

Figure S1. Phylogenetic tree of pyrophosphorylase homologs. Phylogenetic analysis based on aa sequences of pyrophosphorylase homologs from Arabidopsis (AtPPa1-6), aa sequence derived from tuber expressed contigs of potato variety Kuras (c20866, c21825, c25409 and c28161) (Hofvander *et al.*, 2016) and the aa sequence deduced from the putative gene used in the present study (StpsPPase).

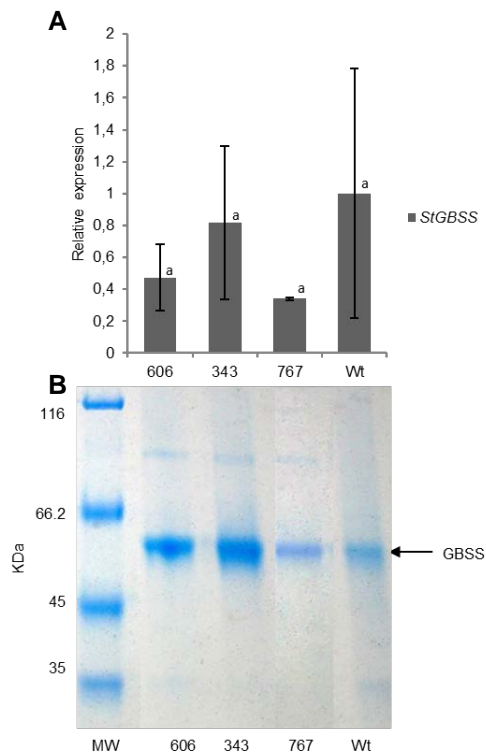


Fig. S2. GBSS transcript levels and visualization of starch bound proteins. **A.** Expression levels of *StGBSS* in lines 606 (*StpsPPase*-inhibition), 343 (*StNTT*-inhibition) and 767 (*StpsPPase*+*StNTT*-inhibition) and wild type (Wt) analyzed with real-time PCR. Expression levels of *StGBSS* were normalized to the reference gene actin. Expression level in wild type was set to one (1). Data are mean values (\pm SD) of three biological replicates. Samples sharing the same letters are not significantly different according to Tukey's test ($P = 0.05$).

B. Starch bound proteins separated on a 10% SDS-PAGE: 606 (*StpsPPase*-inhibition); 343 (*StNTT*-inhibition); 767 (*StpsPPase*+*StNTT* -inhibition); and wild type (Wt). Size marker (MW): Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker. GBSS protein (60 kDa) is marked with an arrow.

Table S1. Primers used for screening leaf tissue for transgene presence (NPTII) and *Agrobacterium* contamination (VirG) and primers used for analysis of gene expression using q-PCR (Actin, NTT, PPa, GBSS).

Primer names	Primer sequence
nptII _f	5'-CCTGTCATCTCACCTTGCTC-3'
nptII _r	5'-AGTCCCGCTCAGAAGAACTC-3'
VirG-	5'-GCCGGGGCGAGACCATAGG-3'
VirG+	5'-CGCACGCGCAAGGCAACC-3'
StActin-F	5'-ACAAGTGATGGCTGGAATAAGACTT-3'
StActinrev	5'-CCAGATGGTCAGGTGATTACCA-3'
qStnttF	5'-GTTTGGACTTGGAGCGAATG-3'
qStnttR	5'-TTTCAGGGAGATAGCCCAAC-3'
qStppa6.1F	5'-CAACAAGCCAGCAAACAAGG-3'
qStppa6.1R	5'-CAAGTGAAAGCTCACCAGCA-3'
StGBSS1f	5'-TTGCATAACTGGGATTGTGAATG-3'
StGBSS1r	5'-GACAGTGGTTATATCGTATTTGA-3'

Table S2. Relative quantities of metabolites in lines 606 and 628 (*StpsPPase*-inhibition); 343 and 345 (*StNTT*-inhibition); 718, 729, 753, 754, 764 and 767 (*StpsPPase+StNTT*-inhibition); and wild type (Wt). Wild type is set to 1. Significant values are marked in bold. n = 3.

Amino acids	Wt	606	628	343	345	718	729	753	754	764	767
Alanine	1±0,38	1,03±0,2	1,11±0,4	0,81±0,13	0,66±0,16	1,23±0,19	0,51±0,13	0,7±0,17	1,17±0,3	0,49±0,03	0,85±0,05
Arginine	1±0,03	17,00±2,67	6,01±1,98	7,42±1,54	2,77±0,23	7,62±0,17	6,95±1,15	7,04±6,23	14,92±4,03	14,5±0,75	12,37±3,44
Asparagine	1±0,04	0,32±0,13	0,4±0,3	0,43±0,15	0,63±0,3	0,46±0,14	0,55±0,25	0,36±0,19	0,36±0,25	0,2±0,09	0,1±0,06
Butyric acid, 4-amino	1±0,68	1,19±0,37	0,82±0,2	1,19±0,15	1,07±0,32	0,86±0,38	0,28±0,16	0,87±0,21	1,27±0,05	0,11±0,02	0,72±0,15
Cystine	1±0,29	0,97±0,1	1,88±0,4	0,72±0,1	0,97±0,23	1,23±0,26	1,41±0,34	1,14±0,18	0,94±0,33	0,65±0,03	0,79±0,2
Gluconic acid	1±0,29	0,68±0,11	0,73±0,13	1,05±0,52	0,76±0,21	0,82±0,33	0,81±0,06	0,87±0,25	0,67±0,14	1,17±0,1	0,75±0,13
Glutamic acid	1±0,25	0,87±0,15	1,05±0,31	1,05±0,16	1,44±0,17	0,93±0,32	1,07±0,08	1,31±0,32	0,85±0,4	0,5±0,04	0,68±0,22
Glutamine	1±0,28	1,38±0,74	0,73±0,35	0,60±0,25	1,18±0,85	1,14±0,24	0,58±0,3	0,43±0,02	1,07±0,18	0,6±0,3	0,55±0,12
Glycine	1±0,2	2,13±0,57	2,68±1,36	2,03±0,37	2,16±0,26	2,73±0,27	1,22±0,44	1,53±0,38	1,84±0,45	0,65±0,14	1,48±0,24
Histidine	1±0,41	3,04±1,24	2,99±2,59	0,10±0,01	0,77±0,42	3,25±0,97	2,01±0,88	1,02±0,12	2,09±1,3	0,7±0,4	0,78±0,3
Isoleucine	1±0,77	2,68±0,23	3,2±1,72	1,22±0,3	2,57±0,29	3,17±1,38	2,57±0,99	1,32±0,07	1,5±0,06	1,08±0,37	1,83±0,33
Lysine	1±0,64	3,44±1	4,2±3,52	0,75±0,37	1,95±0,51	4,31±2,34	2,25±0,77	1,34±0,28	2,47±1,1	0,77±0,33	1,38±0,47
Methionine	1±0,5	1,15±0,29	1,36±1	1,35±0,3	2,04±0,85	1,42±0,44	0,83±0,41	0,82±0,28	0,78±0,35	0,24±0,03	0,38±0,17
Ornithine	1±0,13	5,09±1,78	1,63±1,26	0,66±0,26	0,85±0,31	3,51±0,88	1,95±0,38	1,23±0,6	3,32±1,57	1,07±0,45	2,17±0,87
Phenylalanine	1±0,73	3,17±0,12	2,49±0,77	3,10±0,52	2,77±1,13	3,3±0,5	1,4±0,55	1,45±0,58	2,29±0,29	1,76±0,73	3,26±0,4
Proline	1±0,7	1,77±0,44	2,63±0,79	2,05±0,26	3,04±0,35	2,4±0,07	1,88±0,5	1,38±0,28	1,21±0,35	0,93±0,1	1,1±0,28
Purine, 6-benzylamino-	1±0,08	2,27±0,36	6,13±1,15	2,89±1,01	4,87±1,33	4,26±1,71	12,59±9,1	3,51±0,72	2,48±0,95	6,47±1,74	2,51±1,31
Putrescine	1±0,13	4,83±0,91	2,78±1,1	2,31±0,33	2,11±0,41	2,98±1,43	2,21±0,12	1,69±0,52	2,38±0,1	2,38±0,96	2,7±0,73
Pyroglutamic acid	1±0,2	0,84±0,26	0,59±0,24	0,77±0,09	1,03±0,43	0,79±0,24	0,54±0,18	0,53±0,15	0,84±0,52	0,4±0,13	0,4±0,12
Pyrraline-2-carboxylate	1±0,22	0,67±0,05	0,51±0,04	0,91±0,55	0,57±0,15	0,35±0,07	0,57±0,23	0,31±0,06	0,33±0,14	0,48±0,14	0,3±0,08

Serine	1±0,21	1,56±0,42	2,43±1,07	2,21±0,24	3,13±0,51	3,17±0,37	1,93±0,59	1,93±0,51	1,74±0,97	0,72±0,17	1,04±0,36
Threonine	1±0,27	1,91±0,52	2,77±1,08	0,81±0,24	1,57±0,27	2,68±0,28	1,65±0,39	1,19±0,25	1,43±0,61	0,54±0,15	1,1±0,35
Tryptophan	1±1,14	0,47±0,08	1,21±1,23	0,22±0,04	0,45±0,13	1,5±1,46	0,51±0,37	0,23±0,05	0,46±0,17	0,4±0,33	0,55±0,17
Tyramine	1±0,45	2,38±0,28	0,95±0,35	1,24±0,33	1,37±0,43	1,26±0,34	2,06±1,16	0,97±0,23	1,37±0,39	1,73±0,99	1,09±0,23
Tyrosine	1±1,03	1,77±0,21	5,14±4,76	0,79±0,29	1,86±0,49	4,05±3,04	1,72±1,01	1±0,1	1,53±0,36	0,9±0,64	1,75±0,73
Valine	1±0,37	4,76±0,58	3,58±0,52	1,70±0,27	2,48±0,18	4,35±1,14	2,65±0,95	2,17±0,5	3,77±0,75	1,57±0,46	3,3±0,93

Organic acids	WT	606	628	343	345	718	729	753	754	764	767
Aconitic acid	1±0,19	2,73±0,21	5,87±1,03	1,86±0,53	3,11±1,15	8±2,39	5,49±0,41	2,99±0,8	2,68±0,75	1,43±0,08	2,74±0,85
Adipic acid	1±0,09	0,68±0,07	0,65±0,29	0,87±0,54	1,35±0,66	0,99±0,35	1,09±0,43	1,06±0,31	0,75±0,74	0,36±0,1	0,65±0,34
Aspartic acid	1±0,03	1,17±0,27	1±0,31	0,44±0,06	0,67±0,12	1,35±0,65	0,92±0,22	0,69±0,05	0,65±0,17	0,56±0,08	0,55±0,13
Cinnamic acid, 4-hydroxy-	1±0,15	1,36±0,16	2,64±0,53	1,43±0,1	1,77±0,16	1,68±0,16	2,01±0,38	1,53±0,26	1,31±0,37	1,68±0,14	1,19±0,15
Eicosanoic acid methyl ester	1±0,18	1,23±0,05	1,14±0,13	1,11±0,03	1,17±0,09	1,1±0,02	1,08±0,07	0,99±0,03	1,11±0,02	1,01±0,07	1,13±0,1
Erythronic acid	1±0,28	3,21±0,08	2,7±0,33	2,22±0,22	2,56±0,22	2,67±0,85	2,82±0,23	2,98±0,16	2,13±0,9	1,49±0,13	1,82±1,28
Fumaric acid	1±0,17	1,53±0,36	1,42±0,17	3,18±0,9	3,71±2,92	3,93±1,79	0,96±0,19	1,4±0,62	0,93±0,28	0,73±0,05	1,05±0,15
Galactonic acid	1±0,29	0,68±0,11	0,73±0,13	1,05±0,52	0,76±0,21	0,82±0,33	0,81±0,06	0,87±0,25	0,67±0,14	1,17±0,1	0,75±0,13
Galactonic acid-1,4-lactone	1±0,24	11,61±4,65	12,16±0,74	5,15±3,75	3,25±3,13	6,85±0,57	6,74±2,96	6,32±7,07	8,13±0,93	36,13±21,91	6,28±1,32
Glucaric acid-1,4-lactone	1±0,22	43,22±13,04	26,23±12,53	30,45±13,09	22,34±21,29	14,35±8,49	25,43±5,04	33,92±29,18	57,26±28,62	31,07±6,99	33,56±10,37
Glyceric acid	1±0,21	3,3±0,8	3,11±1,22	1,42±0,1	2,11±0,09	2,89±1,09	1,71±0,44	1,58±0,24	1,56±0,19	0,71±0,15	1,39±0,27
Isocitric acid	1±0,22	2,57±0,78	1,62±0,65	1,9±0,06	2,64±1,06	2,13±0,04	1,4±0,41	1,76±0,15	3,94±0,65	1,38±0,41	1,53±0,18
Lactic acid dimer	1±0,23	1,01±0,07	0,9±0,08	1,02±0,05	1,03±0,13	0,91±0,03	1±0,03	0,94±0,03	1,06±0,14	0,99±0,07	1,09±0,19
Malic acid	1±0,36	3,67±0,1	3,11±0,39	2,43±0,23	2,9±0,25	2,98±0,92	3,16±0,25	3,57±0,39	2,81±1,47	1,71±0,17	3,59±0,32

Nicotinic acid	1±0,29	1,56±0,41	2,6±0,24	1,27±0,36	1,75±0,25	1,82±0,12	1,84±0,54	1,16±0,32	0,79±0,22	0,61±0	0,81±0,23
Nonadecanoic acid methyl ester	1±0,22	0,87±0,05	0,78±0,07	0,82±0,01	0,92±0,06	0,83±0,01	0,9±0,02	0,92±0,01	0,91±0,05	0,91±0,01	1,01±0,14
Octadecanoic acid	1±0,15	0,95±0,06	0,9±0,15	0,88±0,06	0,82±0,07	0,76±0,04	0,88±0,11	0,78±0,03	0,9±0,01	1,14±0,01	1,19±0,15
Phosphoric acid	1±0,21	0,6±0,09	0,67±0,08	0,63±0,03	0,78±0,03	0,63±0,07	0,77±0,05	0,92±0,12	0,6±0,08	0,67±0,06	0,48±0,04
Quinic acid	1±0,12	2,24±0,66	2,9±0,26	2,3±0,83	3,08±0,64	2,35±0,58	4,05±0,31	3,09±0,78	2,2±0,33	4,78±0,04	2,56±0,61
Succinic acid	1±0,19	0,54±0,07	0,53±0,07	0,46±0	0,35±0,11	0,47±0,18	0,3±0,04	0,35±0,04	0,39±0,01	0,44±0,04	0,48±0,05
Tetradecanoic acid methyl ester	1±0,17	0,9±0,05	0,79±0,06	0,87±0,01	0,9±0,05	0,84±0,02	0,88±0,03	0,88±0,03	0,89±0,05	0,92±0,01	1±0,12
Threonic acid	1±0,05	1,08±0,23	0,92±0,27	0,49±0,07	0,66±0,1	1,2±0,56	0,84±0,17	0,67±0,05	0,64±0,15	0,54±0,08	0,55±0,12
Triacontanoic acid methyl ester	1±0,13	1,04±0,06	0,91±0,07	0,86±0,02	1,04±0,1	0,87±0,05	0,96±0	0,98±0,09	1,05±0,04	1,1±0,02	1,16±0,14

Sugars	Wt	606	628	718	729	753	754	764	767
Erythrose	1±0,23	1,01±0,07	0,9±0,08	0,91±0,03	1±0,03	0,94±0,03	1,06±0,14	0,99±0,07	1,09±0,19
Fructose	1±0,21	1,22±0,64	4,21±3,29	4,3±2,36	4,07±4,06	2,84±2,06	1,09±0,24	2,77±0,64	1,74±0,25
Galactinol	1±0,24	0,39±0,08	1,01±0,55	0,66±0,51	2,9±1,1	0,76±0,32	0,35±0,1	0,45±0,01	0,85±0,32
Glucose	1±0,24	1,66±0,12	1,37±0,14	1,24±0,03	1,42±0,12	1,77±0,13	2,03±0,11	2,1±0,11	2,38±0,35
Glycerol	1±0,2	0,99±0,04	0,91±0,09	0,91±0,01	0,93±0,05	0,99±0,04	0,96±0,03	0,89±0,03	0,97±0,14
Glycerol-3-phosphate	1±0,1	0,32±0,05	0,34±0,08	0,27±0,04	0,46±0,08	0,49±0,14	0,37±0,15	0,4±0,11	0,2±0,04
Gulose	1±0,25	2,96±0,24	5,61±0,78	7,59±2,18	5,81±0,23	3,42±0,83	2,54±1,2	1,33±0,32	2,74±1,27
Kestose	1±0,37	4,86±2,01	5,21±3,83	4,43±3,09	2,63±1,63	5,15±2,64	5,19±0,42	5,27±2,49	6,32±1,33
Maltose	1±0,74	11,84±2,63	9,6±3,64	8,23±3,5	7,99±2,14	6,17±4,44	9,96±3,07	14,69±0,36	10,66±2,33
Mannitol	1±0,17	2,27±0,11	3,78±0,42	4,77±1,04	3,68±0,19	2,34±0,47	1,94±0,62	1,22±0,12	2,19±0,61
Mannose	1±0,25	2,96±0,24	5,61±0,78	7,59±2,18	5,81±0,23	3,42±0,83	2,54±1,2	1,33±0,32	2,74±1,27

Raffinose	1±0,37	4,86±2,01	5,21±3,83	4,43±3,09	2,63±1,63	5,15±2,64	5,19±0,42	5,27±2,49	6,32±1,33
Rhamnose	1±0,26	1,02±0,08	1,7±0,33	1,67±0,42	1,93±0,65	1,29±0,21	0,93±0,25	1,04±0,14	0,89±0,11
Sucrose	1±0,06	0,67±0,05	0,55±0,06	0,46±0,08	0,62±0,06	0,82±0,08	1±0,06	1,05±0,04	1,13±0,15
Tagatose	1±0,15	0,91±0,06	0,97±0,1	1,05±0,07	1,1±0,01	1,06±0,05	1,01±0,09	0,9±0,02	1,1±0,1
Xylose	1±0,3	4,99±1,02	2,66±1,21	3,07±0,22	4,94±2,44	2,45±1,74	3,6±1,63	9,2±1,25	5,16±1,04
Xylulose	1±0,23	0,84±0,15	1,01±0,31	0,88±0,3	1,03±0,09	1,23±0,34	0,76±0,32	0,5±0,03	0,64±0,2

Others	Wt	606	628	343	345	718	729	753	754	764	767
Arabitol	1±0,08	0,99±0,07	0,95±0,03	1,01±0,03	0,98±0	0,97±0,01	1,01±0,03	0,97±0,05	1±0,07	1±0,04	0,99±0
Calystegine A3	1±0,08	0,77±0,09	0,7±0,28	0,89±0,52	1,4±0,65	1,09±0,39	1,15±0,47	1,1±0,29	0,76±0,73	0,4±0,12	0,71±0,35
Calystegine B2	1±0,06	0,55±0,12	0,89±0,38	0,6±0,43	1,32±0,65	1,02±0,33	1,36±0,57	1,12±0,25	0,58±0,56	0,53±0,09	0,56±0,31
Glucosone	1±0,2	1,85±0,29	1,78±0,51	2,34±0,27	2,05±0,61	1,4±0,6	1,45±0,17	1,67±0,31	1,91±0,09	1,8±0,09	1,43±0,28
Hexadecanoic acid methyl ester	1±0,17	1,04±0,04	0,87±0,09	0,96±0,04	1,01±0,07	0,9±0,03	1,01±0,04	1,04±0,06	1,15±0,03	1,19±0,02	1,22±0,09
Naringenin	1±0,11	2,42±0,76	3,3±0,36	2,61±1,01	3,51±0,8	2,65±0,71	4,76±0,24	3,26±0,83	2,27±0,36	5,53±0,14	2,72±0,67
Stigmasterol	1±0,11	1,17±0,07	1,12±0,09	1,04±0,01	1,2±0,11	1,06±0,07	1,04±0,04	1,02±0,1	1,06±0,04	1,05±0,07	1,13±0,15
Tocopherol	1±0,14	1,15±0,4	1,54±0,14	0,57±0,17	1,06±0,42	1,3±0,3	1,9±0,23	1,28±0,54	0,9±0,35	3,83±0,75	1,9±0,32
Urea	1±0,1	0,92±0,08	0,77±0,13	1,07±0,24	1,35±0,48	0,91±0,17	0,94±0,1	0,85±0,12	0,59±0,12	0,8±0,15	0,96±0,12