

Разработка и тестирование универсальных праймеров для ПЦР-амплификации генов-ортологов β -фруктофуранозидазы (*Pain-1*) у видов и сортов картофеля

Е.О. Шмелькова, М.А. Слугина, А.А. Мелешин, Е.В. Романова

Работа посвящена разработке и тестированию универсальных праймеров для ПЦР-амплификации полноразмерных генов-ортологов β -фруктофуранозидазы (кислой вакуолярной инвертазы) у видов и сортов картофеля (*Solanum tuberosum*). Крахмал – основной источник энергии и резервный углевод, накапливающийся в амилопластах клубней. Образовавшаяся в результате фотосинтеза молекула глюкозы при реакции с фруктозой образует сахарозу – основную транспортную форму углеводов в растении. В клубни сахароза доставляется по флоэме (апопластный путь), где в межклеточном пространстве расщепляется до глюкозы и фруктозы, которые затем проникают в клетки паренхимы. Глюкоза служит в дальнейшем субстратом для синтеза крахмала в амилопластах. Однако при воздействии пониженных температур крахмал в клубнях картофеля разрушается до редуцирующих сахаров. Параллельно этому процессу идет ресинтез сахарозы до глюкозы и фруктозы за счет фермента кислой вакуолярной инвертазы (β -фруктофуранозидазы), кодируемой геном *Pain-1*. В совокупности эти процессы приводят к избыточному накоплению моносахаров в клубнях картофеля, так называемому холодовому осахариванию (cold-induced sweetening). При этом создаются условия для интенсивного образования меланоидинов, вызывающих потемнение мякоти картофеля, что значительно ухудшает товарное качество продукта. Таким образом, изучение гена *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу, а именно, его идентификация и анализ структуры – важная задача, необходимая для поиска доноров, устойчивых к холодовому осахариванию. Первоочередная задача для этого – разработка и тестирование праймерных комбинаций, позволяющих амплифицировать полноразмерный ген у диких видов картофеля, а также сортов и линий культивируемого картофеля (*S. tuberosum*). В данной работе приведены результаты разработки и тестирования универсальных праймеров, с помощью которых можно амплифицировать как полноразмерные гены-ортологи, так и фрагменты гена *Pain-1*, а также подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР реакции. Было разработано 6 праймерных комбинаций (*PainF* – *PainR*, *PainF* – *Pain1exR*, *Pain1exF* – *Pain3exR*, *Pain2inF* – *Pain2inR*, *Pain3exF* – *Pain5exR*, *Pain5exF* – *PainR*), среди которых комбинация *PainF* – *PainR* позволяла амплифицировать полноразмерный ген, остальные – внутренние и будут использованы в дальнейшем при секвенировании фрагментов исследуемого гена. Эти праймеры были успешно протестированы на 15 образцах, включающих представителей пяти дикорастущих видов картофеля (*S. gourlayi*, *S. chacoense*, *S. pinnatissectum*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*) и десяти сортов российской и зарубежной селекции (Гала, Ласунок, Ред Скарлетт, Рассет Бербанк, Мирас, Башкирский, Жуковский ранний, Матушка, Елизавета, Сударыня).

Ключевые слова: кислая вакуолярная инвертаза, *Pain-1*, β -фруктофуранозидаза, разработка праймеров, селекция картофеля, холодовое осахаривание.

Картофель (*Solanum tuberosum*) – важнейшая мировая продовольственная и техническая культура. Питательная ценность картофеля определяется, прежде всего, содержанием крахмала, кото-

рый накапливается в амилопластах клубней.

При хранении клубней в условиях низких температур (ниже 4 °С) крахмал разрушается до редуцирующих сахаров – процесс холодового оса-

харивания [2]. При этом ухудшается товарное качество картофеля, так как при термической обработке сахара вступают в реакцию с остатками аминокислот, вызывая потемнение клубней и накопление в них канцерогенного акриламида [5, 9].

Один из основных ферментов, участвующих в гидролизе сахарозы и накоплении редуцирующих сахаров в клубнях, – β -фруктофуранозидаза (кислая вакуолярная инвертаза, *Pain-1*, ЕС 3.2.1.26), аккумулирующаяся в вакуоли [3, 8, 12]. Физиологическая роль кислой вакуолярной инвертазы в растении заключается в повышении устойчивости к абиотическим стрессовым факторам, а также к воздействию патогенов за счет изменения содержания сахаров и контроля метаболического обмена [10, 11].

Важная селекционная задача сегодня – выведение сортов картофеля, не подверженных холодовому осахариванию. Для этого необходимо детальное изучение структуры и функций кислых вакуолярных инвертаз на молекулярном уровне. Известно, что у картофеля данный белок контролируется геном *Pain-1* [6]. На сегодняшний день ген *Pain-1* идентифицирован и изучен только у одного образца культивируемого картофеля *S. tuberosum*.

Идентификация и изучение структуры этого гена у сортов и линий картофеля, а также у дикорастущих видов сделает возможным выявление аллельных вариантов, ассоциированных с признаком устойчивости к холодовому осахариванию, что в дальнейшем может послужить основой для разработки молекулярных маркеров для маркер-опосредованной селекции, а также для идентификации доноров ценных аллелей для дальнейшего использования в селекционных программах.

Исходная задача изучения структуры любого гена – разработка и тестирование универсальных праймеров для ПЦР-амплификации. Разработанные праймерные последовательности должны быть высокоспецифичными для амплификации только генов *Pain-1*, помимо этого они должны амплифицировать гены-гомологи не только у *S. tuberosum*, но и у дикорастущих видов рода *Solanum*, которые могут быть донорами ценных аллельных вариантов.

Цель исследования – разработка и тестирование универсальных праймеров для амплификации генов-гомологов *Pain-1* у диких видов секции *Petota* рода *Solanum*, а также сортов картофеля для дальнейшего изучения их структуры и аллельного полиморфизма.

Условия, материал и методы исследований. Для разработки универсальных праймеров и поиска референсного гена были использованы базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и SolGene (<https://solgenomics.net>). Для выравнивания последовательности гена и идентификации экзон-интронной структуры использована программа MEGA 7.0 [7].

Было отобрано пять образцов дикорастущих южноамериканских видов картофеля подсекции *Petota* рода *Solanum*, которые используются в селекционных работах для получения новых сортов картофеля в качестве доноров хозяйственно ценных признаков и десять зарубежных и отечественных сортов культивируемого картофеля *S. tuberosum* из различных селекционных центров, чтобы охватить потенциально максимальный полиморфизм гена *Pain-1* (табл. 1).

ДНК выделяли из молодых листьев по модифицированной методике Edwards [4]. Для амплификации полноразмерных генов использовали LongAmp Taq DNA-полимераза (ThermoFisherScientific, Inc., США), позволяющая синтезировать длинные, а также GC-богатые фрагменты ДНК. Амплификацию выделенных фрагментов ДНК проводили на термоциклере BioRad C1000 (BioRad, США). Визуализацию полученных продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле (Agarose LE2, Helicon company) и документировали в системе BioDocII (Biometra, Германия). Секвенировали полученные фрагменты на платформе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США; ЦКП «Биоинженерия»).

Результаты исследований
1. Поиск нуклеотидных последовательностей гомологичных гену кислой вакуолярной инвертазы картофеля

В качестве референсных последовательностей для разработки системы праймеров из базы данных NCBI были взяты гомологи гена *Pain-1* различных представителей семейства Solanaceae, среди которых три вида рода *Solanum*: культивируемый картофель *S. tuberosum* (линия DM 1–3516R44; номера доступа в NCBI: GCA_000226075.1), баклажан *S. melongena* (GCA_000787875.1), томат овощной *S. lycopersicum* (сорт Heinz 1706, GCA_000188115.2), а также кДНК видов перца *C. annuum* и табака *N. tabacum* (NM_001324862.1; NM_001324862.1).

С помощью найденной последовательности гена у *S. tuberosum* был произведен BLAST-поиск гомологичных последовательностей у видов *Solanum* и представителей других семейств.

Таким образом, по результатам BLAST-поиска для дальнейшей работы по разработке и тестированию праймеров были отобраны полноразмерные последовательности гена *Pain-1* и кДНК у четырех представителей рода *Solanum*, включающих один образец картофеля: *S. tuberosum*, *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum*, *S. pennellii*.

Выравнивание полученных последовательностей генов и их кДНК

позволило идентифицировать наиболее консервативные участки, которые могут стать потенциальными сайтами отжига внутренних праймеров. Выравнивание 3' и 5' некодирующих областей было произведено с целью создания праймерной пары для амплификации полноразмерного гена.

Длина полноразмерных генов составила у картофеля *S. tuberosum* 3951 п.н., у томатов *S. pimpinellifolium* и *S. lycopersicum* 3926 п.н. и 4206 п.н. соответственно.

Анализ выявленных последовательностей и кДНК позволил определить экзон-интронную структуру гена. Последовательности анализируемых генов-ортологов состояли из семи экзонов и шести интронов (рис. 1).

2. Дизайн и создание праймеров для амплификации полноразмерного гена кислой вакуолярной инвертазы картофеля, а также его фрагментов

Подбор праймеров для амплификации – ключевой этап определения последовательностей гена *Pain-1* у видов картофеля. Это связано с тем, что, с одной стороны, разрабатываемые праймеры должны быть высокоспецифичны, чтобы амплифицировать только гомологи исследуемых генов, с другой – праймеры, разрабатываемые на ограниченном массиве данных, представленных в генбанке, должны приводить к амплификации гомологов *Pain-1* у до-

Таблица 1. Образцы, выбранные для амплификации генов-ортологов β-фруктофуранозидазы (Pain-1)

Вид/сорт	Каталожный номер образца CGN	Страна происхождения
Дикорастущие виды		
<i>Solanum chacoense</i>	21347	Аргентина
<i>S. pinnatisectum</i>	22345	Мексика
<i>S. gourlay</i>	18040	Аргентина
<i>S. stoloniferum</i>	17606	Мексика
<i>S. vernei</i>	17995	Аргентина
Сорта <i>S. tuberosum</i>		
Гала		Германия
Ласунок		Белоруссия
Ред Скарлетт		Нидерланды
Рассет Бербанк		США
Мирас		Казахстан
Башкирский		Россия
Жуковский ранний		Россия
Матушка		Россия
Елизавета		Россия
Сударыня		Россия

Таблица 2. Разработанные комбинации праймеров		
Праймерные пары	Последовательность праймеров	Аmplифицируемый фрагмент
PainF- PainR	5'-ATATAAAGCAGTAGACTAGTAG-3'	весь ген
	5'-ATCGGTGAAATAACCTTCAAAT-3'	
PainF – Pain1exR	5'-ATATAAAGCAGTAGACTAGTAG-3'	5'UTR-экзон I
	5'-TGAGGTTGAAAATGGTAAGCA-3'	
Pain1exF – Pain3exR	5'-CGTGGTCCAATGCTATGCTTA-3'	экзон I-экзон III
	5'-TGAGGTTGAAAATGGTAAGCAGTT-3'	
Pain2inF – Pain2inR	5'-GCAATTACTATTACCATTTCGAAG-3'	интрон II-экзон III
	5'-TACATGGATTGGTTGGCACTTA-3'	
Pain3exF – Pain5exR	5'-AGAAACAACGAAGAGTACTGTG-3'	экзон III-экзон V
	5'-GTAAACTGGCGTTAGCTCAG-3'	
Pain5exF – PainR	5'-GACAGTGCCTTACGACAAG-3'	экзон III-3'UTR
	5'-ATCGGTGAAATAACCTTCAAAT-3'	

статочны дивергентных видов, относящихся к одной секции *Potata* рода *Solanum*.

При выборе сайтов отжига праймеров руководствовались степенью консервативности участков и возможностью получения только гомологов гена *Pain-1* по возможности у наиболее широкого круга генотипов семейства *Solanaceae*. Так как наиболее консервативные участки гена – кодирующие последовательности экзонов, то именно к ним и разрабатывали праймеры для амплификации. Однако особенность всех генов кислых инвертаз – наличие самого маленького экзона, известного для растительного царства: экзон II имеет всего 11 пн, при этом окружен достаточно протяженными и вариабельными интронами I и II (165 и 1329 пн), поэтому невозможно было подобрать праймер к экзону II и дополнительная праймерная пара была подобрана к последовательности интрона II (Pain2inF – Pain2inR).

Всего разработано двенадцать праймеров, позволяющих амплифицировать

как полноразмерную последовательность гена *Pain-1*, так и их фрагменты гена (табл. 2, рис. 1).

Наиболее важная из разработанных праймеров – пара PainF-PainR, позволяющая амплифицировать полный ген у разнообразных видов дикорастущего и культивируемого картофеля для дальнейшего клонирования и секвенирования. Эту пару праймеров тестировали на наборе ДНК пяти образцов дикорастущего и десяти сортах культивируемого картофеля (табл. 1). Длина полученного амплификата составляла ~ 4,5 т.п.н и соответствовала рассчитанной путем компьютерного моделирования последовательности гена β-фруктофуранозидазы.

Внутренние праймеры (табл. 2) разрабатывали и тестировали после тестирования праймерной комбинации PainF- PainR.

3. Подбор условий и оптимизация ПЦР

В связи с тем, что ожидаемая длина полноразмерного гена *Pain-1* у видов и сортов картофеля составляла

~ 4,2 кб, для амплификации последовательности всего гена использовали специальную LongAmp Taq DNA полимеразу (ThermoFisherScientific, Inc., США), позволяющую синтезировать длинные, до 20 кб фрагмента, а также GC-богатые фрагменты ДНК. На реакцию бралась 1 ед. LongAmp полимеразы. Конечный объем смеси составил 25 мкл. Для оптимизации условий амплификации в буферный раствор добавляли различные концентрации магния (1–2,5 мМ) при постоянной концентрации (10мМ) dNTP и праймеров (1мкМ). Геномной ДНК матрицы добавляли 50–250 нг.

При амплификации с внутренними праймерами рассчитанные длины фрагментов не превышали 1,7 т.н.п., поэтому для их амплификации использовали стандартные Taq полимеразы («Диалат», Москва). Оптимизацию реакции проводили также, варьируя концентрации ионов магния от 1 до 2,5 мМ.

Для подбора оптимальной температуры отжига ПЦР-реакции как праймерной пары PainF-PainR, так и внутренних праймеров с каждым образцом, ПЦР амплификацию проводили в трех вариантах, при градиенте из трех различных температур: температуре плавления ± 5 °С, рассчитанной для каждого праймера.

В результате была подобрана оптимальная температура как для праймерной пары, используемой для амплификации всей последовательности гена, так и для внутренних праймеров (табл. 2).

Для амплификации всего гена с использованием праймеров PainF – PainR оптимизированный температурно-временной профиль ПЦР включал денатурацию 95 °С – 5 мин, последующие циклы: 94 °С – 30 сек, T отж – 40 сек. и 65 °С – 5 мин, финальный цикл включал элонгацию 65

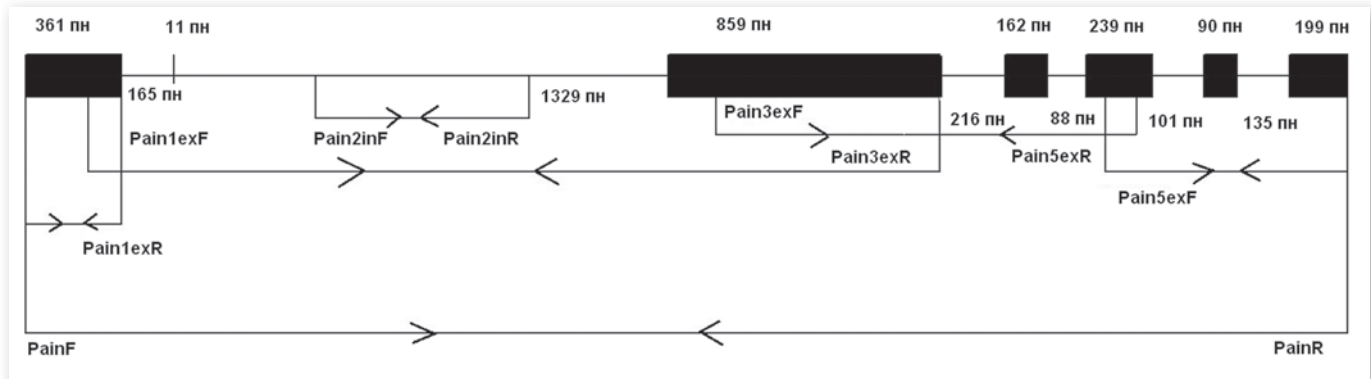


Рис. 1. Экзон-интронная структура гена β-фруктофуранозидазы картофеля и локализация разработанных праймеров. Прямоугольники обозначают экзоны

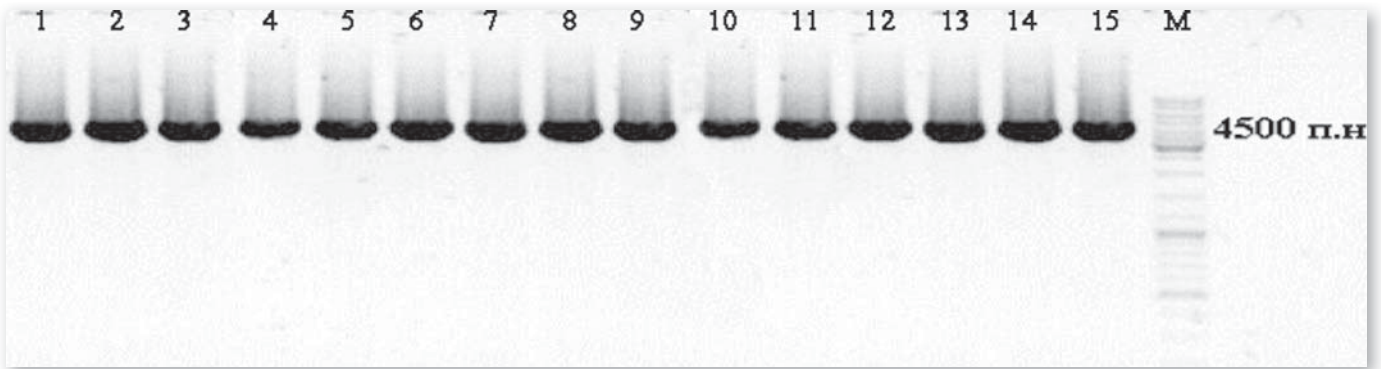


Рис. 2. Результаты амплификации полноразмерного гена β -фруктофуранозидазы с праймерами PainF-PainR у тестируемого набора образцов картофеля (1 – *S. gourlayi*, 2 – *S. chacoense*, 3 – *S. pinnatisectum*, 4 – *S. stoloniferum*, 5 – *S. Vernei*, 6 – *S. tuberosum* cv. Гала, 7 – *S. tuberosum* cv. Ласунок, 8 – *S. tuberosum* cv. Ред Скарлет, 9 – *S. tuberosum* cv. Рассет Бербанк, 10 – *S. tuberosum* cv. Мирас, 11 – *S. tuberosum* cv. Башкирский, 12 – *S. tuberosum* cv. Жуковский ранний, 13 – *S. tuberosum* cv. Матушка, 14 – Елизавета, 15 – *S. tuberosum* cv. Сударыня). M – маркер длин ДНК-фрагментов DNA Ladder Mix (ThermoFisherScientific, Inc., США)

°C – 10 мин. Оптимальное количество циклов амплификации составило 35.

Для амплификации фрагментов гена с внутренними праймерами оптимальными температурно-временными условиями были: денатурация 95 °C – 5 мин, последующие циклы: 94 °C – 30 сек, T отж – 40 сек и 72 оC – 1 мин., финальный цикл включал элонгацию 72 °C – 5 мин. Оптимальное количество циклов амплификации составило 31.

Праймерная пара PainF – PainR успешно была использована для амплификации пятнадцати образцов картофеля, включающих пять дикорастущих видов и десять сортов различной селекции (рис. 2).

Для проверки природы амплифицированных фрагментов было проведено предварительное прямое секвенирование полученных ПЦР-продуктов, а затем BLAST-анализ. В результате показано, что все фрагменты, полученные с использованием разработанных праймеров были высокогомологичны последовательностям гена *Pain-1* (рис. 3).

Помимо праймеров, амплифицирующих полную последовательность

гена *Pain-1*, были разработаны внутренние праймеры (табл. 2), которые были проверены на возможность их использования для амплификации фрагментов гена при использовании в качестве матрицы как геномной ДНК, так и ПЦР последовательности полноразмерного гена, полученного с использованием пары PainF – PainR (разбавление ПРЦ продукта 1:150). Помимо амплификации фрагмента гена внутренние праймеры могут быть использованы для его прямого секвенирования.

Таким образом, в ходе работы разработаны и протестированы универсальные праймеры, которые позволяли амплифицировать полноразмерные гены-ортологи *Pain-1* дикорастущих видов *Solanum* и сортов *S. tuberosum*, а также внутренние праймерные пары. Была достигнута оптимизация условий проведения реакции амплификации.

Разработанные праймерные пары будут использованы в дальнейшем при секвенировании фрагментов генов-ортологов *Pain-1* у сортов *S. tuberosum*.

Работа выполнена на научном оборудовании ЦКП «Биоинженерия» и ЭУИК при финансовой поддержке КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля».

Библиографический список

1. Анисимов Б.В. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Картофелевод, 2009. 272 с.
2. Blenkinsop RW, Yada RY, Marangoni AG. Metabolic control of low-temperature sweetening in potato tubers during postharvest storage. Horticultural Reviews. 2004. Vol. 30. Pp. 317-354.
3. Clasen, B.M. et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout // Plant Biotechnol. 2016. J. 4 (1). Pp. 169–176.
4. Edwards S.K., Johonstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. Pp. 1349
5. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. Halford N.G., Curtis T.Y., Muttucumaru N., Postles J., Elmore J.S. & Mottram D.S. Journal of Experimental Botany. 2012. Vol. 63. Pp. 2841–2851.
6. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development, Current Opinion in Plant Biology. 2004. Vol. 7. Pp. 235–246.
7. Kumar S., Stecher G., Tamura K.; MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution, Vol. 33, Issue 7, 1 July 2016, Pp. 1870–1874.
8. Halford N.G., Curtis T.Y., Muttucumaru N., Postles J., Elmore J.S. & Mottram D.S. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. Journal of

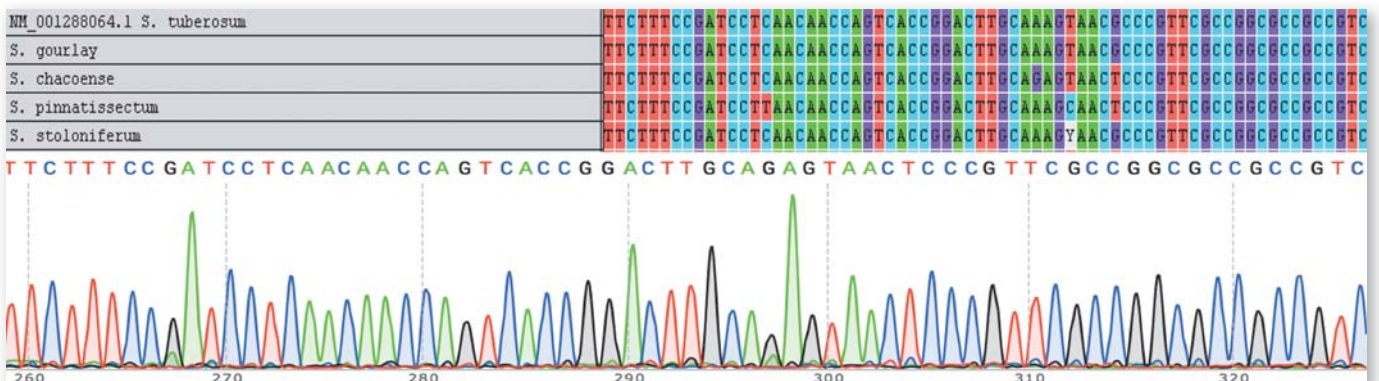


Рис. 3. Фрагмент выравнивания полученных последовательностей, гомологичных известному гену β -фруктофуранозидазы картофеля (NCBI: HQ110080). Для амплификации использовалась праймерная пара PainF-PainR, для прямого секвенирования – праймер PainF

- Experimental Botany. 2012. Vol. 63. Pp. 2841–2851.
9. Liu, X., Zhang, C., Ou, Y., Lin, Y., Song, B., Xie, C., Liu, J., Li, X.Q. Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, StvacINV1, regulates cold-induced sweetening of tubers. Mol. Genet. Genom. 2011. Vol. 286. Pp. 109–118.
10. Medeiros Vinci R., Mestdagh F., De Meulenaer B. Acrylamide formation in fried potato products – present and future, a critical review on mitigation strategies // Food Chemistry. 2012. Vol. 133. Pp. 1138–1154.
11. Proels, R. K. and Huckelhoven, R. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defense responses. Mol Plant Pathol. 2014. Vol. 15(8). Pp. 858–864.
12. Tang G.-Q., Lüscher M. and Sturm A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. Plant Cell. 1999. Vol. 11. Pp. 177–189.
13. Wu L., Bhaskar P.B., Busse J., Zhang R., Bethke P.C., Jiang J. Developing coldchipping potato varieties by silencing the vacuolar invertase gene. Crop Sci. 2011. Vol. 51. Pp. 981–990.

Об авторах

Шмелькова Екатерина Олеговна,

м.н.с, аспирант, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Тел. (раб.): 8 (495) 308-99-96. Тел. моб.: 8 (916) 747-09-79. E-mail: shmelkoffa@gmail.com

Слугина Мария Андреевна, м.н.с,

аспирант, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Тел. (раб.): 8 (495) 308-99-96. Тел. (моб.): 8 (929) 983-53-45. E-mail: mashinmail@mail.ru

Мелешин Алексей Алексеевич,

канд. с.-х. наук, зав. отделом генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение. «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха». Тел. (раб.): 8 (495) 557-50-74 доб. 1-20, тел. моб.: 8 (916) 138-74-35. E-mail: a-mela@mail.ru

Романова Елена Валерьевна,

канд. с.-х. наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов». Тел. (раб.): 8 (495) 434-31-66 вн. 188.

postgraduate student, RUDN University, Agrarian-Technological Institute, Research Centre of Biotechnology RAS. Phone: 8 (495) 308-99-96.

Phone (mob.): 8 (916) 747-09-79.

E-mail: shmelkoffa@gmail.com

M.A. Slugina, junior research fellow, postgraduate student, Research Centre of Biotechnology RAS.

Phone: 8 (495) 308-99-96.

Phone (mob.): 8 (929) 983-53-45.

E-mail: mashinmail@mail.ru

A.A. Meleshin, PhD, head of department of genetics, Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Growing.

Phone: 8 (495) 557-50-74 add. 1-20.

Phone (mob.): 8 (916) 138-74-35.

E-mail: a-mela@mail.ru

E.V. Romanova, PhD, associate professor, RUDN University, Agrarian-Technological Institute.

Phone: 8 (495) 434-31-66 intern. 188.

Summary. The purpose of research is design and testing of universal primers for PCR amplification of full-length-fructofuranosidase orthologs genes (acid vacuolar invertase) in wild species and potato (*Solanum tuberosum*) varieties. Starch is the main source of energy and a reserve carbohydrate, that accumulates in tubers amyloplasts. Glucose molecule, produced by photosynthesis, reacts with fructose and forms sucrose, which is the main transport type of carbohydrates in the plant. In the tuber, sucrose is delivered via phloem (apoplast), where it splits into glucose and fructose, which then go to the parenchyma cells. Glucose is a further substrate for the starch synthesis in amyloplasts. However, low temperatures influence on potato tubers leads to starch break down to reducing sugars. In parallel to this process there is happens resynthesis of sucrose to glucose and fructose by acid vacuolar invertase enzyme (β -fructofuranosidase) encoded by Pain-1 gene. Together, these processes lead to an excessive accumulation of monosaccharides in potato tubers. This process also called as cold-induced sweetening. It creates conditions for the intensive formation of melanoidins, which cause a potato tubers darkening, which considerably impairs the commercial quality of the product. Thus, the study Pain-1 gene that encodes the vacuolar invertase (its identification and structure analysis) is an important task required for the search of donors resistant to cold-induced sweetening. The primary task for this is the design and testing of primer combinations that allow to amplify the full-length gene in wild potato species, varieties and lines of cultivated potato. In this work, we develop and test universal primers, that can amplify both full-length orthologs and fragments of the Pain-1 gene, and also select the optimal conditions for carry-

ing out the PCR reaction. Summary. The purpose of research is design and testing of universal primers for PCR amplification of full-length-fructofuranosidase orthologs genes (acid vacuolar invertase) in wild species and potato (*Solanum tuberosum*) varieties. Starch is the main source of energy and a reserve carbohydrate, that accumulates in tubers amyloplasts. Glucose molecule, produced by photosynthesis, reacts with fructose and forms sucrose, which is the main transport type of carbohydrates in the plant. In the tuber, sucrose is delivered via phloem (apoplast), where it splits into glucose and fructose, which then go to the parenchyma cells. Glucose is a further substrate for the starch synthesis in amyloplasts. However, low temperatures influence on potato tubers leads to starch break down to reducing sugars. In parallel to this process there is happens resynthesis of sucrose to glucose and fructose by acid vacuolar invertase enzyme (β -fructofuranosidase) encoded by Pain-1 gene. Together, these processes lead to an excessive accumulation of monosaccharides in potato tubers. This process also called as cold-induced sweetening. It creates conditions for the intensive formation of melanoidins, which cause a potato tubers darkening, which considerably impairs the commercial quality of the product. Thus, the study Pain-1 gene that encodes the vacuolar invertase (its identification and structure analysis) is an important task required for the search of donors resistant to cold-induced sweetening. The primary task for this is the design and testing of primer combinations that allow to amplify the full-length gene in wild potato species, varieties and lines of cultivated potato. In this work, we develop and test universal primers, that can amplify both full-length orthologs and fragments of the Pain-1 gene, and also select the optimal conditions for carrying out the PCR reaction. In total 6 primer combinations were designed (PainF - PainR, PainF - Pain1exR, Pain1exF - Pain3exR, Pain2inF - Pain2inR, Pain3exF - Pain5exR, Pain5exF - PainR), where PainF - PainR primer combination allowed to amplify a full-sized gene, the rest are internal and will be used in the further fragments sequencing of the β -fructofuranosidase gene. These primers were successfully tested on 15 samples, including five wild species of potato (*S. gourlay*, *S. chacoense*, *S. pinnatisectum*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*) and ten varieties of Russian and foreign breeding (Gala, Lasunok, Red Scarlet, Rasset Burbank, Miras, Bashkirsky, Zhukovsky ranniy, Matushka, Elizaveta, Sudaryna).

Keywords: acid vacuolar invertase, Pain-1, β -fructofuranosidase, primer design, potato breeding, cold-induced sweetening.

Design and testing of universal primers for PCR amplification β -fructofuranosidase orthologs genes (Pain-1) in wild species and potato (*Solanum tuberosum*) varieties
E.O. Shmelkova, junior research fellow,