетрансгенных линий, ни от трансгенных линий, трансформированных пустым вектором p201N.

На геномной ДНК линий был амплифицирован фрагмент, содержащий целевой сайт редактирования. Клонирование и секвенирование фрагмента выявило несколько событий редактирования в геноме растения Nt1. Пять из 10 секвенированных вариантов целевого сайта соответствовали дикому типу (LOC107810306 и LOC107814807). Остальные содержали пять вариантов делеций: (1) a13-g17-del(5nt)#; (2) a13-t18-del(6nt)#; (3) a11-g17-del(7nt)#; (4) a/g16-g17-del(2nt)#; (5) a11-t18-del(8nt)# (из-за разной длины трех вариантов транскриптов *NtPHO1-L1* локализация делеций указана по целевому участку 5'-gatcagatggaagaggtattgg-3') (рис. 1а).

Вариантов делеционных событий, указывающих на то, что использованная gRNA была действительна в отношении гена LOC107810306 с заменой 16g→a в целевом сайте, не наблюдалось.

Дальнейший анализ транскрибируемых последовательностей показал, что варианты 1, 3, 4 и 5 приводят к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременных стоп-кодонов. В варианте 2 произошла делеция 6 нуклеотидов, которые не совпадали с кодирующими аминокислоты кодонами, вследствие чего в белке вместо делеции двух аминокислот три ао были замещены остатком аспарагина (N) (рис. 1б).

В случае гена LOC107810306 (один вариант мРНК XM_016635072.1), кодирующего белок размером 976 ао, вариант 2 составил 974 ао, а варианты 1, 3, 4 и 5 – 286, 280, 285 и 287 ао, соответственно. В случае гена LOC107814807 (изоформа мРНК X1, XM_016640265.1), кодирующего белок размером 1011 ао, вариант 2 составил 1009 ао, а варианты 1, 3, 4 и 5 – 320, 314, 321 и 319 ао, соответственно. В случае гена LOC107814807 (изоформа мРНК X2, XM_016640266.1), кодирующего белок размером 977 ао, вариант 2 составил 975 ао, а варианты 1, 3, 4 и 5 – 286, 280, 287 и 285 ао, соответственно.

Согласно NCBI-CDD, функциональный домен GT35_Glycogen_Phosphorylase (cd04300)

расположен на участке 91–970 (LOC107810306), 125–1005 (LOC107814807, X1) и 91–971 (LOC107814807, X2) ао. Данный домен состоит из N- и C-концевых доменов, разделенных участком L78 (в позиции 497–572, 531–607 и 497–572 ао, соответственно), который включает каталитический центр и обеспечивает высокую степень гибкости белка. То есть, варианты 1, 3, 4 и 5 содержат только начало N-концевого домена GT35 и не имеют каталитического центра. Вариант 2 содержит замещение в N-концевом домене GT35 (K274–Y276delinsN, K308–Y310delinsN и K274–Y276delinsN, соответственно) (рис. 1б).

Дальнейший анализ показал, что варианты замещения K–YdelinsN не приходятся на активные каталитические или белок-связывающие сайты (согласно NCBI-CDD), однако являются радикальными (по прогнозу PROVEAN) для всех трех исходных форм белков (score = –8.649/–8.181/–8.817). Поэтому три варианта с замещением KKY или KRY на N в последовательности N-концевой области GT35, предположительно, могут иметь функциональные нарушения. В норме, структура N- и C-концевых частей домена GT35 представляет собой укладку Россмана (Rossmann fold), которая, в числе прочего, характеризуются наличием параллельных β -листов (NCBI-CDD). Анализ пространственной структуры белков (Phyre2) показал, что замещения KKY или KRY на N могут привести к потере одного из β -листов (рис. 1в), что свидетельствует в пользу нарушения функции таких белков.

Таким образом, в растении Nt1 могут синтезироваться три варианта белка дикого типа, а также нефункциональные три варианта с замещением K–YdelinsN и 12 значительно укороченных вариантов белка.

Далее были проанализировано поколение T₁ от линии Nt1, среди которых было отобрано три растения (Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15), содержащие все пять вариантов обнаруженных ранее делеций (рис. 2а). Сравнительный морфологический анализ показал, что в среднем поколение T₁ (20 растений) не отличается от контроля по времени инициации цветения и весу семян с одной коробочки (рис. 2б). В то же время были отмечены статистически значимые изменения у выбранных трех отдельных растений: Nt1-13 имело более короткий стебель; Nt1-15 формировало больше листьев; все три растения Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 образовывали меньше цветков (рис. 2б). Кроме того, визуально была заметна разница в яркости зеленой окраски листьев у Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с контролем (рис. 2а).

Содержание углеводов и пигментов в листьях. Присутствие нефункциональных вариантов крахмалфосфорилазы, вероятно может повлиять на содержание, в первую очередь, углеводов, и, как следствие, пигментов, связанных

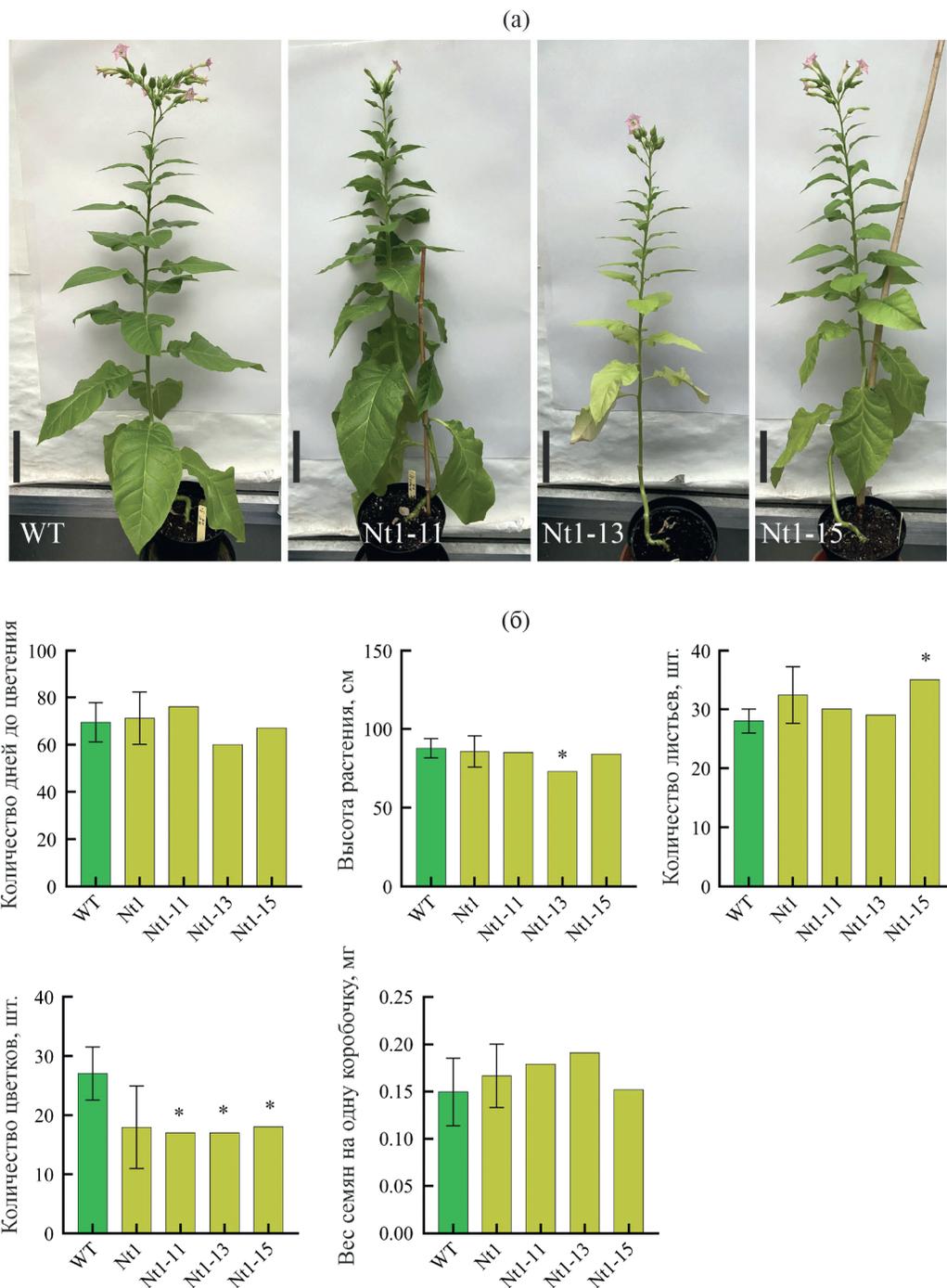


Рис. 2. Трансгенные линии *Nicotiana tabacum* (Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15) с мозаично нокаутированным геном пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* в сравнении с нетрансгенным контролем (WT): (а) – фотографии растений WT, Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 на стадии цветения (масштаб 10 см); (б) – сравнение основных характеристик контрольных (WT, среднее по 20 растений) и редактированных линий T1 от Nt1 (среднее по 20 растений Nt1-1–Nt1-20); далее по графику даны индивидуальные значения для каждого из анализируемых растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15). * $P < 0.05$ – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

с фотосинтезом, что косвенно подтверждается регистрируемыми нарушениями морфологических параметров и окраски листьев у линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15. Нами было определено содержание крахмала, сахарозы, фруктозы, глюкозы, а также суммы каротиноидов и хлорофил-

лов *a* и *b* в листьях трансгенных линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с растениями дикого типа.

Было показано, что у всех трех линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 значительно повысилось содержание крахмала (в ~10, 37 и 12 раз, соответственно)

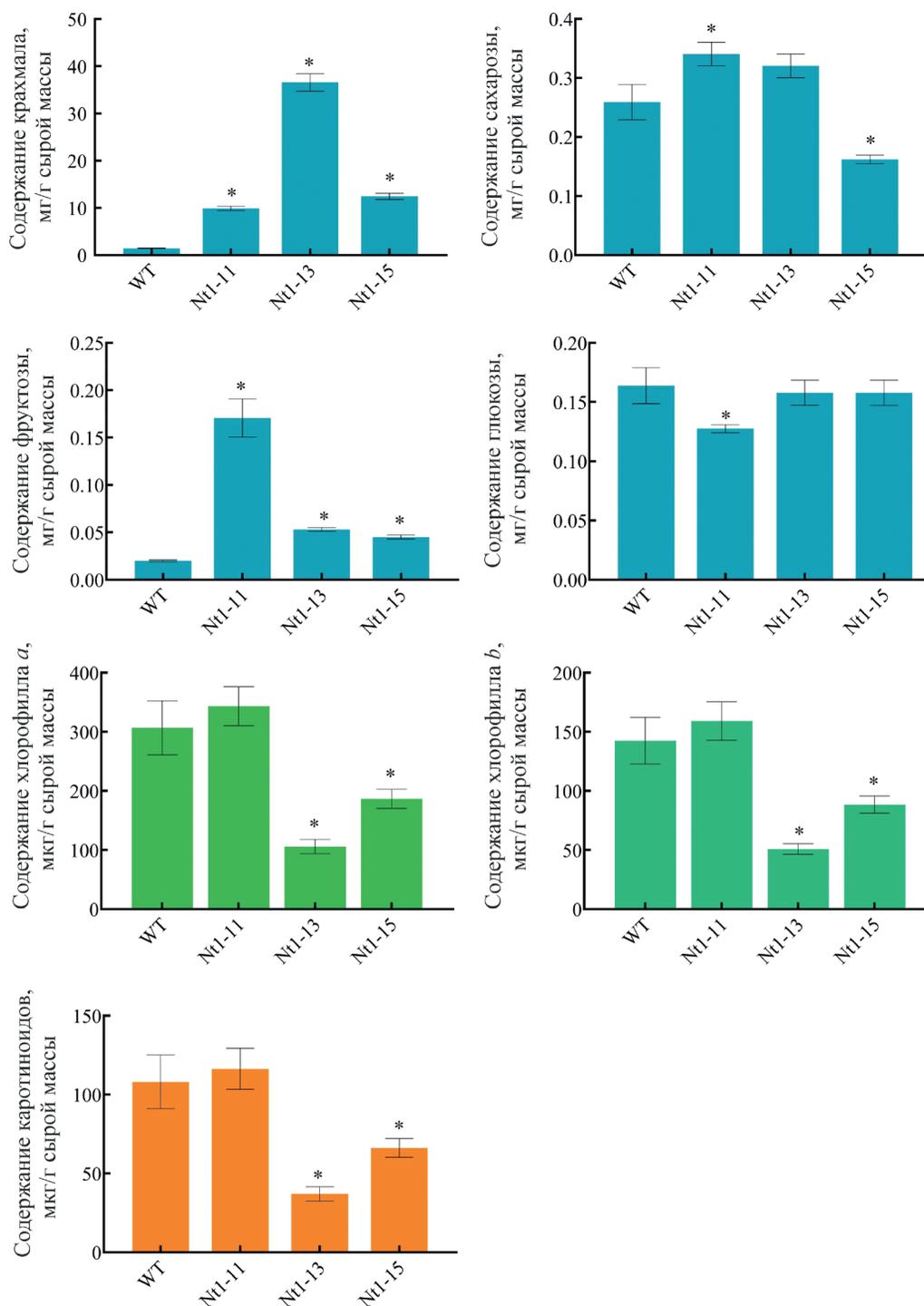


Рис. 3. Содержание крахмала, сахарозы, глюкозы, фруктозы (мг/г сырой массы), суммы каротиноидов и хлорофиллов а и b (мкг/г сырой массы) в листовой ткани растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с нетрансгенным контролем WT. *P < 0.05 – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

и фруктозы (в ~8, 2 и 2 раза, соответственно). Количество сахарозы и глюкозы достоверно снизилось у растений Nt1-15 и Nt1-11, соответственно (рис. 3). В сравнении с контролем количество как каротиноидов, так и хлорофиллов в листьях линии Nt1-11 не изменилось, тогда как у редактированных линий Nt1-13 и Nt1-15 значительно

уменьшилось; при этом содержание каротиноидов прямо коррелировало с содержанием хлорофиллов (рис. 3). Наблюдаемые различия между редактированными линиями могут быть связаны с разной степенью полноты (как по числу клеток, так и по числу аллелей (4 с учетом двух генов)) произошедшего редактирования.

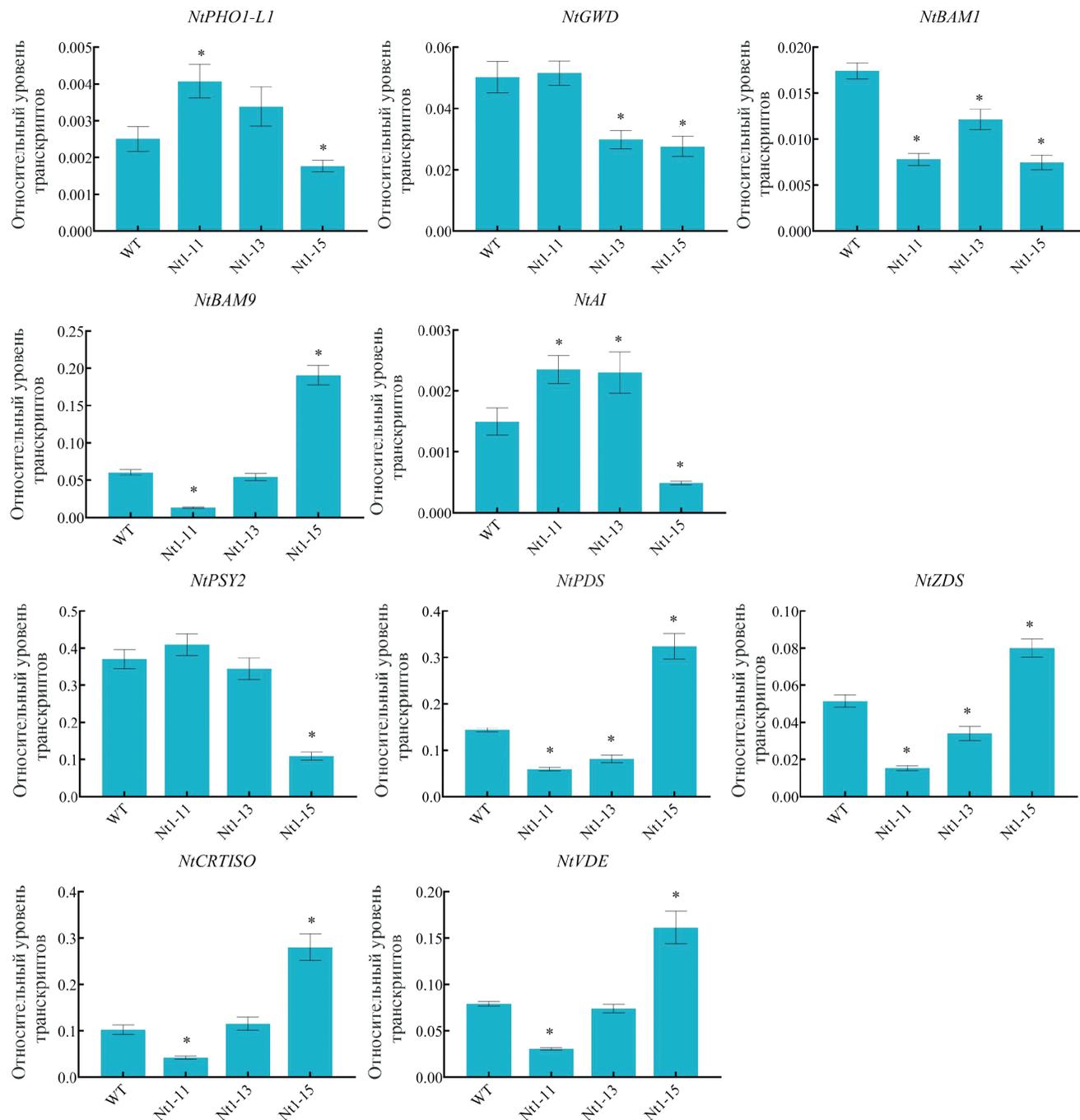


Рис. 4. Экспрессия генов метаболизма крахмала (*NiPHO1-L1*, *NiGWD*, *NiBAM1*, *NiBAM9*, *NiAI*) и биосинтеза каротиноидов (*NiPSY2*, *NiPDS*, *NiCRTISO*, *NiZDS*, *NiVDE*) в листовой ткани растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с нетрансгенным контролем WT. *P < 0.05 – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

Профиль экспрессии генов метаболизма крахмала и каротиноидов в листьях. Принимая во внимание взаимосвязь и взаимное влияние количества метаболитов и экспрессии соответствующих генов, а также неполное редактирование гена *NiPHO1-L1* у линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15, мы проверили, в первую очередь, уровень транскриптов гена *NiPHO1-L1*. В сравнении с контролем количество мРНК гена увеличилось (Nt1-11), не изменилось (Nt1-13) или

уменьшилось (Nt1-15) (рис. 4). Далее была определена экспрессия отдельных генов метаболизма крахмала, кодирующих α -глюкан водную дикиназу (*NiGWD*), β -амилазы (*NiBAM1*, *NiBAM9*) и ингибитор амилаз (*NiAI*). Мы обнаружили, что уровень транскриптов *NiGWD* не изменился (Nt1-11) или снизился в ~2 раза (Nt1-13, Nt1-15); *NiBAM1* – снизился у всех трех линий в ~2 (Nt1-11, Nt1-15) и 1.5 (Nt1-13) раза; *NiBAM9* – уменьшился в ~5 раз (Nt1-11), не изменился

Таблица 1. Наличие CArG-box в последовательности промотора генов метаболизма углеводов и каротиноидов у *Nicotiana tabacum*

Ген	NCBI ID	Скаффолд (локализация гена)	Локализация промотора (1.5 кб)	Локализация CArG-box в промоторе (CARGCW8GAT)
<i>NtBAM1</i>	LOC107832261	NW_015787824.1 (26358..29662)	24858–26357	416, 1117
<i>NtBAM9</i>	LOC107827956	NW_015849100.1 (4074..7620, complement)	7621–9121	1368
	LOC107780374	NW_015797716.1 (8065..13004)	7565–8064	1556, 1771
<i>NtGWD</i>	LOC107832610	NW_015793074.1 (251..14125)	0–251*	—
	LOC107775774	NW_015901023.1 (87993..98472, complement)	86493–87992	878, 1218
<i>NtAI</i>	LOC107802234	NW_015802778.1 (26868..31183)	25368–26867	235, 383, 1710
<i>NtPHO1-L1</i>	LOC107810306	NW_015804840.1 (2762..12251, complement)	12252–13751	246
	LOC107814807	NW_015809487.1 (94062..103594)	92562–94061	232, 432
<i>NtPSY2</i>	LOC107772713	NW_015796120.1 (9958..12592)	8458–9957	—
	LOC107761716	NW_015874368.1 (9940..13765)	8440–9939	—
<i>NtZDS</i>	LOC107772271	NW_015892502.1 (11995..18341, complement)	18342–19842	964
<i>NtPDS</i>	LOC107816873	NW_015814914.1 (652..8553)	0–651*	270, 418
<i>NtCRTISO</i>	LOC107832559	NW_015864184.1 (1937..8985, complement)	8986–10485	—
	LOC107791326	NW_015919655.1 (47476..54454, complement)	54455–55954	462, 1675
<i>NtVDE</i>	LOC107780507	NW_015797768.1 (65794..70434)	64294–65793	1155, 1597
	LOC107763628	NW_015880850.1 (21643..26233)	20143–21642	1272, 1625

*Доступные в NCBI геномные последовательности не позволяют идентифицировать участки промотора размером 1.5 кб.

(Nt1-13) или вырос в ~4 раза (Nt1-15); *NtAI* – вырос в ~1.5 раза (Nt1-11, Nt1-13) или уменьшился в ~3 раза (Nt1-15) (рис. 4). Профиль экспрессии *NtPHO1-L1* и других тестируемых генов метаболизма крахмала (рис. 4) не коррелировал с содержанием крахмала или тестированных сахаров (рис. 3).

Последующий анализ экспрессии генов биосинтеза каротиноидов, кодирующих фитоинсинтазу (*NtPSY2*), фитоиндесатуразу (*NtPDS*), цис-транс-каротиноидизомеразу (*NtCRTISO*), 15-цис- ζ -каротинизомеразу (*NtZDS*) и виолаксантиндеэпоксидазу (*NtVDE*), также обнаружил различия в сравнении с контролем. Было показано, что уровень транскриптов *NtPSY2* изменился только у Nt1-15 (снизился в ~3 раза); *NtPDS* – в ~2 раза снизился (Nt1-11, Nt1-13) или поднялся (Nt1-15); *NtCRTISO* – уменьшился в ~2 раза (Nt1-11), не изменился (Nt1-13) или возрос в ~2.5 раза (Nt1-15); *NtZDS* – снизился в ~3/1.5 раза (Nt1-11/Nt1-13) или увеличился в ~1.5–2 раза (Nt1-15); *NtVDE* – снизился

в ~3 раза (Nt1-11), не изменился (Nt1-13) или вырос в ~1.5–2 раза (Nt1-15) (рис. 4). Корреляций уровня экспрессии генов каротиногенеза с содержанием каротиноидов выявлено не было. Также не обнаружено взаимосвязи с содержанием крахмала/сахаров и с уровнем транскриптов генов метаболизма крахмала.

Профиль экспрессии MADS-box генов в листьях. Предполагая, что ТФ, гомологичные SEP и FUL, могут участвовать в регуляции транскрипции генов метаболизма крахмала и каротиноидов (согласно [30, 31]), мы проанализировали, во-первых, присутствие сайтов связывания CArG-box в промоторной области анализируемых генов, и, во-вторых, экспрессию MADS-box генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* и *NtFUL1* в листьях редактированных растений.

В результате было показано, что промотор (1.5 кб) большинства анализируемых генов содержит по два CArG-box (табл. 1). Ни одного сайта не было найдено в промоторе гена *NtPSY2* (оба гомолога), а также в случае одной из двух

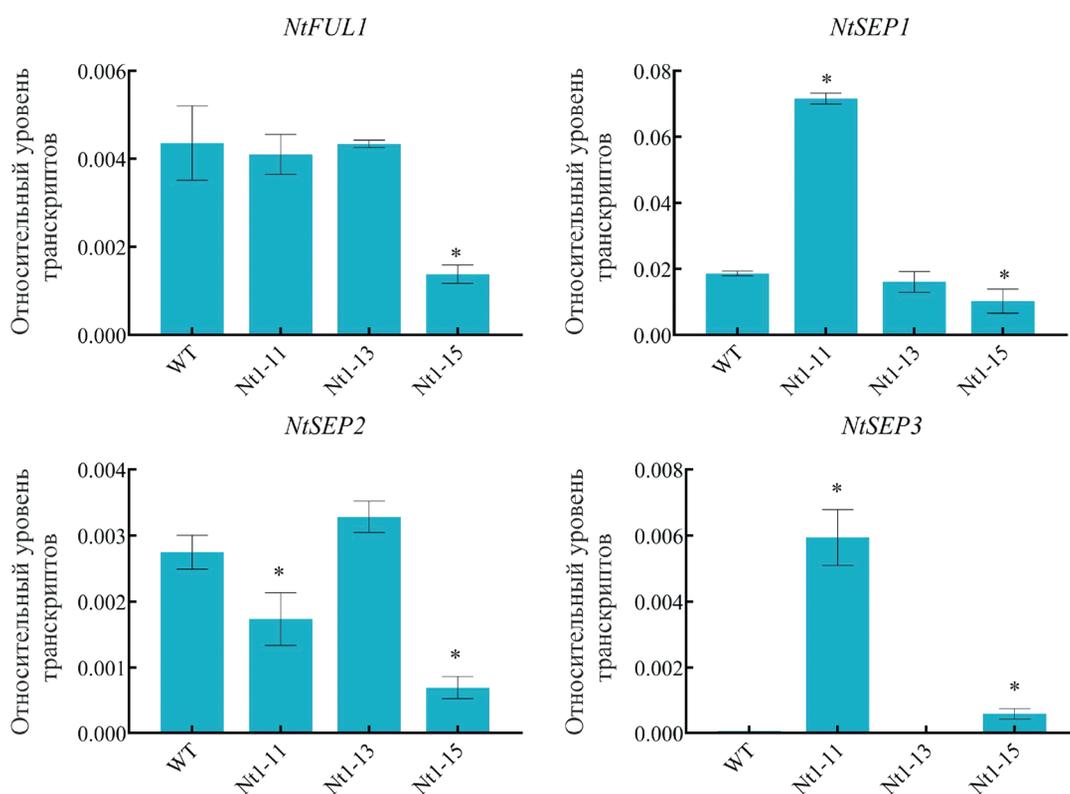


Рис. 5. Экспрессия генов MADS-домениных ТФ (*NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*) в листовой ткани растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с нетрансгенным контролем WT. *P < 0.05 – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

версий генов *NtCRTISO* и *NtGWD* (для *NtGWD* причина может быть в доступной слишком короткой последовательности промотора – 251 н). Промотор гена *NtZDS* и второй версии генов *NtVAM9* и *NtPHO1-L1* содержал только по одному CA₂G-box (табл. 1).

Проведенный далее анализ экспрессии MADS-box генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* и *NtFUL1* показал наличие транскриптов *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtFUL1* в листьях контроля и всех трех редактированных линий, тогда как мРНК *NtSEP3* присутствовала только у Nt1-11 и, почти на порядок меньше, у Nt1-15 (рис. 5). В сравнении с контролем уровень транскриптов *NtFUL1* не изменился (Nt1-11, Nt1-13) или снизился в 2-3 раза (Nt1-15); *NtSEP1* – не отличался (Nt1-13), в ~3.5 раз вырос (Nt1-11) или в ~1.1 раз снизился (Nt1-15); *NtSEP2* – не менялся (Nt1-13) или был в ~1.2/5 раз ниже (Nt1-11/Nt1-15) (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Подобно другим метаболическим путям, протекающим в растении, регуляция пути метаболизма крахмала зависит от уровней содержания метаболитов, активности ферментов и экспрессии генов, кодирующих ферменты.

Помимо ферментов, катализирующих анаболизм или катаболизм α-1,4-полиглюкана, имеется пластидная крахмалфосфорилаза L-типа (PHO1), которая уникальна своим участием и в деградации, и в синтезе крахмала [27]. PHO1 катализирует фосфоролитическое расщепление крахмала, расположенных на поверхности крахмальных гранул или образующихся в результате деградации крахмала. Происходит высвобождение молекул глюкозо-1-фосфата, который преобразуется в АДФ-глюкозу и далее в АТФ (источник энергии для всех биохимических процессов в растении). То, что глюкозо-1-фосфат дает больше АТФ, чем свободная глюкоза, образующаяся в процессе гидролиза, подчеркивает важность фосфорилазы и, следовательно, крахмалфосфорилаз [1, 2, 4, 27]. Роль PHO1 в синтезе крахмала заключается в образовании под ее действием в пластидах при деградации крахмала мальтоолигосахаридов, которые участвуют в создании праймирующих структур на начальных стадиях инициации крахмальных гранул [8]. Подтверждением данной роли PHO1 является положительная корреляция уровня экспрессии гена *PHO1* с содержанием α-1,4-полиглюкана в запасяющих органах растения [7, 8, 15, 17–20]. Неясно, есть ли подобная зависимость для транзитной формы крахмала,

поскольку показано, что эффект от выключения активности пластидной крахмалфосфорилазы различается для запасаемого и транзитного крахмала [27].

Данное исследование было сфокусировано на роли *PHO1a* в метаболизме транзитного крахмала, для чего было получено двенадцать независимых трансгенных линий *N. tabacum* с неполным нокаутом гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* (LOC107814807 и, возможно, LOC107810306) (рис. 16, в). Растения поколения T_1 одной из линий (*Nt1*) внешне незначительно отличались от контроля, за исключением ослабления зеленой окраски листьев у отдельных образцов (*Nt1-13*, *Nt1-15*) при сохранении ярко-зеленой окраски другими образцами (например, *Nt1-11*, отобранный для дальнейшего анализа) (рис. 2а, б). Поскольку все три упомянутых растения характеризовались присутствием всех выявленных пяти вариантов делеций в геноме, сравнительный анализ их реакции на неполный нокаут *NtPHO1-L1* мог способствовать пониманию функции данного гена.

Поскольку нашей целью была связь пластидной крахмалфосфорилазы с транзитным крахмалом, дальнейший анализ проводился на листьях взрослых растений *Nt1-11*, *Nt1-13* и *Nt1-15*. Тестирование листовой ткани биохимическими методами показало, что даже частичное нокаутирование гена *NtPHO1-L1* способно привести к значительному повышению содержания крахмала (рис. 3). Предположительно, это происходит в результате сдвига метаболизма крахмала в сторону его синтеза и, следовательно, может означать, что в норме *NtPHO1-L1* оказывает значительное и предпочтительное влияние на деградацию транзитного крахмала. Полученные нами данные не согласуются с показанным другими исследователями сохранением количества крахмальных гранул в хлоропластах листьев картофеля при снижении уровня экспрессии гена *PHO1b* или нокауте гена *PHO1a* [27]. Также отличается показанный эффект от реакции запасаемого крахмала в клубнях картофеля, где нокаут *PHO1a* привел к снижению содержания крахмала, при этом повышение количества редуцирующих сахаров [27] сходится с нашими результатами только в отношении фруктозы (рис. 3). Это еще раз подтверждает, что *PHO1* может вести себя по-разному в отношении двух форм крахмала.

Известна положительная взаимосвязь между процессами биосинтеза крахмала и фотосинтезом [32]. Биохимическое тестирование растений *Nt1-11*, *Nt1-13* и *Nt1-15* показало отсутствие корреляции между количеством крахмала и накоплением хлорофиллов и каротиноидов как компонентов фотосинтетического аппарата (рис. 3).

Так, содержание крахмала было повышенным в листьях всех трех анализируемых линий, при этом только у двух линий произошли изменения в содержании хлорофиллов и каротиноидов в сторону существенного снижения (рис. 3), что отразилось на окраске листьев (рис. 2). Это предполагает существование не прямой, более сложной зависимости между содержанием крахмала и пигментов.

Наблюдаемые изменения содержания крахмала могут влиять на активность других ферментов, связанных с его метаболизмом, экспрессия которых может регулироваться крахмалом как субстратом или продуктом [27]. Для лучшего понимания происходящего мы провели анализ экспрессии основных (помимо крахмалфосфорилазы *PHO1*) генов деградации крахмала, кодирующих α -глюкан водную дикиназу *NtGWD*, β -амилазы *NtBAM1* и *NtBAM9*, а также ингибитор α - и β -амилаз *NtAI*. Гены амилаз были выбраны по гомологии генам β -амилаз картофеля *BAM1* и *BAM9*, о которых известно, что они участвуют в деградации крахмала, действуя в паре: не обладающий каталитической активностью *BAM9* связывается одновременно с поверхностью крахмальных гранул и с *BAM1*, привлекая ферментативно активный *BAM1* к областям деградации крахмала [33]. Ингибитор амилаз *AI* способен связываться с *BAM1* и *BAM9*, блокируя активный центр или изменяя конформацию молекул [34].

Наши данные показали, что гены *NtBAM1*, *NtBAM9* и *NtAI* под влиянием частичного нокаута *NtPHO1-L1* дифференциально экспрессировались в листьях изучаемых линий, но без какой-либо тенденции (рис. 4). Это может свидетельствовать о попытках редактированных растений приспособиться к частично отсутствующей активности крахмалфосфорилазы и адаптировать метаболизм крахмала с привлечением гидролитических ферментов. Отдельные гены меняли свою экспрессию сходным между редактированными растениями образом. Так, уровень мРНК гена каталитически активного *NtBAM1* снижался во всех трех линиях, и там же увеличивалось содержание крахмала (рис. 4). Однако, в целом, схема приспособления оказалась специфична для каждого конкретного растения, и регуляция, предположительно, могла осуществляться за счет комбинирования разных уровней экспрессии генов *NtGWD* (открытие доступа амилазам к грануле крахмала), *NtBAM9* (сродство к грануле крахмала и привлечение *NtBAM1*) и *NtAI* (ингибирование активности амилаз).

К примеру, у растения *Nt1-11* (vs. контроль) уровень транскриптов *NtGWD* сохранился, однако экспрессия *NtBAM1* и *NtBAM9* снизилась, а *NtAI* повысилась (рис. 4). То есть, деградация

крахмала может быть снижена за счет ослабления процесса привлечения активного NtBAM1 к грануле, уменьшения количества белка NtBAM1 и роста ингибиторной активности по отношению к амилазам.

У растения Nt1-13 (vs. контроль) уровень транскриптов *NtGWD* снизился, экспрессия *NtBAM9* не изменилась, *NtBAM1* снизилась, а *NtAI* повысилась (рис. 4). Деградация крахмала может быть снижена за счет снижения доступа амилаз к грануле, уменьшения количества активного фермента NtBAM1 и увеличения ингибиторной активности по отношению к амилазам (самое значительное среди образцов увеличение содержания крахмала) (рис. 3).

У растения Nt1-15 (vs. контроль) уровень транскриптов *NtGWD* снизился, экспрессия *NtBAM9* повысилась, а *NtBAM1* и *NtAI* снизилась (рис. 4). Деградация крахмала может быть снижена за счет снижения доступа амилаз к грануле и уменьшения количества активного фермента NtBAM1.

Таким образом, во всех трех случаях произошло замедление гидролиза крахмала и, как следствие, сдвиг метаболизма в сторону синтеза. Если сравнивать с контролем, то, исходя из содержания крахмала (рис. 3), растения Nt1-11 и Nt1-15 более успешно, чем Nt1-13 противостояли частичному нокауту *NtPHO1-L1*. Если исходить из окраски листьев и параметров растения, то адаптация образца Nt1-11 была более полной, чем Nt1-15. Растения не различались по высоте (рис. 2), листья Nt1-15 были светлее, чем листья Nt1-11 (но зеленее, чем листья Nt1-13), и содержали крахмала меньше, чем Nt1-15, что ближе к контрольному значению (рис. 3).

Успешность приспособления Nt1-11 к частичному нокауту *NtPHO1-L1* отразилась и в количестве хлорофиллов/каротиноидов в листовой ткани, которое не отличалось от контроля. Поэтому для большего понимания происходящего нами был проведен анализ экспрессии генов табака, кодирующих ферменты основных этапов биосинтеза каротиноидов – PSY2, PDS, ZDS, CRTISO и VDE. С работы фитинсинтазы PSY (в фотосинтезирующей ткани активен преимущественно светозависимый, хлоропласт-специфичный изофермент PSY2) начинается синтез каротиноидов. Далее, предшественник каротиноидов 15-*цис*-фитоин, преобразуется под действием фитоиндесатуразы PDS, ζ -каротиндесатуразы ZDS и *цис-транс*-каротиноидизомеразы CRTISO в *транс*-ликопин. Потом синтезируются ксантофиллы, в том числе виолаксантинового цикла, где виолаксантиндеоксидаза VDE играет важную роль в регуляции перераспределения энергии света между виолаксантином, зеаксантином (ксантофиллы) и хлорофиллом *a* [35].

В результате было показано, что образцы Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 отличаются от контроля уровнем экспрессии большинства проанализированных генов, при этом профиль различий индивидуален для каждого из трех растений (рис. 4). Неполный нокаут *NtPHO1-L1* очевидно нарушил согласованную работу ферментов катаболизма крахмала и биосинтеза каротиноидов. При этом каких-либо корреляций с содержанием каротиноидов (рис. 3) выявлено не было.

С регуляцией биосинтеза каротиноидов и углеводов в растениях связывают важнейшие регуляторы развития растений – MADS-доменные ТФ, сайты связывания (консенсус $CC(A/T)_6GG$, или CArG-box) с которыми обнаружены в регуляторной области почти всех генов каротиногенеза, а также некоторых генов углеводного метаболизма (например, инвертаз, гидролизующих сахарозу) [30]. Взаимодействие подтверждено опытным путем на примере томата при поиске генов-мишеней ТФ RIPENING INHIBITOR (MADS-RIN, подсемейство SEP). ТФ MADS-RIN в комплексе с другими MADS-доменными ТФ – гомологами FRUITFULL (FUL) и AGAMOUS (AG), определяет созревание плода томата; связывание тетрамерных MADS-комплексов с промоторами генов-мишеней задействует два CArG-box мотива [30]. На примере плода банана показано участие MADS-box генов, гомологичных *RIN*, в регуляции метаболизма крахмала [36].

Проведенный анализ промоторов изучаемых генов деградации крахмала и биосинтеза каротиноидов подтвердил присутствие у большинства генов по два консенсуса CArG-box, необходимых для связывания с комплексом MADS-доменных ТФ (табл. 1). Следовательно, транскрипция генов метаболизма крахмала, как и генов каротиногенеза, может находиться под контролем MADS-доменных ТФ. Таким образом, дифференциальная экспрессия MADS-box генов в ответ на изменение содержания углеводов и каротиноидов, также возможна.

В нашей работе анализируется ткань листа, поэтому мы выбрали для анализа гены *NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtSEP3*, так как в вегетативной ткани могут экспрессироваться гены подсемейств *SEP* и *FUL* [31].

В результате было показано, что у образца Nt1-13, в листе которого наиболее существенно снизилось количество хлорофиллов/каротиноидов и поднялось содержание крахмала, уровень транскриптов всех проанализированных MADS-box генов не отличался от контроля (рис. 5). В то же время у двух других образцов – Nt1-11 и Nt1-15, где количество крахмала выросло, но меньше, чем у Nt1-13, а количество пигментов не изменилось (Nt1-11) или упало (Nt1-15), профиль экспрессии MADS-box генов

изменился зависимым от образца образом (рис. 5). Каких-либо корреляций с экспрессией генов деградации крахмала или биосинтеза каротиноидов, а также с содержанием метаболитов в листе выявлено не было. Тем не менее, обнаруженная дифференциальная экспрессия MADS-box генов предполагает их возможное участие в регуляции углеводного метаболизма и биосинтеза каротиноидов в листьях табака.

Таким образом, в данном исследовании мы получили неполный нокаут гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* в геноме *N. tabacum* с использованием системы CRISPR-Cas9 и проанализировали полученные трансгенные линии на предмет содержания крахмала, сахаров, каротиноидов и хлорофиллов, а также экспрессии генов путей метаболизма крахмала и каротиноидов и регуляторных MADS-box генов. Полученные результаты позволяют предположить, что частичный нокаут гена *NtPHO1-L1* может изменять метаболизм транзиторного крахмала в листьях, смещая его в сторону синтеза. Эффект от нокаута распространяется на содержание сахаров, каротиноидов и хлорофиллов, а также профиль экспрессии соответствующих генов. Одним из основных последствий является снижение количества цветков в соцветии, то есть снижение репродукции растения, независимо от того, в какой степени растение смогло нормализовать углеводный обмен. Дифференциальная экспрессия MADS-box генов подсемейств *SEP* и *FUL*, а также наличие консенсусов связывания CArG-box в промоторах генов деградации крахмала и синтеза каротиноидов, предполагает участие MADS-доменных TF в регуляции метаболизма крахмала и каротиноидов, а также в ответе этих генов на изменение содержания данных метаболитов.

В целом, полученные данные не могут служить основанием для однозначных выводов о роли PHO1 в метаболизме транзиторного крахмала, в том числе из-за неполного нокаутирования гена у редактированных линий. Учитывая участие PHO1 в двух противоположных процессах (синтезе и деградации крахмала), можно предположить, что PHO1 сохраняет свою двойственную роль у мутантных растений, скорее всего, выполняя ее за счет аллелей, не подвергшихся редактированию. В то же время нарушение, вносимое редактированием в функцию PHO1, вызывает изменение содержания крахмала. Это может быть результатом как нарушения уровня активности *NtPHO1-L1*, так и изменения регуляции других генов метаболизма крахмала в ответ на изменение содержания крахмала. Учитывая разницу в степени изменения содержания крахмала в листьях, можно предположить, что, во-первых, анализируемые растения имеют разный процент нокаутированных по гену клеток. Во-вторых, ка-

ждое растение может индивидуальным образом решать проблему, используя значительный генный/ферментный аппарат для восстановления баланса синтеза и деградации крахмала, направленное на выживание и нормализацию поддержания жизненно важных биохимических процессов. Мы полагаем, что наши данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях роли пластидной крахмалфосфорилазы PHO1.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ. В работе использована экспериментальная установка искусственного климата (Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeeman S.C., Smith S.M., Smith A.M. The diurnal metabolism of leaf starch // *Biochem. J.* 2007. V. 401. P. 13. <https://doi.org/10.1042/BJ20061393>
2. Lloyd J.R., Kossmann J. Starch trek: the search for yield // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 9: 1930. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01930>
3. Thalmann M., Santelia D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress // *New Phytol.* 2017. V. 214. P. 943. <https://doi.org/10.1111/nph.14491>
4. Shoaib 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. V. 22: 10450. <https://doi.org/10.3390/ijms221910450>
5. Lütken H., Lloyd J.R., Glaring M.A., Baunsgaard L., Laursen K.H., Haldrup A., Kossmann J., Blennow A. Repression of both isoforms of disproportionating enzyme leads to higher malto-oligosaccharide content and reduced growth in potato // *Planta.* 2010. V. 232. P. 1127. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1245-3>
6. Rathore R.S., Garg N., Garg S., Kumar A. Starch phosphorylase: role in starch metabolism and biotechnological applications // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2009. V. 29. P. 214. <https://doi.org/10.1080/07388550902926063>
7. Cuesta-Seijo J.A., Ruzanski C., Kruciewicz K., Meier S., Häggglund P., Svensson B., Palcic M.M. Functional and structural characterization of plastidic starch phosphorylase during barley endosperm development // *PLoS One.* 2017. V. 12: e0175488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175488>
8. Flores-Castellanos J., Fettke J. The plastidial glucan phosphorylase affects the maltooligosaccharide metabolism in parenchyma cells of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber discs // *Plant Cell Physiol.* 2023. V. 64. P. 422. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac174>

9. *Sonnewald U., Basner A., Greve B., Steup M.* A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 27. P. 567. <https://doi.org/10.1007/BF00019322>
10. *Chen H.M., Chang S.C., Wu C.C., Cuo T.S., Wu J.S., Juang R.H.* Regulation of the catalytic behaviour of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots by proteolysis // *Physiol. Plant.* 2002. V. 114. P. 506. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140402.x>
11. *Camirand A., St-Pierre B., Marineau C., Brisson N.* Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene // *Mol. Gen. Genet.* 1990. V. 224. P. 33. <https://doi.org/10.1007/BF00259448>
12. *Fettke J., Poeste S., Eckermann N., Tiessen A., Pauly M., Geigenberger P., Steup M.* Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 1987. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci214>
13. *Schopper S., Mühlenbock P., Sörensson C., Hellborg L., Lenman M., Widell S., Fettke J., Andreasson E.* Arabidopsis cytosolic alpha-glycan phosphorylase, PHS2, is important during carbohydrate imbalanced conditions // *Plant Biol.* 2015. V. 17. P. 74. <https://doi.org/10.1111/plb.12190>
14. *Zeeman S.C., Thorneycroft D., Schupp N., Chapple A., Weck M., Dunstan H., Haldimann P., Bechtold N., Smith A.M., Smith S.M.* The role of plastidial α -glucan phosphorylase in starch degradation and tolerance of abiotic stress in *Arabidopsis* leaves // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 849. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032631>
15. *Satoh H., Shibahara K., Tokunaga T., Nishi A., Tadaki M., Hwang S.-K., Okita T., Kaneko N., Fujita N., Yoshida M., Hosaka Y., Sato A., Utsumi Y., Ohdan T., Nakamura Y.* Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 1833. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054007>
16. *Yu Y., Mu H.H., Wasserman B.P., Carman G.M.* Identification of the maize amyloplast stromal 112-kd protein as a plastidic starch phosphorylase // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 351. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.351>
17. *Mizuno S., Kamiyoshihara Y., Shiba H., Shinmachi F., Watanabe K., Tateishi A.* Plastidial starch phosphorylase is highly associated with starch accumulation process in developing squash (*Cucurbita* sp.) fruit // *Physiol. Plant.* 2019. V. 167. P. 264. <https://doi.org/10.1111/ppl.12886>
18. *Hwang S.K., Singh S., Cakir B., Satoh H., Okita T.W.* The plastidial starch phosphorylase from rice endosperm: catalytic properties at low temperature // *Planta.* 2016. V. 243. P. 999. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2461-7>
19. *Fettke J., Leifels L., Brust H., Herbst K., Steup M.* Two carbon fluxes to reserve starch in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber cells are closely interconnected but differently modulated by temperature // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 3011. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers014>
20. *Orawetz T., Malinova I., Orzechowski S., Fettke J.* Reduction of the plastidial phosphorylase in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals impact on storage starch structure during growth at low temperature // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 100. P. 141. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.013>
21. *Higgins J.E., Kosar-Hashemi B., Li Z., Howitt C.A., Larroque O., Flanagan B., Morell M.K., Rahman S.* Characterization of starch phosphorylases in barley grains // *J. Sci. Food Agric.* 2013. V. 93. P. 2137. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6019>
22. *Schreiber L., Nader-Nieto A.C., Schönhals E.M., Walkemeier B., Gebhardt C.* SNPs in genes functional in starch-sugar interconversion associate with natural variation of tuber starch and sugar content of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 2014. V. 4. P. 1797. <https://doi.org/10.1534/g3.114.012377>
23. *Albrecht T., Koch A., Lode A., Greve B., Schneider-Mergener J., Steup M.* Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analysis and immunochemical characterization // *Planta.* 2001. V. 213. P. 602. <https://doi.org/10.1007/s004250100525>
24. *Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* The expression pattern of the Pho1a genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species // *Funct. Plant Biol.* 2019. V. 46. P. 1146. <https://doi.org/10.1071/FP18317>
25. *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. V. 97. P. 78. <https://doi.org/10.1007/s12230-019-09758-z>
26. *Nezhdanova A.V., Efremov G.I., Slugina M.A., Kamionskaya A.M., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* Effect of a radical mutation in plastidic starch phosphorylase PHO1a on potato growth and cold stress response // *Horticulturae.* 2022. V. 8: 730. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080730>
27. *Sharma S., Friberg M., Vogel P., Turesson H., Olsson N., Andersson M., Hofvander P.* Pho1a (plastid starch phosphorylase) is duplicated and essential for normal starch granule phenotype in tubers of *Solanum tuberosum* L. // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14: 1220973. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1220973>
28. *Jacobs T.B., LaFayette P.R., Schmitz R.J., Parrott W.A.* Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 // *BMC Biotechnol.* 2015. V. 15: 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>

29. *Nezhdanova A.V., Slugina M.A., Kulakova A.V., Kami-onskaya A.M., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* Effect of mosaic knockout of phytoene desaturase gene *NtPDS* on biosynthesis of carotenoids in *Nicotiana tabacum* L. // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70: 116. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601271>
30. *Slugina M.A.* Transcription factor RIPENING INHIBITOR and its homologs in regulation of fleshy fruit ripening of various plant species // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68: 783. <https://doi.org/10.1134/S1021443721050186>
31. *Parenicová L., de Folter S., Kieffer M., Horner D.S., Favalli C., Busscher J., Cook H.E., Ingram R.M., Kater M.M., Davies B., Angenent G.C., Colombo L.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1538. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>
32. *AbdElgawad H., Avramova V., Baggerman G., Van Raemdonck G., Valkenborg D., Van Ostade X., Guisez Y., Prinsen E., Asard H., Van den Ende W., Beemster G.T.S.* Starch biosynthesis contributes to the maintenance of photosynthesis and leaf growth under drought stress in maize // Plant Cell Environ. 2020. V. 43. P. 2254. <https://doi.org/10.1111/pce.13813>
33. *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. V. 68. P. 2317. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx076>
34. *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 Biotech. J. 2014. V. 12. P. 984. <https://doi.org/10.1111/pbi.12221>
35. *Rosas-Saavedra C., Stange C.* Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // Subcell. Biochem. 2016. V. 79. P. 35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
36. *Cordenunsi-Lysenko B.R., Nascimento J.R.O., Castro-Alves V.C., Purgatto E., Fabi J.P., Peroni-Okyta F.H.G.* The starch is (not) just another brick in the wall: the primary metabolism of sugars during banana ripening // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 391. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00391>