

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ЕГОРОВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Применение геномного редактирования для получения новых
генотипов картофеля с устойчивостью к холодовому
осахариванию**

1.5.7. – генетика.

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Академик РАН, д.б.н.

Кочетов Алексей Владимирович

Новосибирск - 2025

Содержание

Перечень условных обозначений	4
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1. Развитие методов селекции и биотехнологии картофеля.....	15
1.2. Использование геномного редактирования в биотехнологии картофеля..	21
1.3. Трансформация и регенерация картофеля	26
1.4. Холодовое осахаривание в клубнях картофеля	29
1.5. Заключение по обзору литературы и формулировка задачи исследования	37
Глава 2. Материалы и методы.....	39
2.1 Растительный материал.....	39
2.2. Анализ содержания сахаров.....	40
2.3 Анализ последовательностей гена <i>Pain-1</i> в исследуемых сортах картофеля	40
2.4. Анализ экспрессии генов	41
2.5. Подбор сайтов-мишеней и дизайн направляющих РНК.....	43
2.6. Получение векторов для нокаута целевого гена.....	44
2.7. Выделение и трансформация протопластов картофеля.....	50
2.8. Оценка активности конструкции с нРНК и нуклеазой Cas9 в протопластах картофеля	52
2.9. Агробактериальная трансформация картофеля	53
2.10. Анализ генотипа генетически отредактированных растений	54
2.11. Анализ фенотипа генетически отредактированных растений	55
2.12. Получение и анализ гибридов картофеля.....	56

2.13. Статистическая обработка результатов	57
Глава 3. Результаты и обсуждение	59
3.1. Выбор сорта для нокаута гена вакуолярной инвертазы.....	59
3.3. Создание генетических конструкций для нокаута гена <i>Pain-1</i>	64
3.4. Анализ эффективности конструкций на протопластах.....	74
3.5. Получение растений картофеля с нокаутом по гену <i>Pain-1</i>	78
3.6. Нокаут по гену <i>Pain-1</i> приводит к снижению содержания редуцирующих сахаров в клубнях и светлой окраске чипсов.....	89
3.7 Нокаут по гену <i>Pain-1</i> не оказывает выраженного влияния на ростовые параметры, предположительно, за счет компенсаторного эффекта других генов метаболизма сахаров	96
3.8 Селекционные перспективы	100
Заключение	104
Выводы	107
Список использованной литературы.....	108
Приложения	128

Перечень условных обозначений

- БАП - 6-бензиламинопурин
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- НУК - 1-нафтилуксусная кислота
- ОТ – обратная транскрипция
- п.н. (bp) – пары нуклеотидов (base pairs)
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РНП – рибонуклеопротеин
- ТФ – транскрипционный фактор
- ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность
- CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) -
короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
- DSB (Double-strand break) - двухцепочечные разрывы
- GA (Gibberellic acid) – гибберелиновая кислота
- HR (Homologous recombination) – гомологичная рекомбинация
- Inh2 (Invertase inhibitor 2) – ингибитор инвертазы 2
- MAS (marker-assisted selection) – маркер-ассоциированная селекция
- NGS (Next Generation Sequencing) – технологии
высокопроизводительного секвенирования ДНК следующего поколения
- NHEJ (Non-homologous end joining) – негомологичное соединение
концов
- PAIN1 (POTATO ACID INVERTASE 1) – вакуолярная инвертаза
- PAM (Protospacer adjacent motif) - мотив, прилегающий к
протоспейсеру

QTL (Quantitative Trait Loci) – локус количественных признаков

SSN (Sequence-specific nuclease) - сайт-специфичная нуклеаза

TALLEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) - нуклеазы
на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции

Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* L., $2n = 4x = 48$) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. В умеренном климате его урожай собирают только раз в год, поэтому, для обеспечения длительного хранения клубни содержат при низких температурах (4–6 °C). При этом происходит распад крахмала на редуцирующие сахара (в основном, фруктозу и глюкозу) – так называемое холодное осахаривание. При определенной термической обработке (например, в процессе приготовления картофельных чипсов) эти сахара вступают в реакцию Майяра, что приводит к потемнению, появлению горечи и ухудшает товарные качества продуктов. При этом также происходит накопление акриламида, потенциального канцерогена. В связи с этим актуальной задачей является разработка технологий, направленных на создание сортов картофеля с пониженным содержанием редуцирующих сахаров. Известен ряд генов, контролирующих метаболизм сахаров и крахмала, влияющих на устойчивость к холодному осахариванию (амилазы (*Amy23*, *BAM1* и *BAM9*), ингибитор амилаз (*SbAI*), УДФ-глюкозо-пирофосфорилаза (*UGPase*), вакуолярная инвертаза (*Pain-1*), ингибитор инвертазы (*Inh2*)).

Следует отметить, что процесс селекции картофеля затруднен его полиплоидной природой и высокой гетерозиготностью сортов. Модификация генов-мишеней с помощью редактирования генома активно используется в мире для получения растений с новыми свойствами. Этот метод позволяет целенаправленно изменять гены и улучшать свойства сельскохозяйственных культур. В отношении картофеля редактирование генома уже применяется для модификации отдельных генов, однако в основном ограничивается сортами, наиболее легко поддающимися генетическим модификациям. Это связано с высокой зависимостью регенерационного потенциала от генотипа сорта и

сложностью подбора условий для эффективной генетической трансформации. Для сортов картофеля, распространенных в РФ, пока не отработаны протоколы получения и анализа генетически отредактированных растений, а полученные растения модельных сортов практически не используются в дальнейшей селекции. Однако в Российской Федерации активно обсуждается возможность внедрения генетически отредактированных форм в селекцию сельскохозяйственных культур (хотя в настоящее время оно еще запрещено на законодательном уровне), что делает разработку соответствующих технологий и создание прототипов новых сортов перспективным направлением исследований.

В данной работе мы используем стратегию получения новых доноров признака устойчивости к холодovому осахариванию для селекции картофеля с использованием редактирования генома. В основе подхода лежит нокаут гена *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу, у промышленного сорта. Данный фермент катализирует расщепление сахарозы в клубнях картофеля на глюкозу и фруктозу, участвуя в процессе холодovого осахаривания. Показано, что снижение экспрессии гена *Pain-1* в результате РНК-интерференции и его выключение методами редактирования генома приводят к снижению накопления редуцирующих сахаров у некоторых зарубежных сортов картофеля (Clasen *et al.*, 2016; Ly *et al.*, 2023; Yasmeen *et al.*, 2022), однако степень выраженности признака варьирует.

Получение селекционно-ценного донора сопряжено с рядом задач, решенных в ходе данного исследования. В первую очередь необходимо было выбрать генотип, в котором нокаут гена *Pain-1* с наибольшей вероятностью сможет обеспечить устойчивость к холодovому осахариванию. Учитывая, что картофель является высокогетерозиготной автотетраплоидной культурой, эффективное редактирование всех копий гена требовало разработки надежной

системы геномного редактирования, выбора способа тестирования ее мутагенной активности и оптимального метода анализа мутаций. Поскольку исследование проводили на промышленном сорте, для которого ранее не применяли биотехнологические методы, было необходимо адаптировать и оптимизировать протоколы стабильной генетической трансформации растений и трансформации протопластов.

Цель и задачи исследования

Цель работы – разработка стратегии использования технологии геномного редактирования для получения генотипов картофеля с повышенной устойчивостью к холодовому осахариванию на базе сортов, районированных в Российской Федерации.

Задачи:

- 1) Анализ содержания редуцирующих сахаров и уровня транскрипции генов вакуолярной инвертазы (*Pain-1*) и её ингибитора (*Inh2*) в клубнях сортов картофеля, районированных в Российской Федерации во время хранения при температуре 4 °С
- 2) Выбор сорта, наиболее подходящего для получения генетически отредактированных растений с нокаутом гена *Pain-1*.
- 3) Разработка и создание генетических конструкций для получения растений картофеля с нокаутом гена *Pain-1*, а также оценка эффективности их работы на протопластах картофеля, получение генетически отредактированных линий картофеля выбранного сорта и анализ мутаций в гене *Pain-1* у полученных линий.

4) Исследование влияния нокаута гена *Pain-1* в выбранном сорте на накопление редуцирующих сахаров в клубнях и их пригодность к переработке после хранения на холоде.

5) Исследование влияния нокаута гена *Pain-1* на размеры и продуктивность растений, а также на экспрессию генов, играющих роль в метаболизме редуцирующих сахаров.

6) Оценка возможности использования полученных генотипов в качестве доноров признака устойчивости к холодовому осахариванию.

Научная новизна работы

В ходе исследования впервые выявлены различия в паттернах транскрипции генов *Pain-1* и *Inh2* в клубнях сортов Никулинский, Невский, Симфония, что свидетельствует о генотип-зависимой регуляции холодового осахаривания. Впервые продемонстрирована способность векторной системы CasCADE (Hoffie, 2023), позволяющей создавать мультиплексные конструкции, вносить мутации в геном картофеля. Продемонстрировано соответствие эффективности работы векторной системы на протопластах и при получении растений с помощью агробактериальной трансформации, что показывает преимущества предварительного тестирования систем для геномного редактирования на протопластах. Показана корреляция между степенью снижения уровня редуцирующих сахаров в клубнях при хранении на холоде и количеством нокаутированных копий гена *Pain-1* в сорте Симфония, что также является важным для селекции картофеля по выраженности признака устойчивости к холодовому осахариванию. Впервые показано повышение транскрипции генов нейтральной инвертазы *Ninv5* и сахарозосинтазы *Sus4* в корнях растений картофеля, нокаутных по гену *Pain-1*, что позволяет предположить компенсаторный эффект данных генов.

Практическая значимость работы

Получены генетически отредактированные линии картофеля сорта Симфония, устойчивые к холодовому осахариванию, которые имеют ценность для селекции как доноры этого хозяйственно-ценного признака. Проведена гибридизация генетически отредактированных линий с сортом Гала и получены нетрансгенные гибриды F₁ (не содержащие в геноме генетическую конструкцию с геном *cas9* и направляющими РНК), которые в перспективе (при изменении законодательства) могут быть использованы в практике и для селекции новых сортов картофеля. Разработаны и впервые применены методы трансформации протопластов и агробактериальной трансформации картофеля сорта Симфония, которые впоследствии могут быть использованы для модификации других генов в данном генотипе. Разработаны новые направляющие РНК (нРНК) и генетические конструкции на основе векторной системы CasCADE, позволившие получить линии с нокаутом всех четырех копий гена *Pain-1*, что показало возможность их использования для эффективного мутагенеза в других сортах.

Положения, выносимые на защиту

- Количество функциональных аллелей гена *Pain-1* у тетраплоидного сорта картофеля Симфония коррелирует с уровнем редуцирующих сахаров в клубнях растений во время хранения при температуре 4 °С, влияя на их устойчивость к холодовому осахариванию.

- Разработана стратегия на основе технологии геномного редактирования, позволяющая получать растения картофеля с нокаутом всех четырех копий гена *Pain-1*, обладающие повышенной устойчивостью к холодовому осахариванию.

Вклад автора

Основные результаты, представленные в данной работе, были получены автором самостоятельно – анализ экспрессии генов; создание системы для нокаута гена вакуолярной инвертазы и тестирование ее активности на протопластах картофеля; получение стабильных трансформантов, анализ их генотипа, анализ пригодности клубней к переработке, анализ генотипа гибридов. Следующие этапы работы проводили с помощью коллег из ИЦиГ СО РАН: анализ содержания сахаров совместно с И. А. Сабоевым и Н. Е. Костиной; выращивание растений совместно с К. А. Колошиной; анализ последовательностей гена *Pain-1* в сортах совместно с Д. И. Каретниковым; секвенирование на платформе Illumina Miseq проводилось Г. В. Васильевым; гибридизация проводилась Ю. А. Гуреевой и А. С. Батовым. Автор выражает огромную благодарность А.В. Кочетову и С. В. Герасимовой за помощь в методологической и практической реализации исследования.

Апробация результатов

Основные результаты работы представлены на международных конференциях: VI Международной научной конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений (PlantGen 2021)» (Новосибирск, 2021), VII Международной научной конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений (PlantGen 2023)» (Казань, 2023), Международном конгрессе “CRISPR-2023” (Новосибирск, 2023). По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК, входящих в Международные базы цитирования (WoS, Scopus), а также глава в монографии.

Публикации

По теме диссертации было опубликовано 6 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

Публикации по теме работы в рецензируемых журналах:

1. **Егорова А.А.**, Сабоиев И.А., Костина Н.Е., Куваева Д.Д., Щербань А.Б., Ибрагимова С.М., Салина Е.А., Кочетов А.В. Генотип-специфические особенности регуляции процесса холодового осахаривания клубней картофеля. // Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57. – № 2. – С. 197-208. – DOI 10.31857/S0026898423020064

(Перевод: **Egorova A.A.**, Saboiev I.A., Kostina N.E., Kuvaeva D.D., Shcherban A.B., Ibragimova S.M., Salina E.A., Kochetov A.V. Genotype-Specific Features of Cold-Induced Sweetening Process Regulation in Potato Varieties Nikulinsky, Symfonia, and Nevsky. // Molecular Biology. – 2023. – Vol. 57. – No. 2. – P. 197-208. – DOI 10.1134/S0026893323020061)

2. **Egorova A.A.**, Zyкова Т.Е., Костина Н.Е., Сабоиев И.А., Колосшина К.А., Филипенко Е.А., Hoffie I., Hertig C., Hiekel S., Kumlehn J., Kochetov A.V., Gerasimova S. V. Reduction in Cold-Induced Sweetening by Cas9 Endonuclease-Mediated Knockout of the POTATO VACUOLAR INVERTASE 1 Gene in the Cultivar ‘Symfonia’. // Potato Res. – 2024. – DOI 10.1007/s11540-024-09800-6

Глава в монографии:

Егорова А. А., Иванова К. А., Герасимова С. В. Изоляция протопластов *Solanum tuberosum* и *Solanum verrucosum* и их PEG- опосредованная трансформация. Методы редактирования генов и геномов / Аббат А. В., Александрюшкина Н. А., Андреева Е. Д. [и др.]; отв. ред. С. М. Закиян, С. П. Медведев, Е.В.Дементьева,В.В.Власов; Рос. акад. наук,Сиб. отд-ние, ФИЦ Ин-т

цитологии и генетики [и др.]. — Новосибирск: Издательство СО РАН, 2020. — 550 с.

Тезисы конференций по теме работы:

1. Егорова А.А., Зыкова Т.Е., Сабоев И.А., Костина Н.Е., Колошина К.А., Хоффи И., Хикель Ш., Хертиг К., Чамас С., Филипенко Е.А., Кумлен Й., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Получение новых доноров для селекции картофеля путем нокаута гена вакуолярной инвертазы. // Материалы международного конгресса CRISPR-2023 (11–13 сентября 2023 год, Новосибирск, Россия). – Новосибирск: ИЦиГ СОРАН, 2023.

2. Egorova A., Zyкова T., Kostina N., Saboiev I., Koeppel I., Hertig C., Hiekel S., Chamas S., Kumlehn J., Chalaya N., Rogosina E., Kochetov A., Gerasimova S. The development of potato with reduced cold-induced sweetening facilitated by genome editing. Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2023): abstracts / Eds. A.A. Kalachev., T.A. Gorhkova, M.L. Ponomareva; FIC KazSC RAS // The 7th International Scientific Conference (July 10–15, 2023, Kazan, Russia). – Kazan: FEN, 2023. – С. 472.

3. Egorova A., Gerasimova S., Ibragimova S., Romanova A., Saboiev I., Domrachev D., Koeppel I., Hertig C., Hiekel S., Chamas S., Kumlehn J., Rogosina E., Chalaya N., Salina E., Kochetov A. Developing potato varieties with decreased cold-induced sweetening. Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021): The 6th International Scientific Conference (June 14–18, 2021, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2021. – С. 261– ISBN 978-5-91291-056-2. – DOI 10.18699/PlantGen2021-000.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из оглавления, перечня условных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 7 таблиц, 26 рисунков и 3 приложения.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Развитие методов селекции и биотехнологии картофеля

Картофель (*Solanum tuberosum* Group Tuberosum L.) ($2n = 4x = 48$) является третьей по значимости продовольственной культурой после риса и пшеницы (Devaux *et al.*, 2014). Он относится к *Solanaceae*, большому семейству растений, которое насчитывает более 3000 видов.

Эта культура появилась в Андах Южной Америки и в настоящее время насчитывает около 5000 сортов по всему миру (Zaheer and Akhtar, 2016). Картофель выращивается примерно в 125 странах, а общий объем его производства составляет более 374 млн. тонн по всему миру (www.cipotato.org). В последнее время производство картофеля быстро растет в развивающихся странах по сравнению с развитыми. В 2019 году крупнейшей страной-производителем картофеля был Китай (91,81 млн тонн), за ним следовали Индия (50,19 млн тонн), Россия (22,07 млн тонн), Украина (20,26 млн тонн) и США (19,18 млн тонн) (www.fao.org/faostat). На долю Китая и Индии в совокупности приходится почти треть мирового производства картофеля.

Картофель является богатым источником различных питательных веществ, включая углеводы, белок, витамин С, витамин В6, магний, калий, железо и пищевые волокна. Преобладающим видом углеводов в картофеле является крахмал, который также обладает полезными свойствами. Например, «резистентный» крахмал, который ферментируется микрофлорой в толстом кишечнике является источником короткоцепочечных жирных кислот, снижает уровень глюкозы в крови, а также действует в качестве пребиотика, поддерживая рост полезных кишечных бактерий (Zhao *et al.*, 2018). Будучи универсальной культурой, картофель может быть переработан в различные

формы, включая картофель фри, чипсы, пюре и консервированный картофель. Он также широко используется в фармацевтической, текстильной, деревообрабатывающей и бумажной промышленности (Fritsch *et al.*, 2017).

Картофель обладает одним из самых богатых генетических ресурсов среди всех культивируемых растений - около 200 диких видов в секции *Petota* рода *Solanum* (Spooner and Nijmans, 2001). Многие дикие виды, непосредственно скрещивающиеся с культивируемым картофелем, отличаются широким спектром устойчивости к вредителям, болезням, абиотическим стрессам и многими другими ценными признаками (Plaisted and Hoopes, 1989).

Коммерческий же картофель имеет низкое генетическое разнообразие из-за ограниченного запаса, изначально привезенного из южноамериканского центра происхождения в Европу, что приводит к острой инбредной депрессии и восприимчивости ко многим разрушительным вредителям и патогенам (Xu *et al.*, 2011). Являясь вегетативно размножаемой высокогетерозиготной полиплоидной культурой, картофель зачастую имеет сниженную фертильность, что создает барьеры для его размножения и селекции. У многих сортов наблюдаются слабое цветение или отсутствие ягодообразования, широко распространена цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), которая обусловлена мутациями в геноме митохондрий и приводит к неспособности пыльцы к оплодотворению. Автотетраплоидность приводит к мультивалентному спариванию хромосом во время мейоза, что вызывает их неравномерное расхождение, образование анеуплоидных гамет и, как следствие, снижение их жизнеспособности. Дисбаланс генетического материала ограничивает эффективность скрещиваний и селекционных программ (Bethke and Jansky, 2021; Choudhary *et al.*, 2020).

До сих пор в селекции картофеля применяется традиционный подход – селекционер выбирает два интересных ему тетраплоидных сорта, скрещивает их, получает как можно больше потомков, далее проводит их фенотипическую оценку и жесткий отбор. При использовании данной стратегии требуется около девяти лет для сбора достаточного количества данных по клону, чтобы решить, следует ли использовать его в качестве нового сорта или как родителя в очередном цикле селекции. Нужно отметить, что в каждой отдельной селекционной работе по получению нового сорта с использованием традиционного подхода проводится только одно первоначальное скрещивание двух сортов. Поэтому рекомбинация и перетасовка аллелей происходит только один раз. В конце XX века была предложена новая стратегия, которая основана на первоначальном получении диплоидных инбредных линий из тетраплоидных сортов, дальнейшем скрещивании их с другими диплоидными линиями или дикими видами картофеля и последующим возвращением к тетраплоидному состоянию. Данная стратегия позволяет селекционерам картофеля снизить генетический груз и избавиться от нежелательных свойств путем инбридинга, а затем объединить уже желаемые признаки посредством гибридизации. Но у этого подхода тоже есть свои трудности – например, создание и поддержание коллекции фертильных конкурентоспособных диплоидов, а также скрещивание диплоидов и тетраплоидов. Поэтому селекционеры до сих пор в основном пользуются классическими методами (Jansky and Spooner, 2018).

Основным препятствием для создания инбредных линий картофеля является гаметофитная самонесовместимость большинства диплоидных сортов. Цветковые растения часто избегают самоопыления, так как оно может привести к вымиранию вида (Wright *et al.*, 2013). У картофеля самонесовместимость регулируется S-локусом, включающим несколько генов, для которых

характерен множественный аллелизм. Опыление и оплодотворение происходят только в случае различающихся аллелей генов локуса S, независимо экспрессирующихся в тканях пестика и в пыльцевой трубке. Женский S-детерминант (S-РНКазы) находится в пестике и ингибирует рост пыльцевой трубки при самоопылении, разрушая рибосомную РНК пыльцы. Мужской S-детерминант (SLF-белки) в пыльце может нейтрализовать только неродственные S-РНКазы, убиквитинируя их для деградации. При самоопылении SLF не распознает родственную S-РНКазу, что приводит к блокировке роста пыльцевой трубки (Gavrilenko and Yermishin, 2017; Kubo *et al.*, 2015).

Дальнейшая разработка новых методов селекции невозможна без развития функциональной геномики, изучения экономически значимых для селекции генетических признаков, а также развития биотехнологии картофеля.

По мере накопления данных о генетике картофеля, у селекционеров появляется возможность выбирать потомков, несущих желаемые аллели, проводя генетический скрининг. Уже картированы основные гены, определяющие цвет мякоти, кожицы и цветков, форму клубней, глубину глазков, а также устойчивость к различным патогенам (Gebhardt, 2013; Slater *et al.*, 2014). Идет разработка молекулярных маркеров, которые используются в маркер-ассоциированной селекции (MAS), пирамидировании основных генов и аллелей QTL с большим эффектом, а также интрогрессии генов. Но некоторые количественные признаки, например, урожайность, считаются полигенными, и все еще не обнаружены QTL, которые бы определяли бóльшие доли фенотипической изменчивости данных признаков (Bradshaw, 2017).

Картофель довольно хорошо поддается технологиям *in vitro*, и имеет довольно длинную историю применения различных биотехнологических методов для своего улучшения.

В середине 20-ого века научились получать дигаплоидные линии из тетраплоидов, скрещивать их с диплоидными видами, и потом возвращать обратно на тетраплоидный уровень. Производство гаплоидного картофеля было продемонстрировано использованием *S. phureja* ($2n = 2x = 24$), которым опыляли *S. tuberosum* (Peloquin and Hougas, 1958). Такое циклирование между уровнями пloidности относительно легко осуществляется для картофеля и дает возможность упростить интрогрессию признаков из новых источников генетического разнообразия (R Ortiz, 1998).

Барьеры гибридизации также преодолевали путем двойного опыления и спасения абортированных эмбрионов с помощью культуры тканей (Watanabe *et al.*, 1995). Например, устойчивость к вирусу скручивания листьев картофеля была успешно внедрена из *S. etuberosum* в *S. tuberosum* через эмбриональную культуру (Chavez *et al.*, 1988).

К началу 1980-х годов рутинная изоляция и культура протопластов стала возможной для многих растений (Conner and Meredith, 1989). У протопластов отсутствует клеточная стенка, поэтому возможно произвести слияние клеток, в том числе разных видов. Регенерация соматических гибридных растений из этих клеток возможна при условии, что оба родительских вида тесно взаимосвязаны, даже если они не могут скрещиваться. Такие соматические гибридные растения предлагают новые источники зародышевой плазмы для интрогрессии признаков в культурные растения, хотя часто эти гибриды обладают низкой фертильностью. Соматическая гибридизация предоставила

возможности для интрогрессии в картофель новых источников устойчивости к болезням и вредителям (Gibson *et al.*, 1988; Helgeson *et al.*, 1998).

Картофель стал одной из первых культур, для которой были получены трансгенные растения и адаптированы протоколы агробактериальной трансформации (Barrell *et al.*, 2013). Этому способствовало использование методов трансформации для генетического улучшения, которое обладало преимуществами по сравнению с ограничениями, которые накладывает традиционная селекция картофеля. Как уже было сказано выше, картофель представляет собой гетерозиготную, полиплоидную культуру, которая размножается клубнями. Исторически сложилось так, что для создания улучшенных сортов картофеля использовалась традиционная селекция. Однако из-за уникальных проблем картофеля селекция неэффективна, когда необходимо объединить большое количество агрономических, товарных признаков, признаков устойчивости, или если требуется получить новые признаки, отсутствующие в банке зародышевой плазмы.

Трансформация позволяла добавлять отдельные гены к существующим элитным клонам картофеля без нарушений или с минимальными нарушениями их генетического фона (Conner *et al.*, 1997), что практически невозможно при традиционной селекции, так как из-за высокой гетерозиготности в геноме тетраплоидного картофеля генетическая целостность клонов картофеля теряется при половом размножении в результате аллельной сегрегации. Поэтому вставка или выключение экономически важных генов, с использованием технологий трансформации и геномного редактирования позволяют улучшить производственные и качественные признаки картофеля без воздействия на оптимальные комбинации аллелей в существующих сортах (Andersson, Turesson, Olsson, A. S. Fält, *et al.*, 2018; Clasen *et al.*, 2016; McCue *et al.*, 2018; Sun

et al., 2016). Трансформация была использована, например, для переноса генов устойчивости из диких видов картофеля (Haverkort *et al.*, 2016; Jo *et al.*, 2014), для введения токсичных белков против вредителей (Coombs *et al.*, 2002), для улучшения питательной ценности (Hellwege *et al.*, 2000).

Трансформацию успешно использовали для получения новых сортов картофеля. Например, устойчивые к колорадскому жуку растения картофеля, экспрессирующие токсин Cry3A, были выпущены компанией Монсанто под названием "NewLeaf". Они были коммерчески доступны в США с 1996 по 2000 гг., но позже исчезли с рынка в связи с предполагаемой обеспокоенностью потребителей, проблемами маркетинга и внедрением нового инсектицида, который контролирует как жуков, так и тлю (Shelton *et al.*, 2002).

1.2. Использование геномного редактирования в биотехнологии картофеля

Технологии редактирования генома, такие как TALENs (Transcription Activator Like Effector Nucleases), CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated systems), CRISPR/Cas12a (Cpf1) и редакторы оснований ДНК на основе Cas9, обеспечивают беспрецедентный прогресс в генной инженерии благодаря способности точной манипуляции с ДНК. Редактирование генома широко применяется в растениях и произвело революцию в улучшении сельскохозяйственных культур.

Редактирование генома облегчает целенаправленную вставку, замену или выключение генов у растений. Сайт-специфичные нуклеазы (SSN, Sequence-specific nuclease), такие как CRISPR/Cas9 и TALENs, создают двухцепочечные разрывы (DSBs, Double-strand breaks) в целевом локусе, восстановление

которых в клетке происходит либо путем негомологичного соединения концов (NHEJ, Non-homologous end joining), когда расщепленная молекула ДНК просто восстанавливается, часто с ошибками, что приводит к нокауту (выключению) гена; либо путем гомологичной рекомбинации (HR, Homologous recombination), при которой донорная ДНК может быть использована для изменения одного или нескольких нуклеотидов, вставки целого трансгена.

TALEN – нуклеазы состоят из двух основных компонентов. Модифицированные TAL-эффекторы представлены повторяющимися аминокислотными последовательностями (TALE-повторами). Каждый повтор содержит 34 аминокислоты, а специфичность связывания с определенным нуклеотидом определяется двумя варьирующимися аминокислотами (RVD) на позициях 12 и 13. Эти повторяющиеся домены позволяют TALEN направленно связываться с нужным участком генома. Второй компонент, домен FokI, вносит двуцепочечный разрыв в ДНК. FokI функционирует только в виде димера, поэтому для эффективного разрезания требуется две TALEN-молекулы, которые связываются с противоположными цепями ДНК, расположенными на небольшом расстоянии друг от друга. Данные нуклеазы необходимо проектировать под каждый новый «адрес» в геноме (Malzahn *et al.*, 2017).

Инженерные нуклеазы CRISPR/Cas9 в качестве «адреса» используют направляющие РНК (нРНК). нРНК (или guideРНК, sgРНК) являются искусственными химерными молекулами, которые объединяют в себе tracrРНК (транс-активирующая РНК) и crРНК (CRISPR-ассоциированная РНК). В естественных условиях crРНК содержит последовательность, комплементарную целевому участку ДНК, и направляет Cas9 к нужному месту, а tracrРНК связывается с crРНК и необходима для активации Cas9. Нуклеазы нацеливаются на специфичную для нРНК последовательность ДНК, называемую

протоспейсером. Мотив, прилегающий к протоспейсеру, обозначается аббревиатурой PAM (Protospacer adjacent motif), для Cas9 он имеет вид 5'-NGG-3', а совокупность протоспейсера и PAM называют сайтом-мишенью. Нуклеазы вносят двуцепочечный разрыв за три нуклеотида от PAM (Jinek *et al.*, 2012; Nadakuduti *et al.*, 2018) (Рисунок 1). Система CRISPR/Cas9 продемонстрировала большой потенциал в различных видах сельскохозяйственных культур благодаря своей простоте использования и универсальности (Jiang *et al.*, 2013; Shimatani *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2015; Svitashv *et al.*, 2016). Другая нуклеаза, CRISPR/Cas12a, использует PAM 5'-TTTN-3', что позволяет нацеливаться на АТ-богатые регионы, а также ей не требуется tracrRNA. В отличие от Cas9, которая разрезает обе нити ДНК в одном месте, образуя «тупые» концы, Cas12a создает «липкие» концы длиной 4–5 нуклеотидов, оставляя одну нить длиннее другой. Это повышает эффективность и специфичность генетических вставок. Она также становится не менее эффективной альтернативой, применяемой в различных растениях (Kim *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017).

Технология редактирования оснований (Base editor), разработанная на базе системы CRISPR/Cas9, производит замены оснований, не требуя расщепления дцДНК. Cas9 сконструирован таким образом, чтобы сохранять способность связывать ДНК без нуклеазной активности, например, каталитически неактивный Cas9 (dCas9) или расщепляет только одну из цепей - никаза (nCas9) (Jinek *et al.*, 2012). Если dCas9 или nCas9 слить с цитидиндеаминазой, опосредующей превращение цитидина в уридин, получится редактор оснований, приводящий к замене С→Т (или G→А) (Рисунок 1). Также были разработаны редакторы адениновых оснований, которые преобразуют А→G (или Т→С) (Gaudelli *et al.*, 2017). Редактирование оснований было успешно применено в растениях для обеспечения как усиления

функции путем включения правильных мутаций, так и потери функции путем создания нокаутирующих мутаций (Kang *et al.*, 2018; Lu and Zhu, 2017; Shimatani *et al.*, 2017; Zong *et al.*, 2017).

Также, технология геномного редактирования не просто показала свой большой потенциал в селекции, но и начала выходить на рынок – например, в 2021 году появились первые коммерчески-доступные томаты, полученные с применением системы CRISPR/Cas9 (Waltz, 2022).

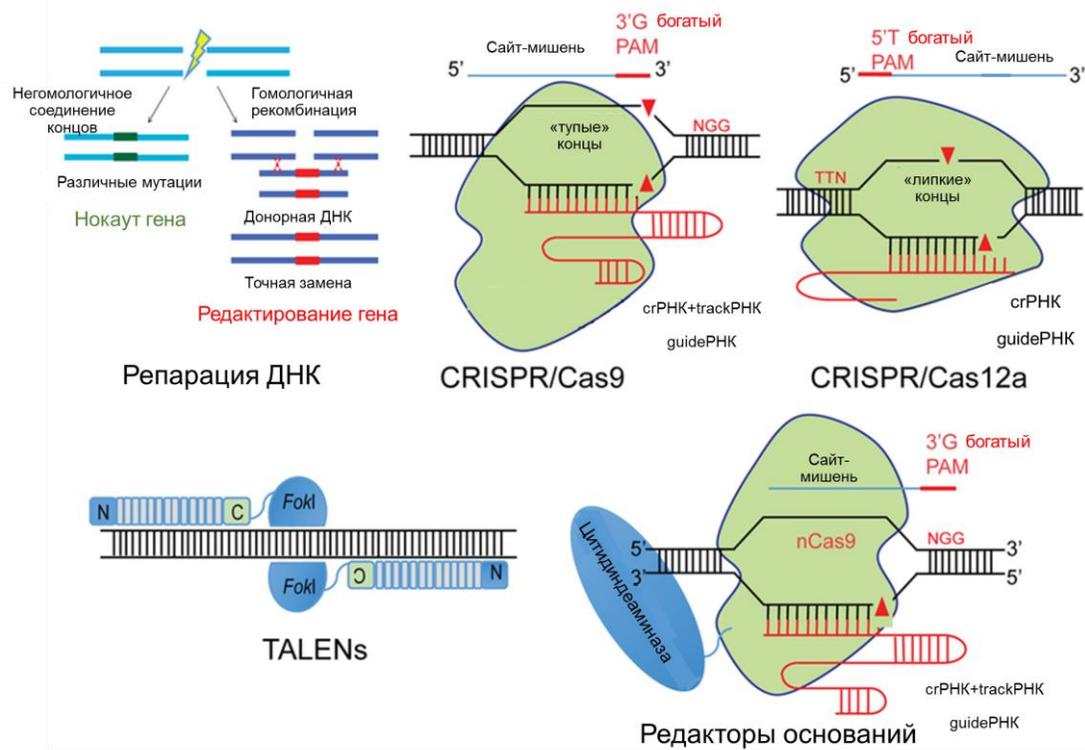


Рисунок 1. Технологии для редактирования генома (Nadakuduti *et al.*, 2018). DNA repair – рассмотрен процесс репарации двуцепочечных разрывов в ДНК. CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas12a, TALENs, Base editor – иллюстрации работы различных систем редактирования генома. Подробные пояснения приведены в тексте.

Примеры использования технологий геномного редактирования в картофеле

Первая успешная демонстрация использования TALENs в тетраплоидном сорте картофеля была проведена путем нокаута всех четырех аллелей стероловой редуктазы боковой цепи 2 (*StSSR2*) (Sawai *et al.*, 2014), участвующей в синтезе стероидных гликоалкалоидов (SGA). А уже на следующий год было продемонстрировано использование системы CRISPR/Cas9 для нокаута гена, участвующего в регуляции ответа на ауксин (Wang *et al.*, 2015).

К настоящему времени с использованием геномного редактирования стали получать перспективные для коммерческого использования растения, например, с измененным качественным составом крахмала (Andersson *et al.*, 2017; Andersson, Turesson, Olsson, A. S. Fält, *et al.*, 2018), устойчивые к ферментативному потемнению (González *et al.*, 2020) и холодовому осахариванию (Clasen *et al.*, 2016). Модификацией генов восприимчивости удалось повысить устойчивость картофеля к фитофторе (Kieu *et al.*, 2021) и вирусу Y (Makhotenko *et al.*, 2019), а нокаутом гена *S-RNase* удалось преодолеть гаметофитную самонесовместимость, которая затрудняет селекцию картофеля (Enciso-Rodriguez *et al.*, 2019). Также на картофеле уже было продемонстрировано использование вариаций системы CRISPR/Cas9, например, системы, распознающие разные PAM или осуществляющие редактирование оснований (Veillet, Kermarrec, *et al.*, 2020; Veillet, Perrot, *et al.*, 2020). Но, к сожалению, новых коммерчески-доступных сортов картофеля, полученных с использованием геномного редактирования, пока нет.

1.3. Трансформация и регенерация картофеля

Для получения новых растений с измененным геномом необходимо сначала провести трансформацию клеток растений - ввести туда генно-редактирующие компоненты, а потом регенерировать целые растения из модифицированных клеток.

Тремя основными методами генетической трансформации растений являются: агробактериальная трансформация, биобаллистика и трансфекция протопластов. При трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* используется бинарная векторная система, которая состоит из двух плазмид. T-ДНК-плазида содержит ген(ы) интереса, который интегрируется в геном растения-хозяина, что приводит к стабильной трансформации и, как следствие, к постоянной активности встроенных генов. Плазида-помощник содержит гены, необходимые для процесса переноса T-ДНК, но сама не переносится. Однако встречаются случаи, когда T-ДНК также не интегрируется в геном и гены интереса экспрессируются транзистентно (Nadakuduti *et al.*, 2018).

Возможными источниками эксплантов для агробактериальной трансформации картофеля являются листья, побеги и клубни. Однако большинство экспериментов было проведено с использованием листовых эксплантов. При регенерации растений обычно используются два типа протоколов – первый тип направлен на прямую регенерацию побегов из эксплантов, обычно используется один тип среды для регенерации с различными вариациями ауксинов, цитокининов и гиббереллинов. Второй тип использует две среды – первая, каллусообразующая, содержит большое количество ауксинов, которые полностью или практически полностью отсутствуют во второй побегообразующей среде, в ней ауксины обычно заменены на гиббереллины (Vinterhalter *et al.*, 2008). Регенерация является

важным этапом получения генно-модифицированных растений, и ее эффективность сильно зависит от генотипа. Например, у сортов картофеля Дезире и Марис Пайпер наблюдалась высокая способность к регенерации побегов, тогда как у сортов Аптудейт и Романо регенерационная способность была крайне низкая (Wheeler *et al.*, 1985). Также показано, что разным генотипам могут требоваться разные формы и дозы гормонов, что может быть связано с различиями в активности рецепторов (Park *et al.*, 2023). Например, бензиламинопурин (BA) более эффективен, чем кинетин, в процессе органогенеза побегов у сортов Диамант, Малта, Атлас и Ларпакри (Shirin *et al.*, 2007).

Биобаллистическая трансформация основана на физическом процессе доставки ДНК в клетки растений. ДНК иммобилизуется на поверхности инертных металлических частиц (золотых или вольфрамовых), и они доставляются в трансформированный объект с помощью специальной генной пушки. Доставляемая ДНК может как встраиваться в геном, так и экспрессироваться транзистентно (Altpeter *et al.*, 2016). В биотехнологии картофеля биобаллистическая трансформация используется довольно редко (Malakhova *et al.*, 2021), не было случаев ее использования для геномного редактирования. Однако данный тип трансформации активно используется для трансформации хлоропластов (Occhialini *et al.*, 2020).

Протопласты растений представляют собой клетки, лишённые клеточной стенки. Для этого их подвергают обработке ферментами, такими как целлюлаза и пектиназа. С использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ), а также электропорации или микроинъекции можно произвести их трансфекцию молекулами ДНК, РНК или белков (Yoo *et al.*, 2007). Протопласты используют для оценки эффективности генно-редактирующих компонентов, а также

получают из них полноценные генетически отредактированные растения (Xu *et al.*, 2022). Для повышения специфичности и сокращения продолжительности активности генно-редактирующих компонентов в клетке используют доставку в протопласты очищенного рекомбинантного белка Cas9 или Cas12a вместе с транскрибированной *in vitro* или синтетически полученной нРНК, образующей рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП). Белок Cas9 продолжает экспрессироваться в клетке в течение нескольких дней при доставке в виде плазмиды, тогда как при доставке в виде РНП он разрушается в течение 24 ч, что повышает специфичность реагента (Zetsche *et al.*, 2015). Описаны случаи, как предварительно собранные РНП комплексы с Cas9 или Cas12a были успешно доставлены в протопласты арабидопсиса, табака, салата, риса, пшеницы, сои и картофеля, а в дальнейшем из них получены генетически отредактированные растения-регенеранты (Andersson, Turesson, Olsson, A.-S. Fält, *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2015). Использование РНП позволяет исключить возможность интеграции чужеродной ДНК в геном хозяина. Такие растения, без интеграции чужеродной ДНК, вероятнее будут разрешены для выращивания в коммерческих целях (Clasen *et al.*, 2016; Haun *et al.*, 2014).

Для получения полноценных генетически отредактированных растений картофеля из протопластов, их изолируют из листовых пластинок, и трансформируют. Потом протопласты заключают в альгинатные линзы, и помещают в жидкие среды для каллусообразования. Подросшие каллусы освобождают из альгината и помещают на твердые среды для побегообразования (Nicolia *et al.*, 2021).

1.4. Холодовое осахаривание в клубнях картофеля

Так как урожай картофеля в умеренном климате собирают только раз в год, то для того, чтобы питаться им круглогодично, клубни картофеля обычно хранят в холодных условиях. При комнатной температуре срок их хранения не превышает шести месяцев (Bianchi *et al.*, 2014). К тому же холод предотвращает прорастание, усыхание и распространение болезней. Однако одним из недостатков хранения на холоде является накопление редуцирующих сахаров и появление сладкого вкуса (cold-induced sweetening, CIS, холодное осахаривание). Это влияет на товарные характеристики клубней, так как при термической обработке (например, при приготовлении картофельных чипсов), эти сахара реагируют со свободными аминокислотами в реакции Майяра, что приводит к появлению темноокрашенных горьких продуктов (Zhang *et al.*, 2017). Также образуется акриламид – амид акриловой кислоты, образуется в реакции между аспарагином и редуцирующими сахарами и имеет потенциальные канцерогенные свойства (Raffan and Halford, 2019; Zhivagui *et al.*, 2019).

Накопление сахаров происходит вследствие распада крахмала. Крахмал — это наиболее ценная составляющая клубней, определяющая их питательную и технологическую ценность. Крахмал выполняет запасующую функцию, он химически инертен и не влияет на осмотическое давление. Но под влиянием температур меньше 10°C он распадается на простые сахара, которые участвуют в поддержании внутриклеточного осмотического давления, тем самым увеличивая резистентность растений к холоду (Слугина и Кочиева, 2018). Накопление сахаров в ответ на холод, по-видимому, полезно для выживания диких предков современных сортов картофеля, которые происходят из Анд, но

в данный момент это нежелательный признак для культурных растений, так как клубни картофеля имеют высокий круглогодичный спрос, для поддержания которого около 70 % осеннего урожая картофеля помещается на средне-долгосрочное хранение (Sowokinos, 2001). Поэтому предотвращение процесса холодового осахаривания картофеля крайне важно для пищевой промышленности.

Большинство сортов картофеля, используемых в настоящее время для производства картофельных чипсов и картофеля фри, накапливают значительное количество редуцирующих сахаров во время хранения при температуре ниже 7 °С (Sowokinos, 2001). Для того, чтобы снизить в них содержание сахара, проводят процедуру рекондиционирования — выдерживание клубней при более высоких температурах (+18...+20 °С) в течение не менее двух недель после холодного хранения. Этот процесс достаточно трудозатратный, поскольку требует специального секционного оборудования, позволяющего отдельно регулировать температуру, а значит — дополнительных финансовых и технических ресурсов. Тем не менее, среди современных отечественных и зарубежных сортов картофеля лишь немногие не нуждаются в рекондиционировании после хранения в холоде (Гайзатулин, 2021). Сравнительная оценка 107 сортов и гибридов отечественной и зарубежной селекции из коллекционного питомника ФГБНУ ВНИИКХ выявила, что только 12 сортообразцов сохраняют высокое качество ломтиков хрустящего картофеля после хранения 3 месяца при температуре 4-5 °С без рекондиционирования. Наиболее стабильными показателями цвета ломтиков отличались сорта Наяда, Инноватор, Фрителла (Гайзатулин *et al.*, 2019). В другом исследовании оценка 69 сортов отечественной и зарубежной селекции было отмечено, что после 6 месяцев хранения при температуре 2-4 °С невысокое

содержание редуцирующих сахаров (меньше 0.6 %) наблюдалось только у 4 сортов - Витессе, Дубрава, Криница, Надежда (Волков *et al.*, 2021). Устойчивость к холодовому осахариванию также показали такие сорта как Леди Розетта, Хермез, Крозо, Леди Клэр, Верди, Кибитз, Бинтье (Amjad, 2017; Shumbe *et al.*, 2020; Visse-Mansiaux *et al.*, 2024).

В США и Великобритании до сих пор для производства жареных продуктов используют «старые» сорта, созданные в начале прошлого века, которые изначально не предназначались специально для нужд перерабатывающей промышленности, а лишь были адаптированы с учетом соответствия отдельным её требованиям (Гайзатулин, 2021). Современные генотипы *S. tuberosum* не считаются хорошим источником генов устойчивости к холодовому осахариванию (Luthra *et al.*, 2009) и в селекцию вовлекаются дикие родственники картофеля, устойчивые к холодовому осахариванию (Hamernik *et al.*, 2009; McCann *et al.*, 2010). Началом активной селекции на устойчивость к холодовому осахариванию можно считать сорт Ленапе (Love *et al.*, 1998), имеющий в своей родословной дикий вид *S. chacoense*. Данный сорт в дальнейшем был снят с производства, так как накапливал большое число токсичных стероидных гликоалкалоидов, но послужил в селекции других пригодных к переработке на хрустящий картофель сортов, например, Атлантик и Сноуден, которые являются одними из самых распространенных таких сортов в Америке (Wu *et al.*, 2011). Источником признака устойчивости к холодовому осахариванию в сорте Норвалли является *S. phureja* (Novy *et al.*, 1998). *S. berthaultii* входит в родословную пригодных к переработке сортов Аккумулятор, Калкаска, Лела, Николет, Пинакл, Тундра и Уайт Пёрл, а *S. raphanifolium* – Дакота Рассет (Jansky *et al.*, 2021).

Генетическая регуляция холодового осахаривания

Установлены ключевые участники процесса холодового осахаривания, которые кодируют ферменты, участвующие в метаболизме сахарозы и крахмала, а также гены, регулирующие активность данных ферментов. Во время хранения клубней картофеля на холоде распад крахмала в амилопластах запускается через индукцию амилолитических ферментов. Было показано, что транскрипция амилаз *Amy23*, *VAM1* и *VAM9* повышается в клубнях в ответ на холод и приводит к накоплению редуцирующих сахаров, а активность ингибитора амилаз *SbAI* - к уменьшению накопления редуцирующих сахаров (Hou *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014). Продукты распада выводятся из амилопласта либо в виде гексозофосфатов (гексоза-Р) через глюкозо-фосфат-транслокатор, либо в виде свободных сахаров через транспортеры глюкозы и/или мальтозы. В цитозоле эти метаболиты преобразуются в сахарозу через сахарозо-6-фосфат синтазу (SPS) и сахарозо-6-фосфат фосфатазу (S6P). Также сахароза образуется при участии УДФ-глюкозо-пирофосфорилазы, некоторые аллельные варианты которой ассоциированы с устойчивостью к холодовому осахариванию (Gupta and Crants, 2019; McKenzie *et al.*, 2005). Затем сахароза гидролизуется на составляющие ее гексозы инвертазами (INV) (Chen *et al.*, 2007) (Рисунок 2).

Инвертазы осуществляют необратимый гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Они связаны с метаболизмом углеводов и играют важную роль не только в росте и развитии растения, но и в защитных механизмах. Всего у растений обнаружены три типа инвертаз: инвертазы, связанные с клеточной стенкой и расщепляющие сахарозу в апопласте (апопластические инвертазы); растворимые кислые инвертазы, локализованные в вакуолях (вакуолярные

инвертазы); цитоплазматические растворимые нейтральные инвертазы (Abbas *et al.*, 2022).

Вакуолярная инвертаза (PAIN-1) (beta-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) вносит основной вклад в холодовое осахаривание у картофеля. В отличие от остальных инвертаз, для нее характерно наличие только одного локуса на третьей хромосоме (Draffehn *et al.*, 2010). Была показана активация транскрипции гена *Pain-1* при воздействии холода, а подавление экспрессии этого гена методом РНК-интерференции (Bhaskar *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014) и его нокаут методом TALEN (Clasen *et al.*, 2016) приводят к уменьшению накопления редуцирующих сахаров на холоде. Также, полученные из генетически отредактированных растений чипсы имеют более светлую окраску, чем чипсы из контрольных растений. Во время подготовки данной работы были получены нокауты вакуолярной инвертазы со сниженным содержанием редуцирующих сахаров методом CRISPR/Cas9 (Ly *et al.*, 2023; Yasmeen *et al.*, 2022), что также подтверждает перспективность нокаута этого гена при получении новых генотипов с устойчивостью к холодовому осахариванию.

У картофеля ген вакуолярной инвертазы идентифицирован, изучена его структура и экспрессия, а также найдены однонуклеотидные замены (SNPs), определяющие активность фермента (Draffehn *et al.*, 2010; Слугина and Кочиева, 2014). Было показано, что активность промотора вакуолярной инвертазы регулируется сахарами, гормонами, холодом (Ou *et al.*, 2013), а гиперметилирование промотора приводит к снижению экспрессии гена и накопления редуцирующих сахаров (Shumbe *et al.*, 2020).

Регуляция инвертазы также происходит не только на уровне транскрипции, но и посттрансляционно, с участием ингибиторов.

Секвенирование и характеристика ингибиторов инвертаз картофеля выявили два ингибитора, INH1 и INH2, которые локализованы соответственно в апопласте и вакуолях. Гены *Inh1* и *Inh2* расположены на хромосоме 12 в тандемной ориентации. Для *Inh2* было показано наличие альтернативного сплайсинга: транскрипт *Inh2 α* кодирует полноразмерный белок, а гибридные мРНК *Inh2 β* представляют из себя результат сплайсинга верхнего участка гена *Inh2* и нижнего участка гена *Inh1*. Также экспрессия *Inh2* была выше в сортах, устойчивых к холодовому осахариванию, по сравнению с чувствительными (Brummell *et al.*, 2011). Была выявлена негативная корреляция уровня экспрессии *Inh2* с накоплением редуцирующих сахаров на холоде в клубнях (Liu *et al.*, 2010). Оверэкспрессия генов-ингибиторов *StInvInh2A* и *StInvInh2B* (альтернативные обозначения *Inh2 α* и *Inh2 β*) в чувствительных к холодовому осахариванию и РНК-интерференция в устойчивых к холодовому осахариванию генотипах показали, что активность вакуолярной инвертазы регулируется ингибиторами без влияния на ее транскрипцию (Liu *et al.*, 2013).

Изучение комплекса между инвертазой клеточной стенки арабидопсиса (INV1) и ингибитора β -фруктозидазы клеточной стенки табака (CIF) показало, что последовательность ингибитора инвертазы содержит аминокислотный мотив Pro118-Lys119-Phe-120, который напрямую взаимодействует с активным сайтом инвертазы. Этот мотив высоко консервативен в ингибиторах инвертаз и, предположительно, играет аналогичную роль у ингибитора вакуолярной инвертазы картофеля (Datir, 2021; Hothorn *et al.*, 2010).

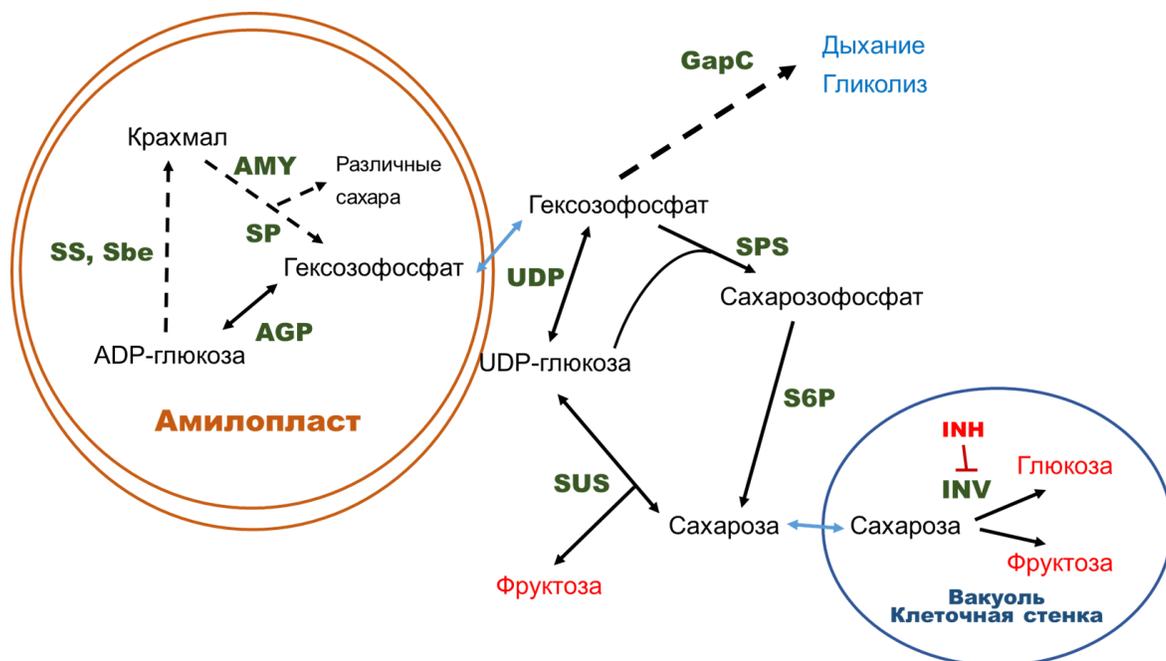


Рисунок 2. Участники процесса холодового осахаривания в клубнях картофеля. AGP - АДФ-глюкозо-пирофосфорилаза, AMY – амилазы, GapC - глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, INH – ингибиторы инвертаз, INV - инвертазы (вакуолярная и апопластические), Sbe - крахмал-ветвящий фермент, S6P - сахароза-фосфатаза, SP – фосфорилаза крахмала, SPS - сахарозо-фосфат-синтаза, SS - крахмалсинтазы, SUS – сахарозосинтаза, UDP - УДФ-глюкозо-пирофосфорилаза. Адаптировано из (Datir, 2011).

Роль вакуолярной инвертазы не ограничивается только участием в холодовом осахаривании. Она контролирует распределение сахаров между различными тканями, также участвует в накоплении гексоз в плодах. Гидролиз сахарозы на глюкозу и фруктозу влияет на осмотическое давление в клетках и, таким образом, способствует удлинению клеток и росту растений (Kulshrestha *et al.*, 2013).

Супрессия вакуолярной инвертазы повлияла на длину главного корня у моркови, несмотря на нормальное развитие, он был короче, чем у контрольных

растений (Tang *et al.*, 1999). Было обнаружено, что наибольшая экспрессия вакуолярной инвертазы в растениях огурца наблюдается именно в зоне растяжения в корне (Chen *et al.*, 2021). Экспрессия этого гена положительно коррелирует со скоростью удлинения хлопковых волокон, а растения арабидопсиса, трансформированные вакуолярной инвертазой из хлопка (Wang *et al.*, 2010) и чая (Qian *et al.*, 2018) демонстрировали длинные корни. В картофеле экспрессия вакуолярной инвертазы повышалась в ответ на ауксин и гибберелиновую кислоту (Ou *et al.*, 2013) - гормоны, для которых показано активное участие в ростовых процессах. А также ее экспрессия наблюдалась в листьях, корнях, побегах и цветках (Abbas *et al.*, 2022).

Несмотря на продолжающиеся исследования процесса холодового осахаривания, относительный вклад генов, чьи ферменты участвуют в этом процессе, а также механизмы их регуляции остаются недостаточно изученными. Скорее всего, что наряду с общими особенностями генетической регуляции холодового осахаривания существуют и генотип-зависимые особенности, связанные с дифференцированным вкладом того или иного гена в этот процесс. Соответственно, для выработки оптимальной стратегии искусственного ингибирования процесса холодового осахаривания в селекционно-ценных сортах картофеля, необходимо детально исследовать динамику накопления сахаров в клубнях разных генотипов на холоде, параллельно оценивая уровень экспрессии, в первую очередь, структурных и метаболических генов, а также генов, вовлеченных в их регуляцию на разных уровнях.

1.5. Заключение по обзору литературы и формулировка задачи исследования

Холодовое осахаривание негативно влияет на товарные характеристики клубней картофеля, и поэтому получение новых устойчивых генотипов является актуальной задачей. При получении новых сортов или доноров для селекции с определенными характеристиками перед учеными или биотехнологами, селекционерами стоит важная задача выбора стратегии их получения. В данном литературном обзоре было рассмотрено современное состояние биотехнологии и селекции картофеля, в частности описание методов трансформации и геномного редактирования, которые были успешно использованы на картофеле. Модификация генов с помощью РНК-направленной нуклеазы Cas9 в настоящее время является одним из самых новых и перспективных методов в биотехнологии растений, поэтому мы решили использовать данную технологию для получения новых доноров, устойчивых к холодному осахариванию.

Использование геномного редактирования требует тщательного планирования. Необходимо, во-первых, выбрать подходящие гены-кандидаты и генотипы для модификации, потому что от этого зависит, получится ли в итоге организм с желаемыми признаками. Во-вторых, использовать эффективные методы редактирования генома. Поэтому в рамках данной работы была разработана стратегия (Рисунок 3), состоящая из следующих этапов – первый это выбор гена-мишени для редактирования, который мы рассмотрели в литературном обзоре. Второй этап заключался в выборе донорного материала, тем самым мы выбрали подходящие объекты для редактирования. Следующие этапы работы заключались в создании технологической платформы для эффективного осуществления геномного редактирования - создание конструкций, оценка их эффективности и получение растений с мутациями в

целевых генах. Далее проводился анализ фенотипа генетически отредактированных растений, и, наконец, оценка возможности использования полученных линий как доноров для селекции. Эти этапы описаны в последующих главах данной работы.



Рисунок 3. Схема разработанной стратегии получения доноров с устойчивостью к холодному осахариванию для селекции картофеля с применением методов редактирования генома.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Растительный материал

Для работы использовались четыре сорта *Solanum tuberosum* L. - Гала (Norika, Германия, сорт был включен в Госреестр РФ в 2008 году), Невский (Северо-Западный НИИСХ), Никулинский (ФГБНУ «ВНИИ картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха»), Симфония («HZPC Holland B. V.», Голландия, сорт был включен в Госреестр РФ в 1996 году).

Для анализа содержания сахаров и экспрессии генов в сортах растения выращивали на поле СибНИИРС ИЦиГ СО РАН, урожай убирали в конце августа. Клубни просушивали на открытом воздухе в течение 7 дней при температуре 23°C, затем упаковывали в небольшие бумажные пакеты и хранили в холодильной камере (Pozis, линия Paracels) при фиксированной температуре 4 °C. Данная температура была выбрана, так как она используется при промышленном хранении картофеля.

Отобранный для направленного мутагенеза генотип выращивали в условиях *in vitro* на среде MS (Murashige and Skoog, 1962), в состав которой входило 4.4 г/л солей и витаминов MS, 20 г/л сахарозы, 6 г/л фитоагара (Duchefa, Нидерланды), pH 5.7–5.8 при температуре 20±2 °C, освещенности 8000 люкс, в условиях длинного дня, каждые 3-4 недели растения черенковали и рассаживали по новым пробиркам.

2.2. Анализ содержания сахаров

В клубнях культурного картофеля определяли содержание глюкозы в контрольной точке в момент закладки на хранение и спустя 90 дней хранения при температуре 4 °С с помощью глюкозооксидазного метода, используя набор «Глюкоза-Ново» («Вектор Бест», Новосибирск). Была проведена экстракция 80 % этанолом: 200 мг образца растирали в 1 мл спирта, центрифугировали при 40 °С, отбирали супернатант и повторяли данный этап. Далее доводили объем до 10 мл, к 200 мкл образца добавляли 2 мл реагента, инкубировали 10 минут при 37 °С. Для определения оптической плотности раствора использовали сканирующий спектрофотометр СПЕК ССП-705 (ЗАО «Спектроскопические системы», Москва). Содержания глюкозы рассчитывали по калибровочным графикам.

Анализ содержания сахаров в генетически отредактированных растениях проводили с помощью набора Sucrose, D-Fructose and D-Glucose (Megazyme, K-SUFRG 04/18). 500 мг каждого образца были очищены при помощи растворов Carrez I и Carrez II. Для определения оптической плотности раствора использовали сканирующий спектрофотометр СПЕКС ССП-705. Содержания сахаров были рассчитаны согласно инструкции производителя.

2.3 Анализ последовательностей гена *Pain-1* в исследуемых сортах картофеля

Было произведено секвенирование геномов сортов Никулинский, Невский, Симфония (проведено в рамках Курчатовского геномного центра ИЦиГ СОРАН). Проведен препроцессинг наборов сырых прочтений технологии секвенирования Illumina, после чего фильтрованные прочтения картировались

на референсный геном картофеля *Solanum tuberosum* DM1-3 v4.03 (Karetnikov *et al.*, 2023). Для выявления однонуклеотидных замен в гене *Pain-1* (PGSC0003DMG400013856) применялся конвейер GATK Best Practices пакета GATK. Далее проводилось сравнение выявленных замен с описанными в литературе однонуклеотидными заменами, связанными с устойчивостью к холодовому осахариванию.

2.4. Анализ экспрессии генов

Для анализа экспрессии генов в клубнях сортов суммарную РНК выделяли из срединной части клубней (по три клубня каждого сорта) в контрольной точке в момент закладки на хранение и через 15 и 90 дней хранения при 4 °С с использованием RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Для анализа экспрессии генов в корнях генетически отредактированных линий суммарную РНК выделяли из корней пробирочных растений (использовались три растения каждой линии). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (RNase-Free DNase Set, “Qiagen”, Германия). Концентрацию определяли с использованием NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США), качество РНК оценивали электрофорезом и с помощью Qubit 3.0 Fluorometer (“Thermo Scientific”, США). кДНК синтезировали с помощью iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (“Bio-Rad”, США) и набора реактивов ОТ M-MuLV–RN (“Биолабмикс”, Россия), использовали 100 нг РНК на образец. Для анализа экспрессии полученную кДНК разводили в 10 раз. Количественную ПЦР проводили в автоматическом анализаторе LightCycler® 96 (“Roche”, Швейцария) в объеме 15 мкл, включая 7.5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (×2) (“Биолабмикс”), 0.4 мкл каждого

праймера (10 мкМ), 3 мкл кДНК. Условия реакции с каждой парой праймеров: 95°C, 10 мин; затем 45 циклов – 95°C, 10 с, 61°C, 10 с, 72°C, 15 с.

Предварительно экспрессию референсных генов-кандидатов *APRT* (CK270447), *EF-1- α* (AB061263) и *SEC3A* (XM_006342541.2) анализировали в различных точках, для итогового анализа в качестве референсного выбрали ген *APRT* (аденин-фосфорибозилтрансфераза), имеющий наиболее стабильный уровень экспрессии в клубнях. Стабильный уровень экспрессии этого гена в клубнях картофеля при холодовом стрессе также показан в работе (Lopez-Pardo *et al.*, 2013). Уровень транскриптов *Pain-1* (HQ110080.1, PGSC0003DMG400013856) и *Inh2* (XM_006349784.2, PGSC0003DMG400004616) относительно референсного гена оценивали при помощи LightCycler® 96 Software. Для анализа экспрессии генов *Ninv5* (PGSC0003DMG400009936) и *Sus4* (PGSC0003DMG400002895) в генетически отредактированных линиях суммарную РНК выделяли из клубней (после 15-дневного хранения при 4 °C) и корней пробирочных растений (использовались три растения каждой линии). Уровень транскриптов *Ninv5* и *Sus4* оценивали относительно всех трех референсных генов. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в приложении 1. Последовательности праймеров использовались из литературных данных (Abbas *et al.*, 2022; Datir and Regan, 2022; Lopez-Pardo *et al.*, 2013; Slugina *et al.*, 2020), а также разрабатывались с помощью PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>).

2.5. Подбор сайтов-мишеней и дизайн направляющих РНК

Сайты-мишени для РНК-направленной нуклеазы Cas9 подбирались при помощи программ DeskGen (Hough *et al.*, 2017) и WuCRISPR (Wong *et al.*, 2015). Проверку вторичной структуры нРНК проводили с помощью программы RNAfold (Gruber *et al.*, 2008). Сайты-мишени подбирались с учетом предсказанной активности соответствующих им нРНК, среди которых выбирались наиболее активные, имеющие правильную предсказанную вторичную структуру (желательно, сохранение трех стеблепетлевых структур для связи с нуклеазой Cas9 и свободного конца для связи с молекулой ДНК), а также максимально специфичные по отношению к целевому гену. Для подбора сайтов-мишеней использовалась референсная последовательность гена *Pain-1* PGSC0003DMG400013856. В выбранном для модификации сорте проводилась амплификация участков гена, содержащих сайты-мишени. Использовались пары праймеров Pain1_ex1_F и Pain1_ex1_R, Pain1_ex3_F и Pain1_ex3_R (Приложение 1). Продукт реакции очищался с помощью набора CleanMag DNA (Евроген, Россия). Концентрация полученных образцов оценивалась на приборе Qubit 3.0 набором DNA HS (Invitrogen, США). Концентрацию образцов доводили до 10 нг/мкл в 10 мкл и передавали в центр коллективного пользования «Геномных исследований» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия) для проведения высокопроизводительного секвенирования (NGS) на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США). Получение NGS-библиотеки проводилось с помощью набора KAPA Hyper Prep (Roche, США) согласно методике производителя, для баркодирования был использован набор баркодов KAPA Dual-Indexed Adapter Kit. Концентрация полученных библиотек измерялась с помощью прибора Qubit 3.0 набором DNA HS, расчёт молярности производился после коррекции по данным биоанализатора BA2100 (Agilent Technologies,

США). Секвенирование библиотек выполнено на приборе Illumina MiSeq набором Illumina MiSeq Nano парными чтениями 2x220 п.н., финальное разведение библиотеки составляло 8 пМоль. Для того, чтобы оценить соотношения аллелей, полученные нуклеотидные последовательности в формате fastq.gz обрабатывались с помощью алгоритма collapse (<https://usegalaxy.org/>) и выравнивались на референсную последовательность. Выравнивания визуализировались программой UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Анализ потенциальных нецелевых сайтов осуществлялся с помощью программы CRISPOR 5.2 (Concordet and Haeussler, 2018) используя референсный геном SolTub_3.0 (NCBI GCF_000226075.1).

2.6. Получение векторов для нокаута целевого гена

Для получения векторов была использована модульная векторная система CasCADE (Hoffie, 2023), разработанная и любезно предоставленная группой доктора Йохена Кумлена (IPK, Gatersleben, Германия). Описание использованных векторов приведено в таблице 1, схематическое изображение на рисунке 4. Структуры использованных в работе олигонуклеотидов приведены в приложении 1.

Таблица 1. Плазмидные генетические векторы, использованные в работе.

Название вектора	Описание вектора	Ссылка/источник
pIK75, pIK76, pIK77	Векторы, в состав которых входит ген каркаса направляющей РНК под контролем промотора <i>U6-26 A. thaliana</i> . Различаются липкими концами, получаемыми при обработке нуклеазой <i>BsmBI</i>	Модульная векторная система CasCADE (группа доктора Йохена Кумлена, IPK, Gatersleben, Германия)
pIK61	Вектор-сборка, в него встраивается три кассеты с промотором и нРНК. Содержит ген <i>ccdB</i> , который вырезается, если клонирование произведено правильно, что облегчает селекцию положительных клонов восприимчивого к токсину штамма <i>Escherichia coli</i> DH10 β .	
pBR20	Вектор содержит ген нуклеазы Cas9 с оптимизированным для растений кодоновым составом под контролем промотора убиквитина <i>Petroselinum crispum</i> .	
pIK48	Служит финальным вектором для сборки в одну плазмиду нРНК, гена нуклеазы Cas9 и, если необходимо, гена репортера или других элементов. Содержит сайты рестрикции <i>SfiI</i> для клонирования финальной кассеты в бинарный вектор. Содержит ген <i>ccdB</i> , который вырезается, если клонирование произведено правильно, что облегчает селекцию положительных клонов восприимчивого к токсину штамма <i>Escherichia coli</i> DH10 β .	
pIK23	Является дополнительным вектором, необходимым для клонирования кассет с нРНК и Cas9 в один вектор.	
pNB2	Вектор, несущий репортерный ген mCherry под контролем двукратно усиленного промотора <i>Cauliflower mosaic virus CaMV 35S</i> .	
pbi	Бинарный вектор для стабильной агробактериальной трансформации с геном устойчивости к гигромицину.	

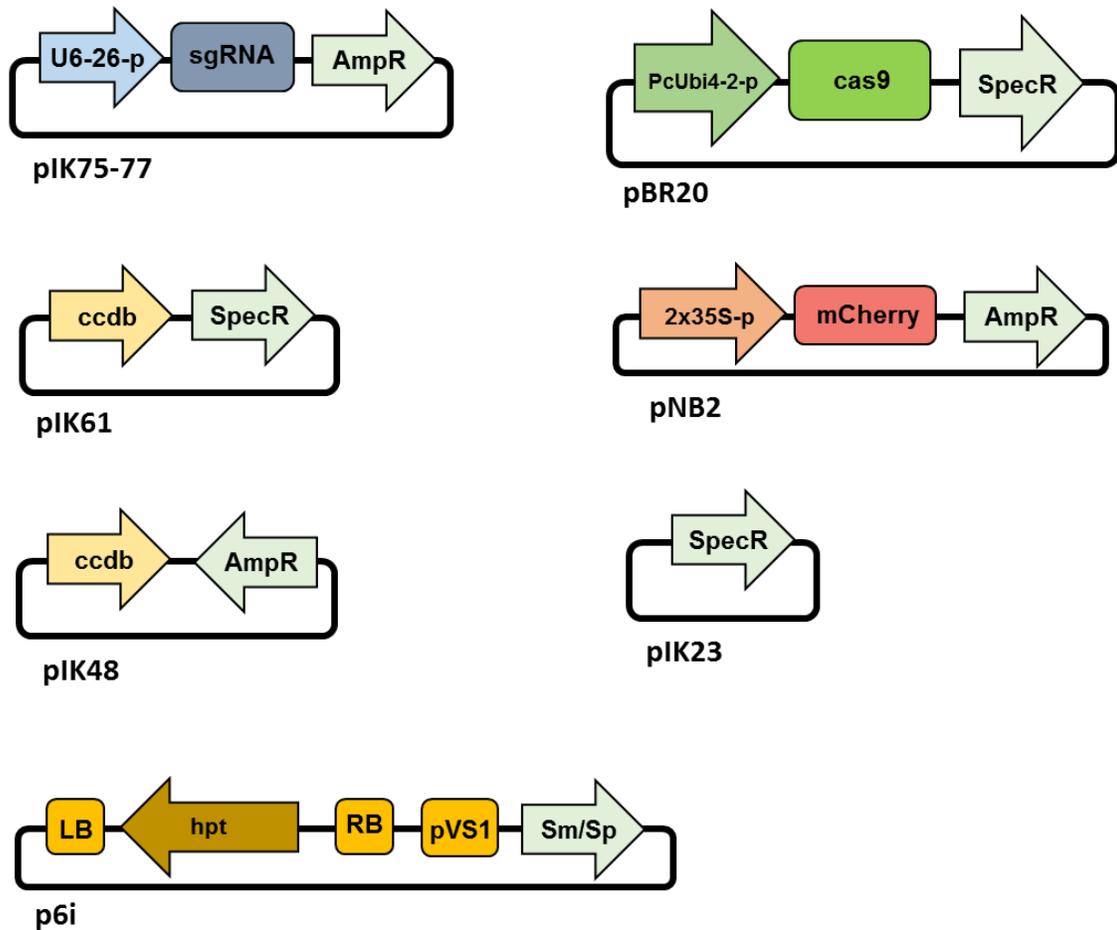


Рисунок 4. Схема векторов, использованных в работе.

sgRNA – каркас направляющей РНК, cas9 – ген, кодирующий нуклеазу Cas9 с оптимизированным для *A. thaliana* кодоновым составом, U6-26p – промотор *A. thaliana* U6-26, PcUbi-2-p - промотор убиквитина *Petroselinum crispum*, AmpR – ген устойчивости к ампициллину, P2x35S - двукратно усиленный промотор *Cauliflower mosaic virus CaMV 35S*, mCherry – ген красного флуоресцентного белка, hpt – ген устойчивости к гигромицину, Sm/Sp – ген устойчивости к спектиномицину/стрептомицину, pVS1 – ориджин репликации для *Agrobacterium tumefaciens*, LB и RB – последовательности, ограничивающие T-DNA, SpecR – ген устойчивости к спектиномицину, ccdB - ген, кодирующий токсичный ccdB белок.

Получение векторов для нокаута гена *Pain-1* включало в себя следующие этапы: встройка сайт-специфических последовательностей нРНК в отдельные модульные векторы; сборка модульного вектора с нРНК; сборка модульного вектора с несколькими нРНК и геном, кодирующим нуклеазу Cas9; создание конструкции для трансформации протопластов (содержащей нРНК, гены, кодирующие Cas9 и mCherry); создание конструкции для агробактериальной трансформации (Рисунок 14). Также проводилось создание модульного вектора с репортером mCherry для системы CasCADE (Рисунок 11).

Для создания модульных векторов с сайт-специфическими последовательностями нРНК плазмиды pIK75, pIK76, pIK77 обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *BstV2I* (NEB, США). Фрагмент нужной длины очищался из агарозного геля набором GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Для получения двуцепочечного фрагмента сайт-специфической последовательности нРНК производили реакцию гибридизации пары соответствующих F и R олигонуклеотидов (Приложение 1) с помощью программы, включающей этапы денатурации (95°C, 5мин) и отжига (95-85°C - 2°C/сек, 85-25°C – 0,1°C/сек). Далее реакционную смесь, состоящую из 50 нг очищенного фрагмента вектора (pIK75/pIK76/pIK77), 10 пмоль гибридизованных олигонуклеотидов, 5 мкл 2х быстрого лигазного буфера, 0,5 мкл Quick лигазы (NEB, США), H₂O до итогового объёма 10 мкл, инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Полученной лигазной смесью трансформировали хемокомпетентные клетки *E. coli* XL1blue стандартным способом (Мазин, 1990). Трансформированные бактерии выращивали в чашках Петри на агаризованной среде LB (Carl Roth, Германия) с добавлением антибиотика ампициллина 100 мкг/мл в течение 12 ч при t=37°C. Далее полученные колонии переносили в жидкую среду LB (с ампициллином 100

мкг/мл) и выращивали ночную культуру в качалке при $t=37^{\circ}\text{C}$. Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры осуществляли набором GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Для подтверждения встройки смесь из плазмиды и праймера отправлялась для секвенирования по Сэнгеру в компанию ACG (Германия).

Для получения модульных векторов с несколькими нРНК на основе рIK61, с несколькими нРНК и *cas9* на основе рIK48, а также для создания конструкции для трансформации протопластов на основе рIK48 проводилась реакция «Golden Gate». Реакционная смесь содержала 75 нг каждого модульного вектора, 15 нг вектора-основы; 1,0 мкл *Esp3I* (*BsmBI*) (рIK61) или 1,0 мкл *BsaI* (при использовании рIK48); 1,0 мкл T4 DNA ligase; 2,0 мкл 10x Cut Smart buffer; 1,0 мкл АТФ (10 мМ); H_2O до итогового объема 20 мкл. Реакцию проводили с помощью следующей программы: 10 циклов: 37°C – 5мин, 22°C – 10мин, потом 37°C – 30мин, 75°C – 15мин. Полученной смесью производилась трансформация *E.coli* штамма DH10 β с использованием Bio-Rad Gene Pulser II (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Трансформированные бактерии выращивали в чашках Петри на агаризованной среде LB с добавлением спектиномицина (в случае рестрикции *BsmBI*) или ампициллина (в случае *BsaI*) 100 мкг/мл в течение 12 ч при $t=37^{\circ}\text{C}$. Получение ночной культуры и выделение плазмидной ДНК осуществлялось методами, описанными выше. Для проверки наличия встройки в плазмиду нужных нам фрагментов осуществляли рестрикционный анализ полученных клонов и секвенирование по Сэнгеру.

Плазмиды с репортером mCherry были получены с использованием метода «Gibson assembly» (Gibson et al., 2009). Были получены две молекулы ДНК с подходящими друг к другу перекрывающимися последовательностями. Первая была получена ПЦР-реакцией с плазмиды рNB2 с праймерами AE11,

AE12, вторая – с плазмиды pIK23 с праймерами SH223, SH224 (последовательности праймеров указаны в приложении 1). Фрагменты длиной 2131 п.н. и 2235 п.н. соответственно были очищены из агарозного геля, используя GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, США). Сборка фрагментов была произведена с NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, США), согласно инструкции производителя. Полученной реакционной смесью были трансформированы хемокомпетентные клетки *E. coli* XL1blue, трансформированные бактерии выращивались в чашках Петри на агаризованной среде LB с добавлением спектиномицина 100 мкг/мл. Правильность сборки получившихся плазмид была подтверждена с помощью рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру.

Для получения конструкций для агробактериальной трансформации вектор со встройкой кассеты, содержащей нРНК и ген cas9, а также вектор рb1, (обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Sfi*I (Thermo Scientific, США). Фрагменты нужной длины очищались из агарозного геля набором GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Далее реакционную смесь, состоящую из 50 нг очищенного фрагмента вектора рb1, 150 нг очищенного фрагмента вектора со встройкой, 5 мкл 2х быстрого лигазного буфера, 0,5 мкл Quick лигазы (NEB, США), H₂O до итогового объема 10 мкл инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Лигазной смесью трансформировали хемокомпетентные клетки *E. coli* XL1blue стандартным способом. Трансформированные бактерии выращивались на агаризованной среде LB с добавлением спектиномицина 100 мкг/мл. Правильность сборки получившихся плазмид была подтверждена с помощью рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру.

2.7. Выделение и трансформация протопластов картофеля

На основе протоколов (Nicolia *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) был разработан авторский протокол трансформации протопластов картофеля (Егорова *et al.*, 2020), включающий в себя этапы выделения протопластов, собственно трансформации и проверки эффективности проведенной трансформации:

1. *Подготовка материала.* Использовались пробирочные растения возрастом 3-4 недели. Листья суммарной массой 1 грамм нарезали на полоски длиной 1-2 мм острыми ножницами в чашку Петри на стерильную фильтровальную бумагу, смоченную промывочным раствором (2 мМ MES, 0,154 М натрий хлористый, 125 мМ кальций хлористый, 5мМ калий хлористый, рН 5,6).

2. *Плазмолиз.* Кусочки листьев переносили пинцетом в чашку Петри с 20 мл плазмолитического раствора (0,5М D-сорбитол), накрывали фольгой, инкубировали 30 минут при комнатной температуре.

3. *Ферментативная деградация клеточных стенок.* Плазмолитический раствор удаляли пипеткой, кусочки растений пинцетом переносили в коническую колбу с 20 мл среды С (20 мМ MES, 0,6 М маннитол, 10мМ калий хлористый, 10мМ кальций хлористый, 0,1 % бычий сывороточный альбумин, 1,5 % целлюлаза, 0,75 % мацерозим, рН 5,6), оборачивали фольгой для защиты от света и инкубировали ночь при 25 °С со слабым покачиванием на скорости 20 об/мин.

4. *Выделение протопластов из тканей.* На следующий день утром скорость качания увеличивали до 40 об/мин для того, чтобы протопласты вышли из тканей в раствор.

5. Отмывка протопластов.

Клеточный фильтр (Eppendorf, Германия) с порой 40 мкм устанавливали на полипропиленовую пробирку объемом 50 мл и через фильтр выливали содержимое колбы. В колбу по стенке серологической пипеткой заливали промывочный раствор, аккуратно промывали содержимое, выливали раствор через фильтр в тот же фалькон. Центрифугировали на 50 g (на минимальном ускорении и минимальной остановке ротора) в течение 5 минут. Супернатант отбирали весь сначала серологической пипеткой, потом автоматической пипеткой с плавным ходом обрезанным носиком (дальнейшие все процедуры выполняли обрезанным носиком). Заливали осадок по стенке 1-2 мл трансформационного буфера (0,5 М маннитол, 15 мМ магний хлористый шестиводный, 0,1 % MES, pH 5.6) в зависимости от количества выделившихся протопластов. Аккуратно ресуспендировали клетки, переносили в стеклянные пробирки с круглым дном. Оставляли на час на льду, протопласты оседали на дно. Отбирали супернатант, добавляли 0,5-1 мл трансформационного буфера, в зависимости от количества выделившихся клеток, аккуратно ресуспендировали. Небольшое количество протопластов использовали для оценки количества протопластов и качества их выделения, используя гемоцитометр (камеру Горяева). Добавляя необходимый объем трансформационного буфера, доводили концентрацию протопластов до 500 тысяч клеток в 1 мл.

6. Трансформация. В 2 мл пробирке готовили раствор 10 мкг плазмидной ДНК в 20 мкл воды. Добавляли 200 мкл суспензии клеток (100 тысяч клеток), аккуратно перемешивали с ДНК. Далее добавляли по стенке равный объем раствора PEG (40 % PEG6000, 0,4 М маннитол, 0,015 М магний хлористых шестиводный), осторожно смешивали. Инкубировали 30 минут в темном месте при комнатной температуре. Добавляли 1,5 мл промывочного раствора и центрифугировали 3-5 минут на настольной центрифуге при минимальной

скорости (около 100 g). Осторожно удаляли супернатант и ресуспендировали протопласты в 2 мл промывочного раствора. Переносили суспензию в лунку культурального 6-ти луночного планшета и инкубировали в темноте при комнатной температуре (20 °C) 48-72 часа.

6. *Оценка эффективности трансформации.* Оценивали процент трансформированных клеток при помощи флюоресцентного микроскопа (EVOS M5000). Производили подсчет всех живых клеток в поле зрения на светлом поле, и числа клеток, экспрессирующих красный флуоресцентный белок mCherry в этом же поле зрения, с использованием красного канала. Соотношение числа клеток, экспрессирующих mCherry, к общему числу клеток является показателем эффективности трансформации. Соответственно вычислялся процент трансформированных клеток.

2.8. Оценка активности конструкции с нРНК и нуклеазой Cas9 в протопластах картофеля

Из трансформированных протопластов выделялась ДНК (Wang *et al.*, 2016), далее проводили амплификацию участков целевых генов, содержащих сайты-мишени. Для амплификации использовались пары праймеров Pain1_ex1_F и Pain1_ex1_R, Pain1_ex3_F и Pain1_ex3_R (Приложение 1). Нуклеотидные последовательности полученных ампликонов определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования на приборе Illumina MiSeq (США) в ЦКП геномных исследований (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) методом, описанным выше.

Полученные нуклеотидные последовательности в формате fastq.gz выравнивались на референсную последовательность с помощью алгоритма

bowtie2 (<https://usegalaxy.org/>). Полученные bam файлы визуализировались программой UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Количество последовательностей, содержащих мутацию в районе сайта-мишени, оценивалось с помощью алгоритма Small_Indell_Analyzer (https://github.com/vikhall/Small_Indell_Analyzer), который подсчитывал число мутантных последовательностей ко всем последовательностям с хорошим выравниванием (Hernandes-Lopes *et al.*, 2023). Итоговая эффективность мутагенеза высчитывалась в результате деления процента мутантных последовательностей на процент трансформированных клеток.

2.9. Агробактериальная трансформация картофеля

Хемокомпетентные клетки *A. tumefaciens* штамма AGL1 трансформировали методом теплового шока (Hofgen and Willmitzer, 1988). За день до трансформации ставили ночную культуру агробактерии в 5 мл YEP (1 г/л триптона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л NaCl).

Трансформацию картофеля проводили по протоколу Колачевской (2015) с изменениями. Использовались пробирочные растения возрастом 3-4 недели. Листья картофеля отрезали, надсекали перпендикулярно жилкам адаксиальную сторону, переносили по 15-20 листьев в чашку с жидкой MS (4.4 г/л MS, 20 г/л сахарозы, pH 5.8). Добавляли 400 мкл ночной культуры агробактерии, 15 минут помешивали чашку вручную. Инкубировали при комнатной температуре 48 часов в темноте. Далее экспланты переносили надрезами вниз на твердую среду CIM (Callus induction medium, состав 4.4 г/л MS, 16 г/л глюкозы, 5 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП, 250 мг/л цефотаксима, 5 мг/л гигромицина), инкубировали 3 дня при 27°C. Далее экспланты переносили на среду SIM (Shoot induction medium,

состав 4.4 г/л MS, 16 г/л глюкозы, 1 мг/л БАП; 0,1 мг/л GA, 250 мг/л цефотаксима, 5 мг/л гигромицина). Инкубировали при 22 °С, каждые 10 дней пересаживали на свежую среду до появления побегов. Подросшие побеги пересаживали на среду MS с агаром.

2.10. Анализ генотипа генетически отредактированных растений

Для анализа наличия мутаций в гене вакуолярной инвертазы из части растения-регенеранта выделяли ДНК (DNeasy® Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия), проводили амплификацию участков гена, содержащих сайты-мишени. Для амплификации также использовались пары праймеров Pain1_ex1_F и Pain1_ex1_R, Pain1_ex3_F и Pain1_ex3_R (Приложение 1). Продукт реакции очищался с помощью набора CleanMag DNA (Евроген, Россия). Концентрация полученных образцов оценивалась на приборе Qubit4 (Invitrogen, США) набором DNA BR (Invitrogen, США). Предварительно образцы были секвенированы по Сэнгеру, а в дальнейшем на приборе Illumina MiSeq методом, описанным выше. Соотношения аллелей и прочтений с различными мутациями обрабатывались с помощью алгоритма collapse (<https://usegalaxy.org/>). Предсказания аминокислотной последовательности проводились программой ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Для выявления протяженных делеций дополнительно проводилась амплификация парами праймеров Pain1_bdF1 и Pain1_ex3_R, Pain1_ex1F5 и Pain1_ex1R6.

Скрининг на встройку участка генетической конструкции проводился с помощью количественной ПЦР, использовали праймеры с Taqman пробками (Приложение 1), синтезированные компанией Биолабмикс (Новосибирск,

Россия), оценивалось наличие гена *hpt*, кодирующего гигромицин фосфотрансферазу.

2.11. Анализ фенотипа генетически отредактированных растений

Полученные растения культивировали в условиях *in vitro* путем черенкования, тем самым из каждого растения мы создали генетически отредактированную линию. Для анализа фенотипа, по четыре клона каждой линии и контроля (нетрансгенные растения сорта Симфония, прошедшие через регенерацию по описанной выше методике агробактериальной трансформации) были высажены на аэропонных установках (Колошина *et al.*, 2018).

Также, по три клона каждой линии и контроля были высажены в закрытом грунте в приближенных к полевым условиям. Растения выращивали в парнике, накрытом полупрозрачной тканью, в течение полевого сезона 2022 года. Использовали ведра объемом 12 литров, грунт “Terra Vitta” (nevatorf.ru) с вермикулитом. Полученные клубни (данное поколение обозначено как клубневое поколение V_1) использовали для оценки фенотипа, а также были высажены в полевом сезоне 2023 для получения клубневого поколения V_2 .

Для морфологической оценки использовались растения, полученные в полевом сезоне 2022. Оценивали следующие параметры – рост растения, средняя длина листа (высчитывалась исходя из среднего по трем листам с верхней, средней и нижней части растения), длина корней (высчитывалась исходя из длины самого длинного корня), количество и вес клубней. Также оценивали массу клубней у растений, полученных на аэропонных установках.

Клубни просушивали на открытом воздухе в течение 3 дней при температуре 23 °С, затем упаковывали в бумажные пакеты и хранили в холодильной камере (Pozis, линия Paracels) 90 дней при температуре 4 °С. Анализ содержания сахаров проводили на клубнях поколения V₁ методом, описанным выше.

Анализ пригодности клубней к переработке проводили на клубнях поколения V₂. Их также просушивали и хранили 90 дней при температуре 4 °С. По три клубня с каждой линии (1 клубень с растения) очищались, нарезались на пластины толщиной 1 мм на терке-шинковке и жарились в растительном масле при температуре 190 °С в течение 80 секунд. Окраску чипсов анализировали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/>), которая оценивала среднюю интенсивность пикселей каждой пластины от 0 до 255, где 0 означает самый темный (черный) цвет и 255 обозначает самый яркий (белый) цвет (Ly *et al.*, 2023).

Процентное содержание крахмала в клубнях определяли в контрольной и двух генетически отредактированных линиях после хранения при 4 °С в течении 100 дней. Определение проводили с использованием набора K-TSTA (Megazyme, Ирландия) согласно инструкции производителя.

2.12. Получение и анализ гибридов картофеля

Для скрещивания с генетически отредактированными линиями было решено использовать сорт Гала, так как он успешно гибридизуется с различными сортами (личное сообщение от Юлии Александровны Гуревой, СибНИИРС ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Он также является сортом, подверженным холодовому осахариванию и непригодным к переработке на

картофель фри и хрустящий картофель. Гибридизацию картофеля проводили вручную по методическим рекомендациям ВНИИКХ (1967). Растения выращивались в парнике, накрытом полупрозрачной тканью, в течение полевого сезона 2023 года. Использовались ведра объемом 20 литров, грунт “Terra Vitta” (nevatorf.ru) с вермикулитом. Генетически отредактированные растения использовались в качестве материнских, а растения сорта Гала – в качестве отцовских. За два дня до раскрытия цветков с отцовских растений с помощью препаровальных игл была собрана в стерильные бюксы пыльца. Гибридизацию проводили на закрытых бутонах, без кастрации. Пыльцу наносили на художественные кисти и окунали в нее пестики. Ягоды собирались через 45 дней после гибридизации и хранились 6 месяцев при температуре 16 °С, после чего из них извлекались семена, просушивались и помещались на хранение. Весной 2024 года часть семян посадили в контейнеры, а потом отдельные растения высаживались в горшки объемом 1 литр. Через три месяца у каждого растения были собраны клубни.

Для подтверждения наличия направленных мутаций в гене *Pain-1*, кодирующем вакуолярную инвертазу, и для отбора нетрансгенных растений из гибридов выделяли ДНК и проводили анализ методами, описанными выше.

2.13. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился в R (версия 4.3.2), а также с использованием ресурса <https://astatsa.com>. Статистическую обработку результатов анализов накопления сахаров и экспрессии генов в сортах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием критерия попарных сравнений Тьюки.

Статистическую обработку результатов анализов морфологии, накопления сахаров и пригодности клубней к переработке в генетически отредактированных линиях проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием критерия Даннетта, который оценивал достоверность различий между контрольной и экспериментальной группами. Коэффициент корреляции Пирсона использовался для оценки связи между количеством нокаутных аллелей и содержанием редуцирующих сахаров. Результаты считались статистически значимыми при значениях $p \leq 0.05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Выбор сорта для нокаута гена вакуолярной инвертазы

Были исследованы три сорта - Невский, Никулинский, Симфония. Данные сорта были выбраны, так как они довольно популярны в России, имеют хорошие вкусовые качества, высокую урожайность, устойчивы ко многим заболеваниям и неблагоприятным факторам внешней среды (<http://reestr.gosort.com>). Также было показано, что сорта Никулинский, Невский, Симфония обладают способностью к регенерации *in vitro* (Ibragimova *et al.*, 2021). В выбранных сортах было подтверждено накопление редуцирующих сахаров. Результаты нашего исследования показали, что в клубнях картофеля всех исследуемых сортов при хранении на низких температурах (4 °C) происходит накопление редуцирующего сахара глюкозы (Рисунок 5). Так как именно редуцирующие сахара вносят негативный вклад в товарные характеристики клубней, то все три сорта можно считать восприимчивыми к холодovому осахариванию (Shumbe *et al.*, 2020).

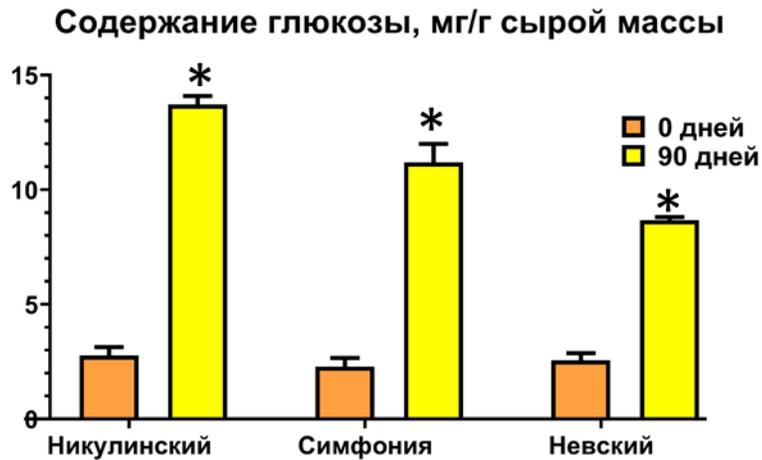


Рисунок 5. Содержание глюкозы в клубнях сортов картофеля до и после хранения 90 дней при 4 °С. Каждый столбец отражает среднее значение, вычисленное по трем биологическим повторам и ошибку среднего. Значимые различия с нулевой точкой отображены звездочками (ANOVA; *, $p < 0.05$).

Также данные три сорта были проанализированы на присутствие в последовательности гена *Pain-1* ранее описанных однонуклеотидных замен, ассоциированных с повышенной устойчивостью к холодovому осахариванию. Было показано, что три совместные замены в кодирующей последовательности гена (нуклеотида Т на С в позиции 552, G на А в позиции 718 и С на А в позиции 1544) связаны с светлой окраской чипсов (Draffehn *et al.*, 2010). На геномной последовательности гена данные замены располагаются в позициях 2043, 2209, 3339 соответственно. Но у всех трех исследуемых нами сортов во всех аллелях в этих позициях наблюдались аллели Т, G, С, что подтверждает их уязвимость к холодovому осахариванию (Рисунок 6).

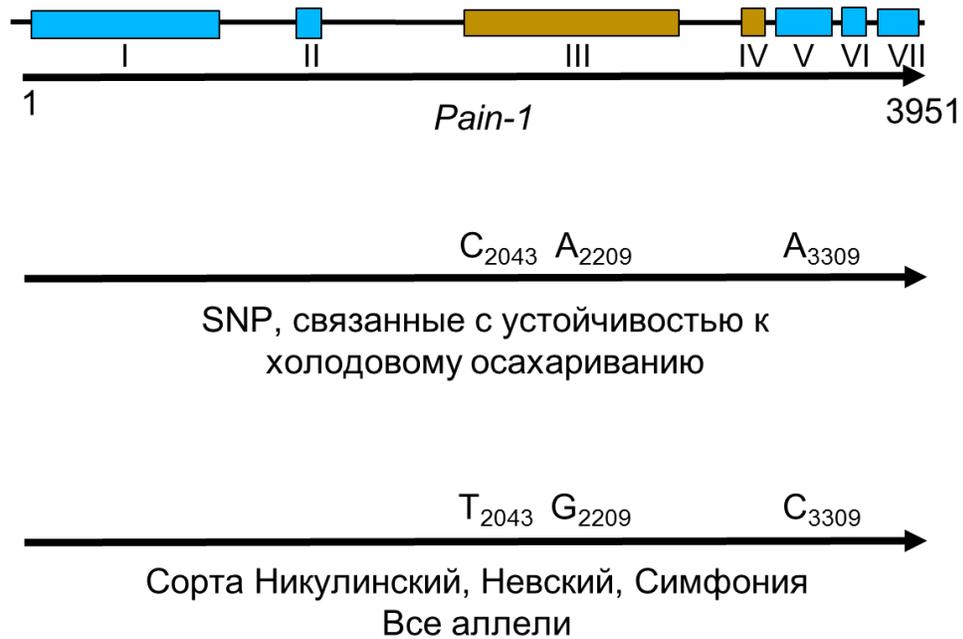


Рисунок 6. Структура гена *Pain-1* с отмеченными SNP, связанными с устойчивостью к холодovому осахариванию согласно литературным данным. Отмечены нуклеотиды у изучаемых сортов в указанных позициях.

Несмотря на значительную роль вакуолярной инвертазы в процессе холодovого осахаривания, она не является единственным геном, участвующим в накоплении сахаров (Datir and Regan, 2022; Slugina *et al.*, 2020). По-видимому, вклад различных генов в этот процесс является генотип-зависимым. Поэтому мы решили провести анализ экспрессии генов вакуолярной инвертазы (*Pain-1*) и ее ингибитора (*Inh2*) в клубнях сортов с целью выявления сорта, в котором инвертаза вносит наибольший вклад в накопление редуцирующих сахаров. Для анализа экспрессии генов были выбраны временные точки 15 и 90 дней, которые отражают процессы, происходящие в клубнях на ранних и поздних этапах холодovого стресса. Было выявлено, что экспрессия гена *Pain-1* под воздействием низких температур увеличилась по сравнению с контролем (0

дней) через 15 дней и затем снизилась через 90 дней у сорта Симфония, а экспрессия гена *Inh2* демонстрировала сходный паттерн у сортов Никулинский и Невский (рисунок 7).

Различия паттерна экспрессии этих генов в разных сортах могут свидетельствовать о генотип-зависимой регуляции холодового осахаривания. Полученные нами данные не позволяют однозначно утверждать, что вакуолярная инвертаза является ключевым ферментом и основным лимитирующим фактором холодового осахаривания, как предполагалось ранее (Liu *et al.*, 2021), так как значимое повышение экспрессии гена *Pain-1* в начале срока хранения было статистически значимым только у сорта Симфония. У двух же других сортов, включая Никулинский, который характеризуется самым высоким уровнем накопления сахаров, не наблюдалось значимого повышения экспрессии *Pain-1* (Рисунок 7а). Кроме того, у сортов Никулинский и Невский, наоборот, наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии ингибитора инвертазы *Inh2*, который демонстрировал низкий уровень экспрессии в клубнях сорта Симфония (Рисунок 7б). Следовательно, можно предположить, что активность гена *Pain-1* в клубнях этих сортов снижена за счет ее ингибирования продуктом гена *Inh2*, и инвертаза не вносит существенного вклада в осахаривание. Скорее всего, в сортах Невский и Никулинский большой вклад вносят другие гены углеводного метаболизма, например, было показано, что щелочные/нейтральные инвертазы гидролизуют сахарозу в цитоплазме в ответ на воздействие низких температур (Datir and Regan, 2022), экспрессия амилаз и их ингибиторов коррелирует с накоплением редуцирующих сахаров в клубнях (Слугина and Кочиева, 2018).

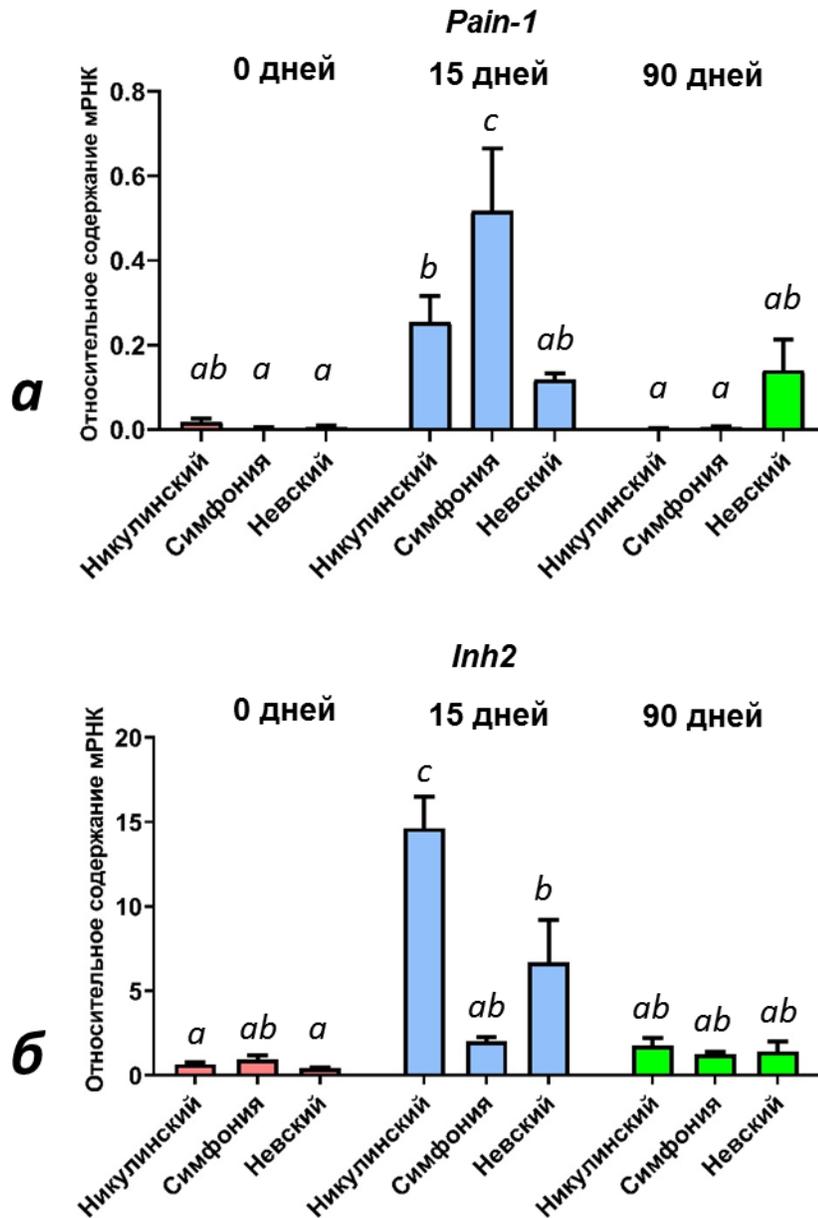


Рисунок 7. Относительный уровень экспрессии генов *Pain-1* (а), *Inh2* (б) в контрольной точке в момент закладки на хранение и при хранении в течение 15 и 90 дней при 4 °С в клубнях сортов Невский, Симфония и Никулинский. Приведены средние значения, вычисленные по трем биологическим повторам, и ошибка среднего. Значимые различия с нулевой точкой отображены разными буквами (ANOVA; *, $p < 0.05$).

В отличие от этих сортов, у сорта Симфония на фоне сниженной экспрессии гена *Inh2* наблюдалась повышенная экспрессия гена *Pain-1*, на основании чего можно предположить, что продукт гена *Inh2* не оказывает значительного влияния на активность вакуолярной инвертазы у данного сорта, которая таким образом может вносить основной вклад в холодовое осахаривание. На основании этих данных для нокаута вакуолярной инвертазы в качестве генотипа-донора был выбран сорт Симфония.

3.3. Создание генетических конструкций для нокаута гена *Pain-1*

Геномное редактирование уже продемонстрировало большой потенциал в улучшении признаков растений, однако его применение в сельскохозяйственных культурах связано с преодолением различных трудностей, например, полиплоидности и гетерозиготности, что также актуально для культурного картофеля. Для успешного применения геномного редактирования необходимо иметь полную информацию об аллельных последовательностях интересующего участка гена, выбирать нРНК с наибольшей эффективностью, а также желательно использовать мультиплексные конструкции, чтобы увеличить вероятность мутагенеза (Carlsen *et al.*, 2022).

При создании конструкций для нокаута генов была использована модульная векторная система CasCADE (Таблица 1). Данная система использует Golden Gate клонирование, которое основано на применении эндонуклеаз рестрикции типа IIS. Эти ферменты распознают специфические последовательности ДНК, но расщепляют молекулу ДНК на фиксированном расстоянии от сайта узнавания. Это свойство позволяет использовать

рестрикцию и лигирование нескольких фрагментов в одной реакции, что значительно упрощает клонирование. CasCADE содержит около 50 модульных векторов, совместимых с Golden Gate. Среди них – модули для экспрессии нРНК, различные варианты эндонуклеаз и дополнительные элементы, такие как репортерные гены. Это позволяет удобно собирать из различных элементов подходящие для конкретной задачи векторы. Система уже была успешно применена для редактирования генов у таких растений, как кукуруза, ячмень, пшеница, арабидопсис и рыжик, но еще не применялась на картофеле (Hoffie, 2023). Использование CasCADE позволило нам создать мультиплексные конструкции, несущие три разные нРНК, направленные на разные участки гена вакуолярной инвертазы, что повысило вероятность успешной модификации гена. Также данная система позволила нам комбинировать различные элементы при сборке, поэтому мы смогли сначала добавить к кассете с нРНК и Cas9 репортерный ген, чтобы создать вектор для тестирования эффективности конструкции на протопластах картофеля, а потом клонировать эту кассету в бинарный вектор и использовать для агробактериальной трансформации. Новый модульный вектор для системы CasCADE, содержащий ген красного флуоресцентного белка mCherry, был создан автором специально для данной работы.

Подбор сайтов-мишеней

Для того чтобы увеличить эффективность мутагенеза, было решено использовать три нРНК в одной конструкции. Были подобраны три сайта-мишени на последовательности гена *Pain-1*, два из них (№ 1 и № 2) расположены в начале первого экзона и один (№ 3) – в третьем (Рисунок 8). Структура сайтов-мишеней и нРНК, а также предсказанные активность и

вторичная структура представлены в Таблице 2 и на Рисунке 9. Была проанализирована аллельная структура участков гена в сорте Симфония, содержащих сайты-мишени. Для этого было использовано высокопроизводительное секвенирование. Были обнаружены три аллеля (обозначены как A1, A2, A3), которые отличались однонуклеотидными заменами (Рисунок 10а), влияющими на аминокислотную последовательность (Рисунок 10). Соотношение количества прочтений при секвенировании для каждого варианта соответствовало 2 : 1 : 1 (A1, 330 прочтений; A2, 150 прочтений; A3, 176 прочтений для первого экзона и A1, 198 прочтений; A2, 117 прочтений; A3, 99 прочтений для третьего экзона), что свидетельствует о том, что в сорте Симфония есть два аллеля A1, и по одному аллелю A2 и A3. Сайты-мишени № 2 и № 3 имели идентичную последовательность во всех трех аллелях, но сайт-мишень № 1 имел два SNP в A3 (Рисунок 10). Так как два участка гена были амплифицированы независимо, то аллель A2 в первом экзоне необязательно соответствует аллелю A2 во втором экзоне (аналогично с аллелем A3).

Были проанализированы потенциальные мишени для подобранных нРНК. Показано, что выбранные нРНК не имеют нецелевых сайтов с одним или двумя отличающимися нуклеотидами, и имеют несколько с тремя или более отличающимися нуклеотидами (Приложение 2). Так как показано, что в основном мутируются нецелевые сайты с одним или двумя отличающимися нуклеотидами (Hahn and Nekrasov, 2019), а три отличающихся нуклеотида снижают вероятность мутации последовательности до 3 % (Modrzejewski *et al.*, 2020), было решено, что выбранные нРНК будут обладать достаточной специфичностью для минимизации мутирования нецелевых сайтов.

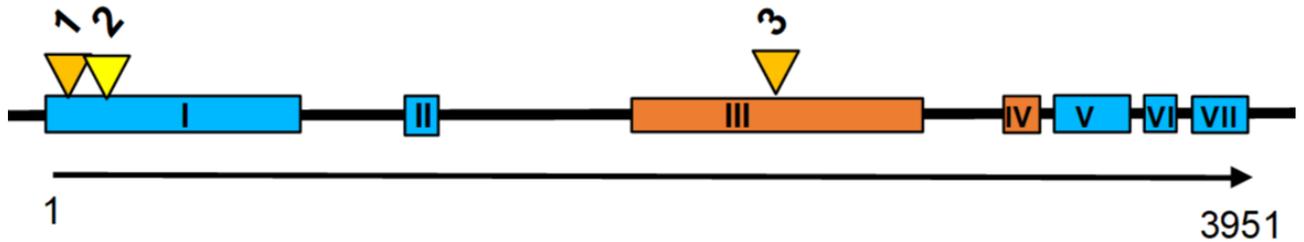


Рисунок 8. Расположение сайтов-мишеней на последовательности гена *Pain-1*. Синими прямоугольниками отмечены экзоны. Оранжевым цветом обозначены участки гена, кодирующие гликозилгидролазный домен. Желтыми треугольниками указаны сайты-мишени.

Таблица 2. Структура и предсказанная активность направляющих РНК для гена *Pain-1*.

нРНК	Позиция	Структура целевого сайта (подчеркнут PAM)	Структура нРНК	Предсказанная активность WuCRISPR	Предсказанная активность Deskgen
1	5-27, exon1	ataactggaatggtactgg gtgg	ataactggaatggta ctggg	80	73
2	44-66, exon1	cgggaggaatgtgtaatgg gagg	gggaggaatgtgta atggg	85	68
3	2194-2216, exon3	tccttgacaccaatgccgg gtgg	atccttgacaccaat gccggg	85	72

Получение модульного вектора с геном-репортером *mCherry*

Для того чтобы использовать в модульной системе красный репортерный белок, был получен новый модульный вектор (pAE68), содержащий ген репортер *mCherry*, сайты рестрикции *BsaI* и ген устойчивости к спектиномицину. Для получения использовался метод «Gibson assembly» (Gibson *et al.*, 2009), правильность полученного вектора была проверена с помощью рестрикционного анализа (Рисунок 12) и секвенирования по Сэнгеру с праймерами AE14,15, SH10,150,42,43.

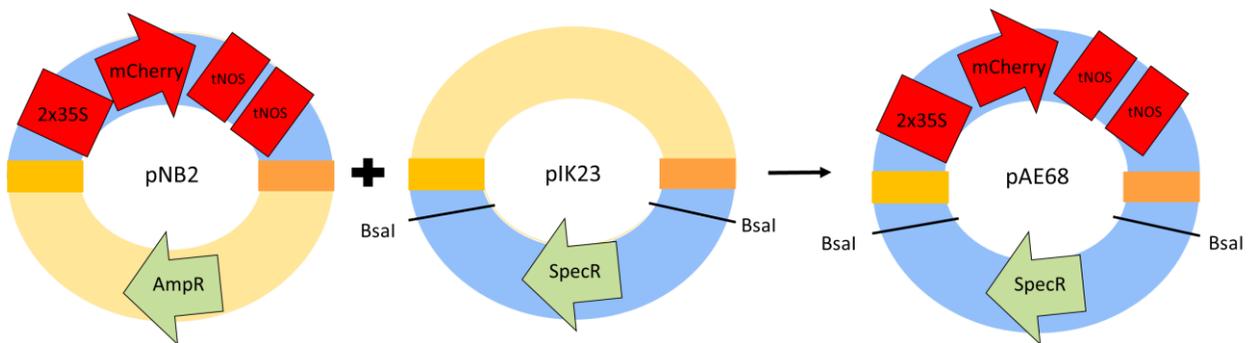


Рисунок 11. Схема получения модуля с геном-репортером *mCherry*. *mCherry* – ген красного флуоресцентного белка, *AmpR* – ген устойчивости к ампициллину, P2x35S - двукратно усиленный промотор *Cauliflower mosaic virus CaMV 35S*, *SpecR* – ген устойчивости к спектиномицину, tNOS – последовательность терминатора нопалин синтазы *Agrobacterium tumefaciens*, черными засечками обозначены сайты рестрикции *BsaI*, желтым и оранжевым перекрывающиеся концы.

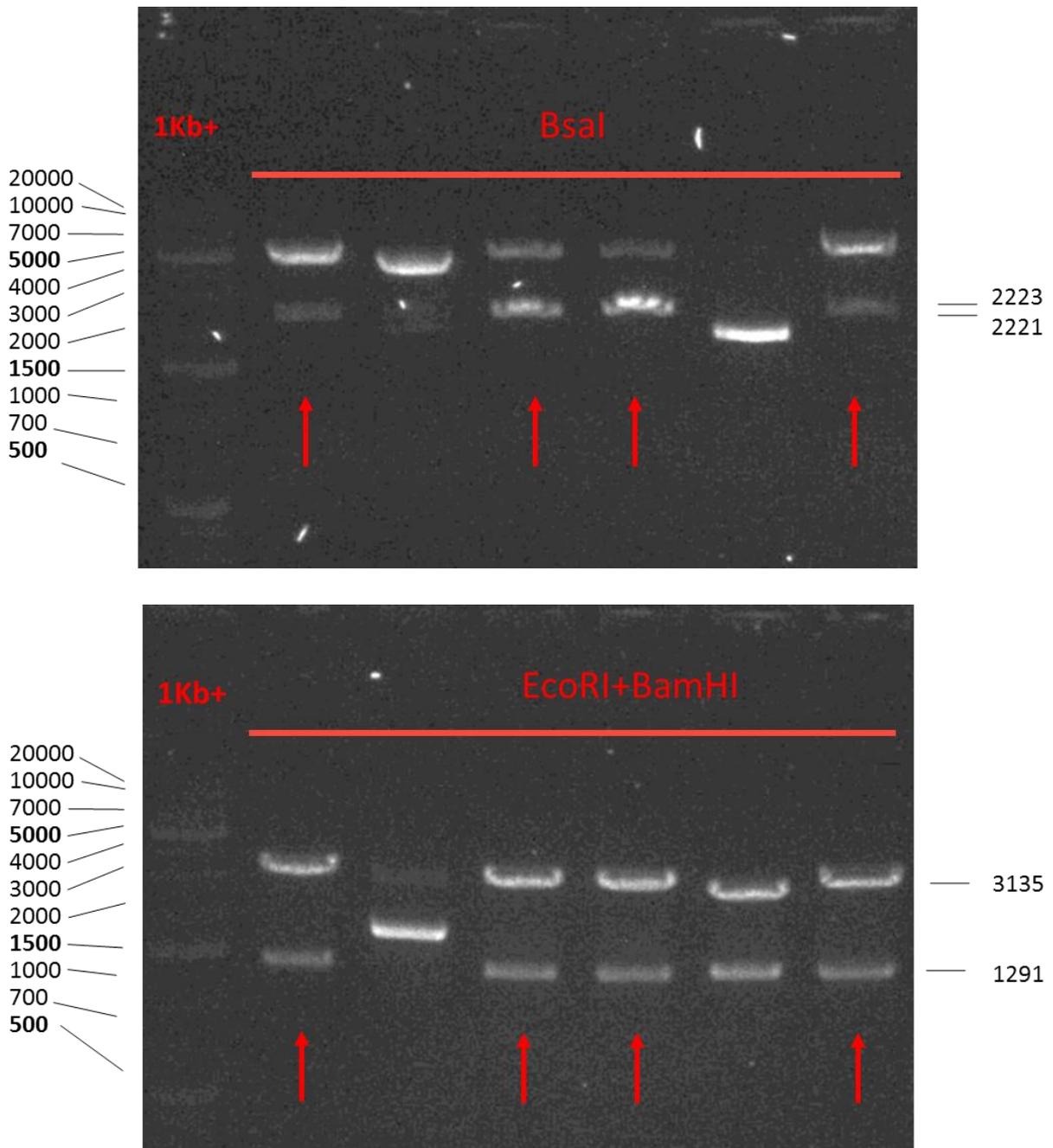


Рисунок 12. Рестрикционный анализ конструкции pAE68. Ожидаемые фрагменты при рестрикции *BsaI* – 2223+2221 (фрагменты выше ожидаемой длины свидетельствуют о неполном гидролизе). Ожидаемые фрагменты при рестрикции *EcoRI* +*BamHI* – 3135+1291+18. Стрелками указаны положительные клоны. Использовался 1 Kb+ маркер от ThermoFisher.

*Создание конструкций, содержащих ген нуклеазы Cas9 и три нРНК, для нокаута гена *Pain-1**

Сначала были получены модульные векторы (pAE61, pAE62, pAE63), несущие химерные нРНК rain1-2, rain1-3, rain1-1. Встройка олигонуклеотидов была подтверждена секвенированием с праймера IK71 (Рисунок 13).

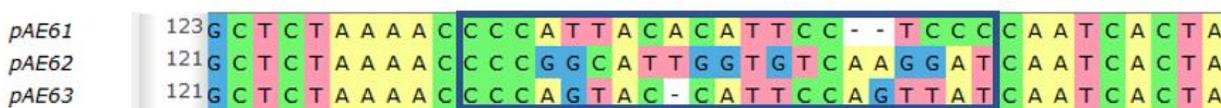


Рисунок 13. Результат секвенирования конструкций со встройкой в pIK75, 76, 77 векторы (получились плазмиды pAE61, 62, 63, сиквенсы в обратном-комплементарном направлении). Рамкой выделены сайт-специфичные части нРНК.

Далее был получен вектор, несущий одновременно три данных нРНК под контролем промотора *U6* (pAE69). Правильность полученных конструкций была подтверждена рестрикционным анализом (Рисунок 14) и секвенированием с использованием праймеров IK70,71 (последовательности праймеров указаны в приложении 1). Потом была получена конструкция, содержащая нРНК, ген нуклеазы Cas9 и ген-репортер *mCherry* (pAE70). Правильность полученной конструкции была подтверждена рестрикционным анализом (Рисунок 14) и секвенированием с праймерами IK70,71, AE14,15. Данная конструкция была использована для трансформации протопластов. Также была получена аналогичная конструкция без гена-репортера (pAE71), из которой кассета с нРНК и Cas9 была переклонирована в бинарный вектор pBI для агробактериальной трансформации, в результате была сконструирована плазида pAE73. Правильность полученной конструкции была подтверждена рестрикционным анализом (Рисунок 14) и секвенированием с праймерами IK70,71. Схема получения конструкций представлена на Рисунке 15.

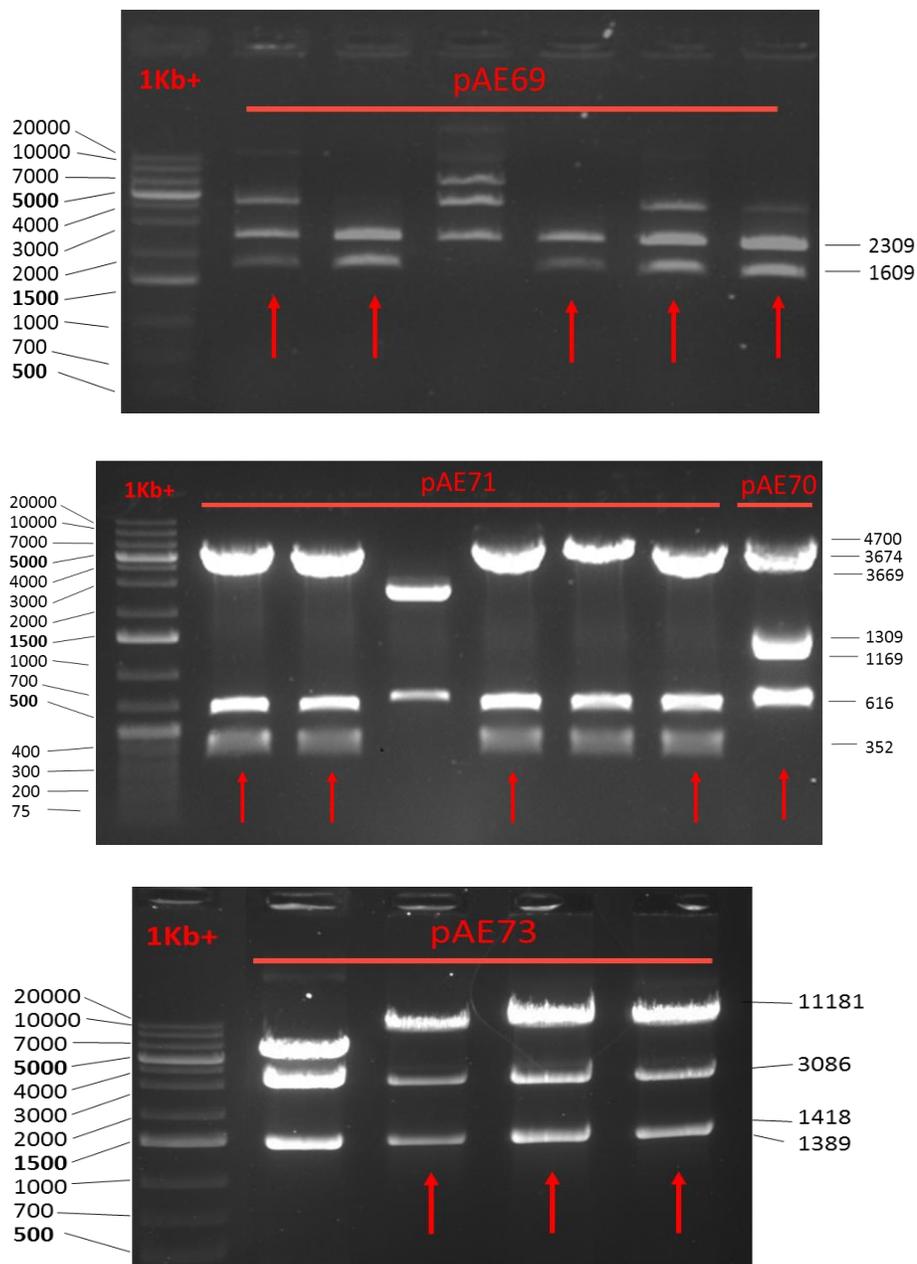


Рисунок 14. Рестрикционный анализ конструкций pAE69-73. Ожидаемые фрагменты при рестрикции pAE69 с *BsaI* – 2309+1609 (фрагменты выше ожидаемой длины свидетельствуют о неполном гидролизе). При рестрикции pAE70 с *MunI* +*BamHI* – 4700+3669+1309+1169+616. При рестрикции pAE71 с *MunI* +*BamHI* – 4700+3674+616+352. При рестрикции pAE73 с *AgeI*+*EcoRI* – 11181+3086+1418+1389+308+35. Использовался 1 Kb+ маркер от ThermoFisher. Стрелками указаны положительные клоны.

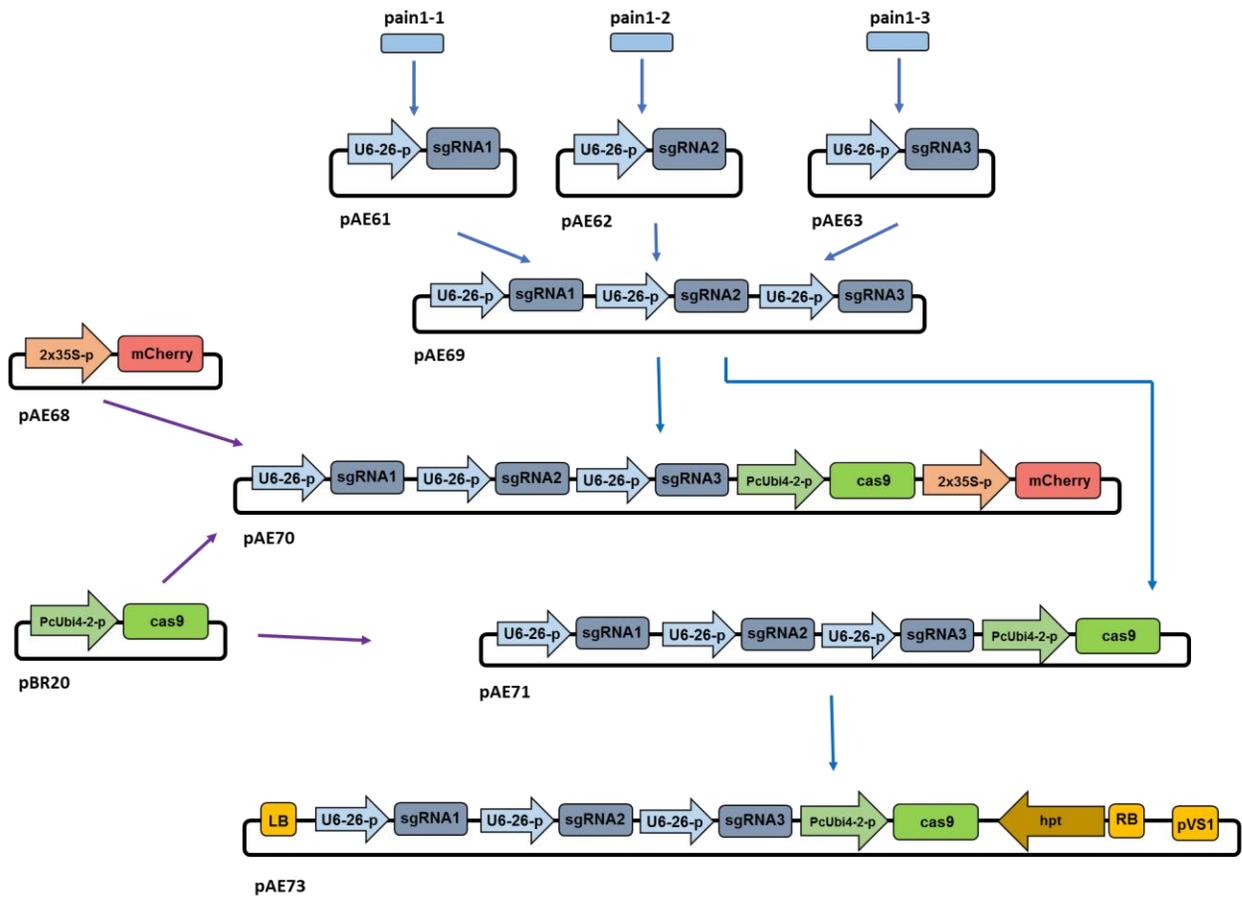


Рисунок 15. Схема получения конструкций, содержащих ген нуклеазы Cas9 и нРНК для модификации гена *Pain-1*. Конструкция pAE70 использовалась для трансформации протопластов. Конструкция pAE73 – для агробактериальной трансформации. sgRNA – химерная направляющая РНК, cas9 – ген нуклеазы Cas9 с оптимизированным для *A. thaliana* кодоновым составом, U6-26p – промотор U6-26 *A. thaliana*, mCherry – ген красного флуоресцентного белка, hpt – ген устойчивости к гигромицину, pVS1 – ориджин репликации для *Agrobacterium tumefaciens*, LB и RB – последовательности, ограничивающие T-DNA.

3.4. Анализ эффективности конструкций на протопластах

Предварительное тестирование конструкций для редактирования генома на протопластах позволяет оценить *in vivo* их эффективность, что является довольно важным этапом, из-за несовершенства программ, предсказывающих эффективность нРНК *in silico* (Bennett *et al.*, 2020), а также когда в эксперименте применяются новые генетические конструкции и генотипы, эффективность которых в отношении направленного мутагенеза остается неизученной. Эксперимент на протопластах позволяет оценить не только эффективность конструкций, но и спектр возможных мутаций. В данной работе впервые был проведен успешный эксперимент по направленной модификации генов в протопластах *S. tuberosum* сорта Симфония. Был разработан авторский протокол (Егорова *et al.*, 2020) на основе протоколов (Nicolia *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) для модельных сортов растений. Для повышения выхода протопластов и оптимизации расхода реактивов был изменен состав среды для деградации клеточных стенок, а также увеличены время инкубации и скорость качания в процессе инкубации в данной среде. Для повышения эффективности трансформации, время инкубации в трансформационном буфере было увеличено до 1 часа.

Конструкция pAE70, содержащая ген-репортер *mCherry*, была использована для тестирования эффективности мутагенеза на протопластах (Рисунок 16). Были проанализированы 4 независимые трансформации протопластов, также имелся один контрольный нетрансформированный образец. Средняя эффективность трансформации составила 65 %, а максимальная – 74 % (Таблица 3).

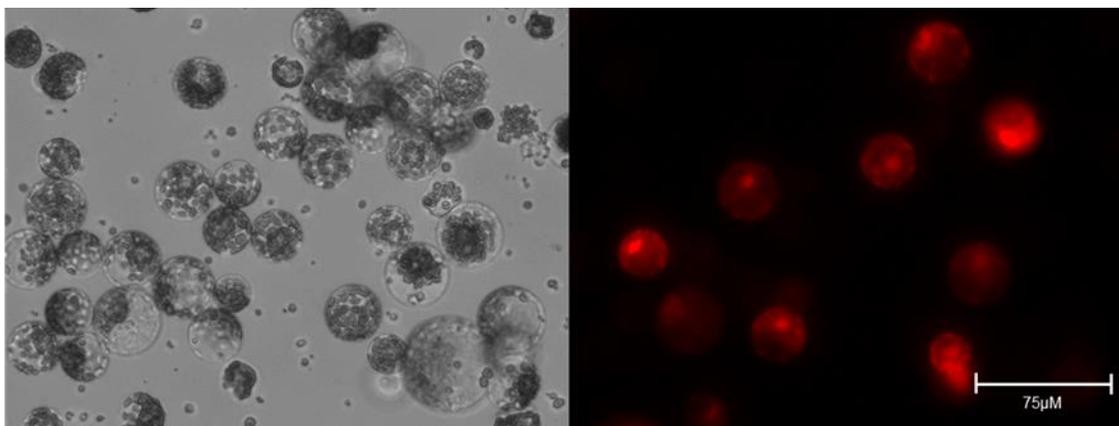


Рисунок 16. Визуализация препарата протопластов *S. tuberosum* при помощи системы EVOS M5000 через двое суток после трансформации. Справа: поле зрения с использованием красного канала, слева: светлое поле (brightfield).

Таблица 3. Результаты оценки активности конструкции рАЕ70 на протопластах.

Повторность	Эффективность трансформации, %	Итоговая эффективность мутагенеза, %		
		A1	A2	A3
1	65	41	43	25
2	62	85	85	31
3	57	74	70	23
4	74	88	84	22
среднее	65	72	71	25

Было обнаружено высокое разнообразие типов мутаций в сайтах-мишенях № 1 и 2 (Рисунок 17). Однако анализ секвенирования ампликонов, содержащих сайт-мишень № 3, не выявил мутаций.

Так как в сорте Симфония ген *Pain-1* представлен в трех аллельных вариантах, было решено проанализировать эффективность нРНК в каждом из них по-отдельности. Итоговая эффективность мутагенеза в среднем составила 72 % в вариантах А1 и А2; 25 % в варианте А3 (Таблица 3). Сниженная эффективность в аллеле А3 скорее всего связана с тем, что в нем нРНК № 1 имеет два SNP, поэтому она не вносила мутации в А3, что также свидетельствует о специфичности мутагенеза. Также, можно отметить, что в аллелях А1 и А2 наблюдались по большей части делеции между сайтами, а в А3 только мутации в сайте мишени № 2 (Рисунок 17). Это может быть связано с синергическим эффектом нРНК – делеции между сайтами-мишенями гораздо более распространены, чем индивидуальные мутации, полученные после разрезания единичного сайта-мишени (Šermák *et al.*, 2017). Из-за того, что нРНК № 1 и № 2 действовали в основном синергично, индивидуальную активность можно оценить только у нРНК № 2 в А3 – она составила 25 %, но, так как совместно они имели эффективность 72 %, можно сделать вывод, что нРНК № 1 тоже имеет высокую мутагенную активность.

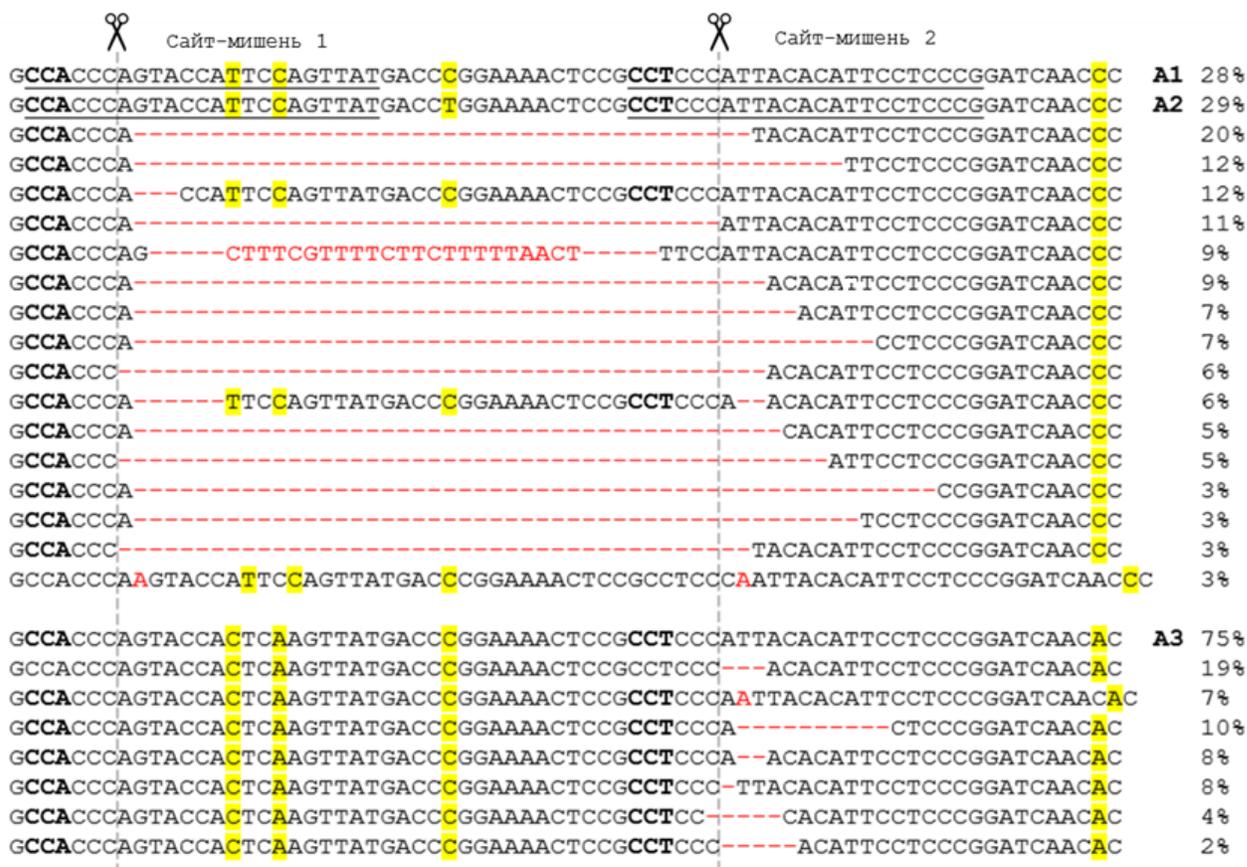


Рисунок 17. Обобщенная иллюстрация различных мутаций, найденных при анализе трансформированных протопластов в последовательности первого экзона гена *Pain-1*. В третьем экзоне мутации не были обнаружены. A1, A2, A3 – аллели. Желтым выделены SNP, жирным шрифтом выделены PAM, сайты-мишени подчеркнуты, пунктирной линией обозначен сайт разрезания Cas9. Указаны доли прочтений, содержащих различные мутации. Для подсчета разные биологические повторности были объединены.

Интересно, что нРНК № 3 совсем не обладала мутагенной активностью, несмотря на хорошую предсказанную активность (Таблица 2). Возможно, это связано с доступностью участков гена, так как третий сайт-мишень находится в третьем экзоне, а первые два, в которых наблюдалась хорошая мутагенная

активность – в первом экзоне. Открытый хроматин чаще находится на 5' конце генов (Li *et al.*, 2007). В исследовании (Carlsen *et al.*, 2022) было обнаружено, что эффективность редактирования выше на 5' конце гена GWD1, по сравнению с 3' концом гена. С другой стороны, (Ly *et al.*, 2023) показали успешное редактирование третьего экзона гена *Pain-1*, так что, скорее всего, низкая эффективность в нашем случае связана со слабой активностью самой нРНК и недостаточным развитием алгоритмов, предсказывающих эффективность нРНК.

Наши результаты подтверждают необходимость использования мультиплексных конструкций и их предварительного тестирования – из трех отобранных нРНК для нокаута гена *Pain-1* только одна была довольно эффективной, и вносила мутации во все аллели, другая не мутировала один из вариантов, а третья же имела нулевую эффективность.

3.5. Получение растений картофеля с нокаутом по гену *Pain-1*

В настоящее время во всем мире наблюдается тенденция к получению генетически отредактированных, но не трансгенных растений. Агробактериальная трансформация широко используется как эффективный метод для создания генетически отредактированных растений картофеля, однако она сопряжена с риском нежелательной интеграции трансгена в геном. Поскольку полученные линии планировалось использовать в селекционной работе, было принято решение, что устранение трансгена возможно на последующих этапах путем гибридизации.

Агробактериальная трансформация

Был оптимизирован протокол агробактериальной трансформации (Колачевская, 2015) для сорта Симфония: уменьшено время инкубации на каллусообразующей среде с 5 до 3 дней и увеличена концентрация селективного агента (гигромицина) до 5 мг/л. Проведена трансформация данного сорта конструкцией pAE73 (Рисунок 18). В двух экспериментах по трансформации было получено 40 растений-регенерантов, из них 12 (30 % от всех растений) были трансгенными, а 11 содержали мутации в сайтах-мишенях (25 % от всех растений) (Рисунок 19а, Таблица 4).

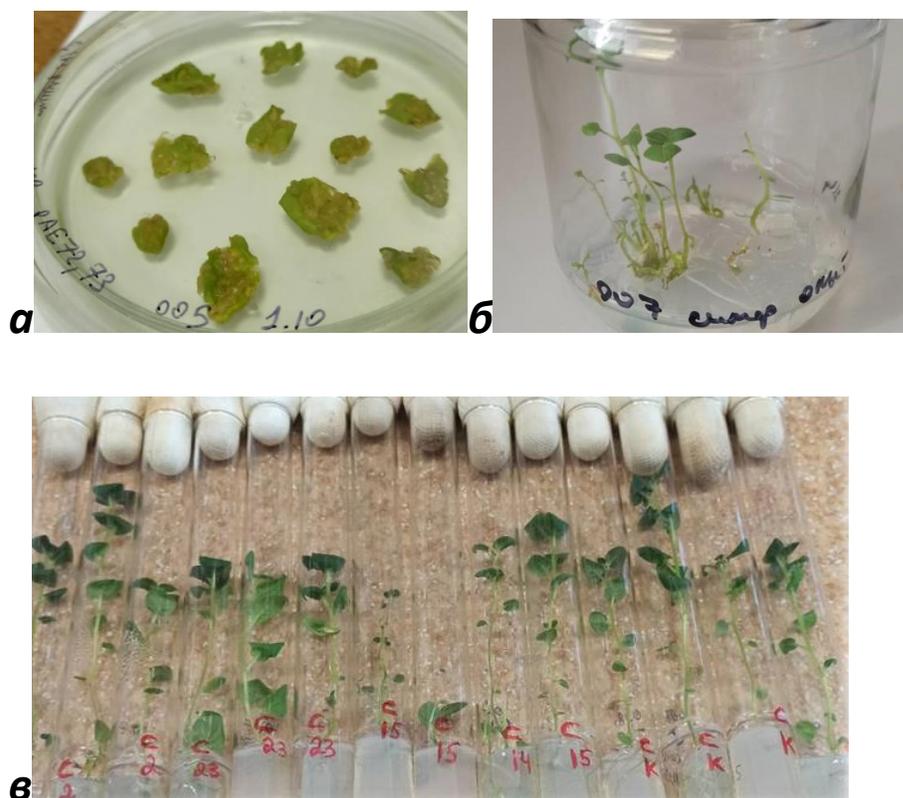


Рисунок 18. Этапы получения мутатных растений роста Симфония с использованием агробактериальной трансформации – развитие каллусов на листовых эксплантах (а), появление растений-регенерантов (б), пробирочные растения (в).

Таким образом, в данной работе впервые был проведен успешный эксперимент по трансформации и направленной модификации генов *S.tuberosum* сорта Симфония с помощью агробактериальной трансформации. Каждое генетически отредактированное растение было клонировано путем черенкования и дало начало соответствующим генетически отредактированным линиям.

Эффективность мутагенеза была весьма высокой – 8 из 12 трансгенных растений содержали мутации в сайтах-мишенях (67 %), большинство полученных растений-регенерантов имело мутации во всех четырех копиях гена, также были получены протяженные делеции.

Сначала мы использовали секвенирование по Сэнгеру для того, чтобы определить растения, содержащие мутации, а потом метод глубокого секвенирования ампликонов с помощью NGS для того, чтобы получить точную информацию о количестве и нуклеотидной последовательности аллелей, а также точную информацию о мутациях в протопластах и растениях-регенерантах. Благодаря своей информативности NGS секвенирование ампликонов в данный момент является одним из самых популярных и предпочтительных методов для анализа растений после геномного редактирования (Bennett *et al.*, 2020). Однако у NGS секвенирования ампликонов с помощью Illumina есть свои ограничения, которые связаны с размером анализируемых ампликонов – обычно, он не превышает 500 нуклеотидов, что определяет максимальный размер делеций и инсерций, которые могут быть детектированы.

В нашем случае мы использовали NGS секвенирование и смогли различить аллели, а также генотипировать конкретные мутации в разных аллелях, но столкнулись с ограничениями метода. Размеры ампликонов для

секвенирования с использованием изначально подобранных пар праймеров (Pain1_ex1_F и Pain1_ex1_R, Pain1_ex3_F и Pain1_ex3_R) составляли около 300 нуклеотидов. Как уже было показано ранее, в сорте Симфония ген *Pain-1* представлен двумя копиями аллеля A1 и по одной копии аллелей A2, A3. Мы ожидали, что после мутагенеза соотношение аллелей будет 1:1:1:1 или останется 2:1:1 (в случае, если в обе копии аллеля A1 будет внесена одинаковая мутация, или они останутся немутантными), но в некоторых линиях мы наблюдали другие соотношения аллелей - 1 : 1 : 1 (7-23, 8-6, 8-10), 2:1 (7-18) или даже 1:1 (7-2). Также мы обнаружили, что в этих линиях в принципе не наблюдается последовательностей некоторых аллелей (Таблица 4), то есть можно предположить, что в этих аллелях произошли какие-то мутации, которые затрагивали сайты отжига праймеров. Мы подтвердили свое предположение, когда использовали другие праймеры и обнаружили протяженные делеции в линиях 7-2, 7-23, 8-10, затрагивающие сайты отжига стандартных праймеров (Рисунок 20). Мы не смогли детектировать конкретные мутации в отсутствующих аллелях в линиях 7-18 и 8-6, однако обнаружение протяжённых делеций в других линиях позволяет предположить аналогичный механизм мутаций. В Таблице 4 данные мутации обозначены как «отсутствие прочтения аллеля».

Чтобы выяснить, отличаются ли результаты редактирования геномов протопластов и растений, был проведен сравнительный анализ мутагенной активности использованных нРНК в протопластах и растениях. Было выявлено, что в обоих экспериментах нРНК № 1 и № 2 имели высокую активность, и эффективность больше, чем нРНК № 3. Также, нРНК № 1 в обоих случаях показала свою специфичность. Однако спектр мутаций, полученных на протопластах и в растениях, различался – в протопластах мутации в первом и

втором сайтах-мишенях наблюдались со сходной частотой, также преобладали делеции между сайтами. В растениях же преобладали небольшие делеции внутри второго сайта, также мутации в третьем сайте и протяженные делеции были замечены только в растениях (Рисунок 196). Однако скорее всего протяженные делеции не были замечены нами в протопластах из-за ограничений метода секвенирования.

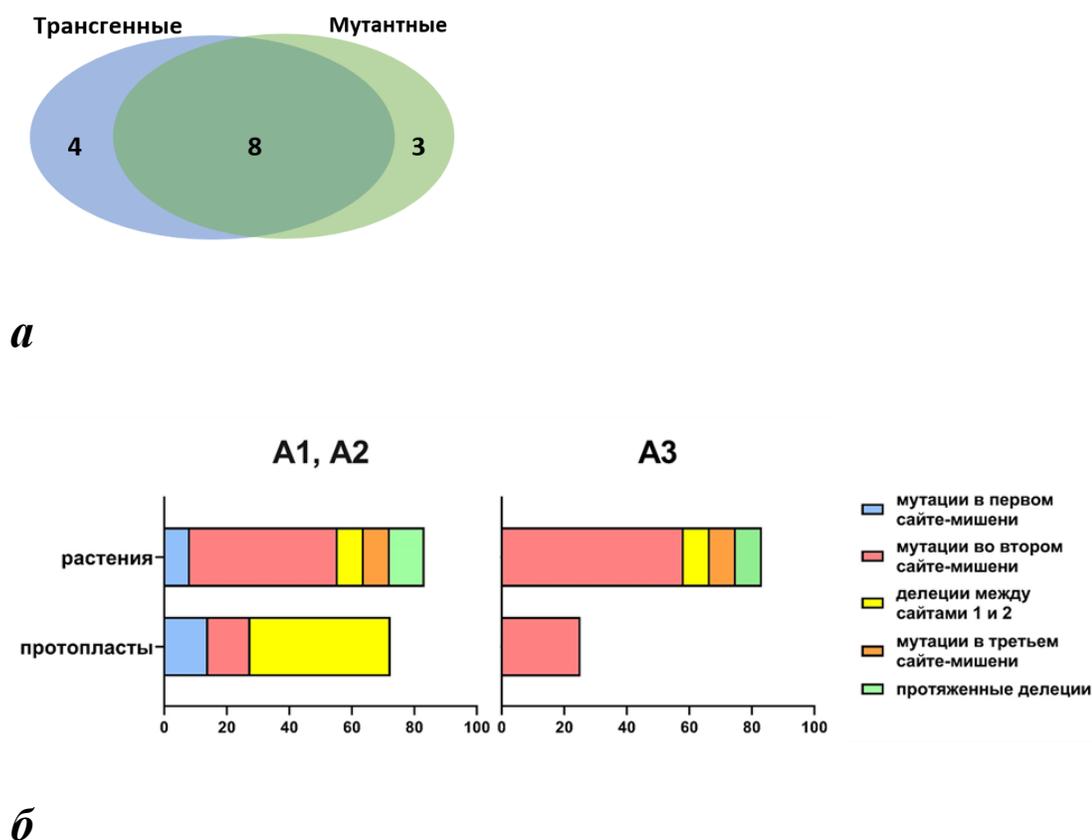
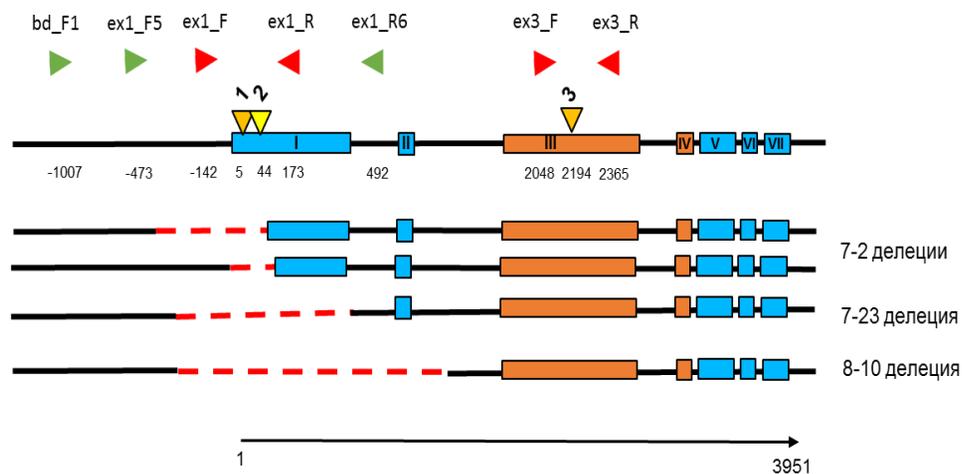
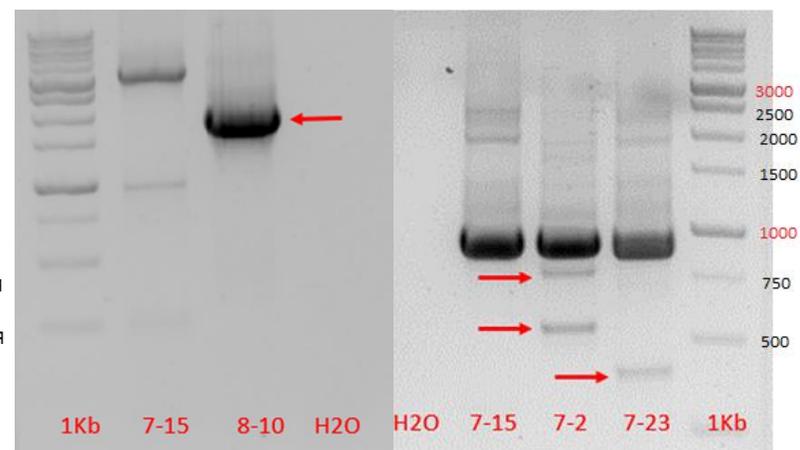


Рисунок 19. Генотипирование полученных растений. (а) Количество полученных мутантных и трансгенных растений. Большинство мутантных растений содержало встройку трансгена, но также мы обнаружили нетрансгенные растения. (б) Процентное соотношение различных типов мутаций в протопластах и растениях. Рассчитано отдельно для аллелей А1, А2 и А3. Для каждого аллеля, количество его копий с определенным типом мутации во всех трансгенных растениях было рассчитано относительно всех его копий во всех трансгенных растениях. В протопластах это соотношение высчитывалось из количества всех прочтений, относящихся к этому аллелю и содержащих определенный тип мутации относительно всех прочтений, относящихся к этому аллелю, нормализованных на эффективность трансформации.



а

Рисунок 20. Генотипирование протяженных делеций в генетически отредактированных растениях. (а) Схематичное изображение гена *Pain-1* и протяженных делеций. Синими прямоугольниками отмечены экзоны. Оранжевым выделена область гена, кодирующая гликозилгидролазный домен. Желтыми треугольниками указаны сайты-мишени. Пары праймеров обозначены стрелками. Делеции обозначены красным пунктиром. (б) Электрофорез ПЦР-фрагментов, полученных при амплификации с парами праймеров *Pain1_bd_F1* и *Pain1_ex3_R* (слева), *Pain1_ex1_F5* и *Pain1_ex1_R6* (справа). Стрелками обозначены фрагменты, соответствующие протяженным делециям. Использован 1Кб маркер от Евроген.



б

В наших работах и работах наших коллег на ячмене уже было показано, что мутагенная активность и спектр возможных мутаций у нРНК совпадает при трансформации ими протопластов и растений (Gerasimova *et al.*, 2019; Hoffie *et al.*, 2021). Например, анализ активности двух нРНК, нацеленных на ген *MYC2*, проведенный на протопластах, показал, что первая нРНК обладает меньшей эффективностью по сравнению со второй. При этом первая направляющая преимущественно индуцирует делецию одного конкретного нуклеотида, тогда как вторая приводит к образованию широкого спектра различных делеций. Исследование мутаций в растениях, полученных методом агробактериальной трансформации с использованием этих нРНК, выявило полное соответствие спектра мутаций с тем, который был зафиксирован на уровне протопластов (Egorova *et al.*, 2024). Однако в данных работах была проведена оценка только одиночных нРНК, и не использовались мультиплексные конструкции с различными нРНК, одновременно направленными на целевой ген. Поэтому полученный нами результат, что спектры мутаций могут различаться на протопластах и растениях является уникальным и требует дальнейшего исследования.

В отличие от протопластов, в генетически отредактированных растениях наблюдались мутации в сайте-мишени № 3. В линии 7-2 наблюдались мутации в трех аллелях (Таблица 4), а также линии 7-23 и 8-8 были химеры и имели небольшой процент мутаций в сайте-мишени № 3. Это также подтверждает то, что эффективность редактирования повышается при стабильной трансформации, так как увеличивается время экспрессии трансгена.

Также, как и в протопластах, в растениях не было обнаружено мутаций в первом сайте-мишени в аллеле А3, что подтверждает специфичность работы конструкции. Так как не было обнаружено мутаций в сайте-мишени с двумя

отличающимися нуклеотидами, было решено, что в данном эксперименте наша система для геномного редактирования обладает высокой специфичностью и нет необходимости проверять нецелевые сайты, в которых было предсказано больше чем два отличающихся нуклеотида (Приложение 2).

Среди мутантных генетически отредактированных растений было получено три нетрансгенных растения (Таблица 5). Это можно объяснить тем, что при агробактериальной трансформации может происходить транзientная экспрессия трансгена (в данном случае – nРНК и Cas9) без встройки (Bánfalvi *et al.*, 2020), что позволяет использовать агробактериальную трансформацию для получения нетрансгенных растений. Два из полученных нетрансгенных мутантов содержали небольшие мутации только в одной копии гена (линии 8-4, 8-9, Таблица 4), что согласуется с данными Bánfalvi и соавторов (2020), в работе которых нетрансгенные растения имели небольшие делеции, и эффективность мутагенеза была ниже чем у трансгенных растений, у которых наблюдалось больше мутаций, и чаще встречались протяженные делеции.

Полученные клубни первого вегетативного поколения от линий 7-2, 7-15, 7-16, 7-23 были пророщены (получено второе вегетативное поколение) и произведено повторное генотипирование мутаций в первом экзоне гена вакуолярной инвертазы. Было выявлено, что мутации соответствуют наблюдаемым в первом поколении.

Была проведена *in silico* трансляция мутантных мРНК, выявлено, что согласно структуре мутантных аллелей, более чем в половине случаев мутации должны приводить к синтезу укороченных и нефункциональных белков вакуолярной инвертазы, в которых отсутствует гликозилгидролазный домен, что соответствует полному нокауту гена (Таблица 4, 5).

Таблица 4. Типы мутаций, наблюдаемые в растениях-регенерантах. A1, A2, A3 – аллели. В колонке «Генотип» представлены нуклеотидные последовательности различных аллелей в генетически отредактированных растениях. РАМ выделены серым, SNP - желтым. Пунктирной линией обозначены сайты разрезания Cas9. Представлена предполагаемая аминокислотная последовательность, транслирующаяся с мутантных аллелей. Красным выделены аминокислоты, отличные от последовательностей дикого типа. Звездочка – стоп кодон, троеточие – окончание белка как в диком типе.

Линия	Аллель	Мутация	Генотип (экзон 1)	Предсказанная аминокислотная последовательность
7_2	A1(1) A1(2) A2 A3	-4 и -16 -426 -2 и -1 -176	<p>GCCA---CCATTCAGTTATGACC GGAAACTCA-----TCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCA--ACCATTCAGTTATGACCTGGAAACTCCGCCCA--TACACATTCCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATPIPVMTKRKTHPPGSTRFRFPPEVP*</p> <p>Отсутствие синтеза белка</p> <p>MATQPFQL*</p> <p>Отсутствие синтеза белка</p>
7_14, 7_15, 7_16	A1(1) A1(2) A2 A3	-5 -4 -3 -3	<p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAACTCCGCCCTCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATQYHSSYDPENSASHIPPGSTRFRFPPEVP*</p> <p>MATQYHSSYDPENSASPHSSRINPIPATGSPKSSPAFSSPLSFCFL*</p> <p>MATQYHSSYDLENSASH-TFLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDLENSASH-TFLPDQHDSGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p>
7_18	A1 A2 A3	-3 -5	<p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>Отсутствие прочтения аллеля</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATQYHSSYDPENSASH-TFLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDPENSASHIPPGSTRFRFPPEIP*</p>
7_23	A1(1) A1(2) A2 A3	-5 и -5 -590 -40 -2	<p>GCCACCC-----CATTCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATPFQL*</p> <p>Отсутствие синтеза белка</p> <p>MATQYHSSRINPIPATGSPKSSPAFSSPLSFCFL*</p> <p>MATQYHSSYDPENSASQHIPPSTRFRFPPEIP*</p>
8_4	A1(1) A1(2) A2 A3	-12 wt wt wt	<p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTC-----CCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCCCATACACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAACTCCGCCCTCCCATACACATTCCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAACTCCGCCCTCCCATACACATTCCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATQYHSSYDPENSAS-----LPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDPENSASHYTFLLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDLENSASHYTFLLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDPENSASHYTFLLPDQHDSGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p>

Линия	Аллель	Мутация	Генотип (экзон 1)	Предсказанная аминокислотная последовательность
8_6	A1(1) A1(2) A2 A3	-2 -16 -5	<p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCA ---ACACATTCTCCCGGATCAACC</p> <p>Отсутствие прочтения аллеля</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG -----CCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCA -----CATTCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATQYHSSYDPENSASQHIPPGGSTRFRFPPEVP*</p> <p>MATQYHSSYDLENSASRINPIPATGSPLKSSPAFSSPLSFCFL*</p> <p>MATQYHSSYDPENSASHIPPGGSTRFRFPPEIP*</p>
8_8	A1 A2 A3	-108 -30 и -12 -4	<p>-----</p> <p>-----GGAAAAC TCCG CCTC-----CTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTC-----TACACATTCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MSSMLVTFLMRGPMLCLAGKELLTIFNLKIG*</p> <p>MENSASSRINPIPATGSPLKSSPAFSSPLSFCFL*</p> <p>MATQYHSSYDPENSATHSSRINTIPATGNPLKSSPAFSSPLSFCFL*</p>
8_9	A1(1) A1(2) A2 A3	-3 wt wt wt	<p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCC---ACACATTCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCATTACACATTCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCATTACACATTCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCATTACACATTCTCCCGGATCAACC</p>	<p>MATQYHSSYDPENSASH-TFLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDPENSASHYTFLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDLENSASHYTFLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p> <p>MATQYHSSYDPENSASHYTFLPDQHDGHRKSLKIISGIFLSSLLLL...</p>
8_10	A1(1) A1(2) A2 A3	+1 -2 -43 -1563	<p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCAATTACACATTCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATGACC GGAAAAC TCCG CCTCCCA---ACACATTCTCCCGGATCAACC</p> <p>GCCA CCCAGTACCATTCCAGTTATG-----ACC</p> <p>-----</p>	<p>MATQYHSSYDPENSASQLHIPPGSTRFRFPPEVP*</p> <p>MATQYHSSYDPENSASQHIPPGGSTRFRFPPEVP*</p> <p>MATQYHSSYDPIPATGSPLKSSPAFSSPLSFCFL*</p> <p>Отсутствие синтеза белка</p>
Линия	Аллель	Мутация	Генотип (экзон 3)	
7_2	A1(1) A1(2) A2 A3	-1 -3 -11	<p>GCAAGTGCAAAATCTTGCGTACCCCA CCAACTTATCTGATCCTCTCCTTCTAGACTGGGTCAAGTACAAAGGCAACCCGGTTCTGGTTCCTCCACCC-GCATTGGTGTCAAGGAC</p> <p>Отсутствие прочтения аллеля</p> <p>A C AAGTGCAAAATCTTGCGTACCCCA CCAACTTATCTGATCCTCTCCTTCTAGACTGGGTCAAGTACAAAGGCAACCCGGTTCTGGTTCCTCCACC---CATTGGTGTCAAGGAC</p> <p>GCAAGTGCAAAATCTTGCGTACCCCA CCAACTTATCTGATCCTCTCCTTCTAGACTGGGTCAAGTACAAAGGCAACCCGGTTCTGGTTCCTCCAC-----GTCAAGGAC</p>	
7_18	A1 A2 A3	wt wt	<p>GCAAGTGCAAAATCTTGCGTACCCCA CCAACTTATCTGATCCTCTCCTTCTAGACTGGGTCAAGTACAAAGGCAACCCGGTTCTGGTTCCTCCACCCGGCATTGGTGTCAAGGAC</p> <p>Отсутствие прочтения аллеля</p> <p>GCAAGTGCAAAATCTTGCGTACCCCA CCAACTTATCTGATCCTCTCCTTCTAGACTGGGTCAAGTACAAAGGCAACCCGGTTCTGGTTCCTCCACCCGGCATTGGTGTCAAGGAC</p>	

3.6. Нокаут по гену *Pain-1* приводит к снижению содержания редуцирующих сахаров в клубнях и светлой окраске чипсов

Две линии с полным нокаутом гена вакуолярной инвертазы (7-2 и 7-23), две линии с нокаутом двух копий гена (7-15 и 7-16) и контрольная линия были выращены на аэропонных установках и получены миниклубни. После хранения миниклубней 90 дней при температуре 4 °С в них была произведена оценка накопления сахаров. Выявлено, что в линиях с полным нокаутом (7-2, 7-23) наблюдается значимое снижение накопления глюкозы и фруктозы (до 3-30 % от содержания в контрольной линии), а также значимое повышения содержания сахарозы. В линиях с нокаутом двух копий гена (7-15 и 7-16) наблюдалось снижение содержания глюкозы и фруктозы (до 50 % от содержания в контрольной линии; значимое снижение содержания глюкозы в случае линии 7-15) и повышение содержания сахарозы (Рисунок 21).

Выявлена негативная корреляция между количеством нокаутных аллелей и содержанием редуцирующих сахаров, $r(18) = -0.8$, $p \leq 0.05$ для глюкозы и $r(18) = -0.76$, $p \leq 0.05$ для фруктозы.

Было решено повторить эксперимент в условиях, приближенных к полевым. Были получены клубни от трех линий – 7-2, 7-15 и 7-23, а также контрольной линии. По три клона каждой линии были высажены в ведра в теплице, получены клубни. Клубни также хранились 90 дней при температуре 4 °С, далее в них была произведена оценка накопления сахаров. В генетически отредактированных линиях, по сравнению с контрольной линией, было показано сниженное накопление фруктозы и глюкозы (Рисунок 21), особенно мало редуцирующих сахаров накапливалось в линии 7-23.

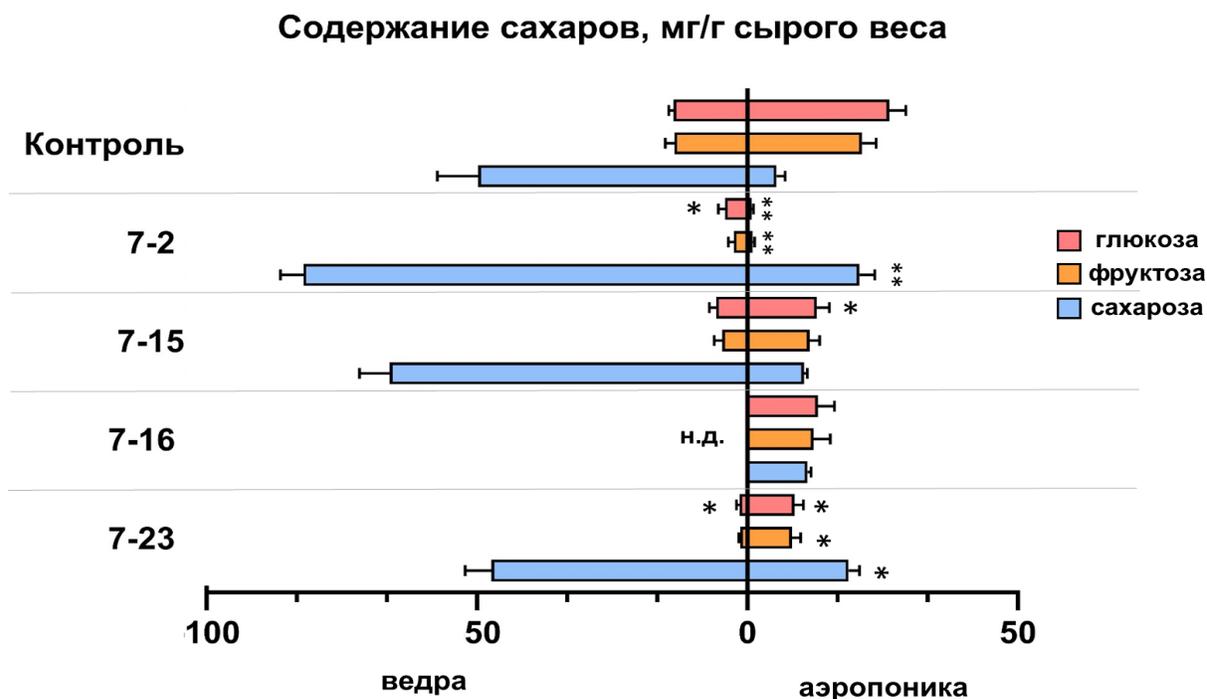


Рисунок 21. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы в клубнях картофеля четырех генетически отредактированных линий и контроля после хранения 90 дней при 4 °С. Каждый столбец отражает среднее значение, вычисленное по трем биологическим повторам. Приведена ошибка среднего. Значимые различия с контрольной линией отображены звездочками (ANOVA; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$). н.д. – нет данных, линия 7-16 не была получена в ведрах.

Клубни линии с нокаутом четырех копий гена вакуолярной инвертазы (7-2 и 7-23), линии с нокаутом двух копий (7-15), а также контрольной линии после хранения 90 дней при температуре 4 °С были использованы для получения чипсов и оценки их окраски. Чипсы, полученные из генетически отредактированных линий, имели более светлую окраску, чем чипсы, полученные из контрольной линии (Рисунок 22а). Наблюдения были подтверждены оценкой интенсивности окраски в ImageJ (Рисунок 22б), а также,

была выявлена отрицательная зависимость между количеством нокаутных аллелей и интенсивностью потемнения чипсов, $r(22) = -0.93$, $p \leq 0.05$.

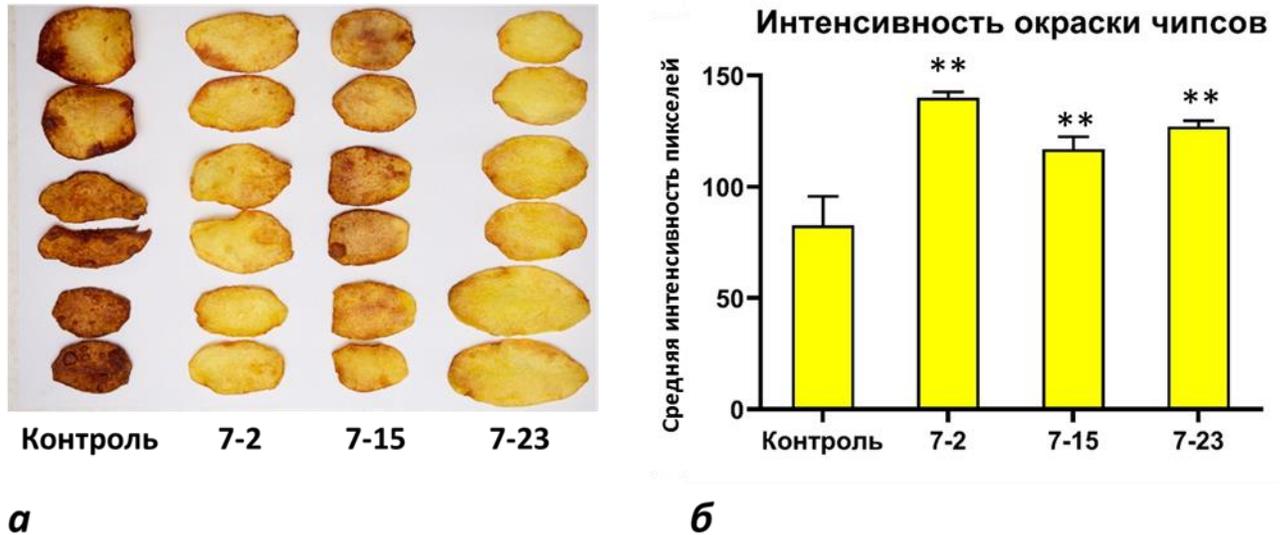


Рисунок 22. Оценка окраски чипсов. (а) Фотографии чипсов, полученных из генетически отредактированных линий с полным нокаутом гена *Pain-1* (7-2,7-23), линии с частичным нокаутом (7-15), и контрольной линии. Было проанализировано три клубня каждой линии, представлено по два слайса с каждого клубня. (б) Интенсивность окраски чипсов, рассчитанная с помощью ImageJ, более высокие значения соответствуют более светлому цвету. Отображены средние значения по каждой линии с указанием ошибки среднего. Значимые различия с контрольной линией отображены звездочками (ANOVA; **, $p < 0.01$).

Была проведена оценка содержания крахмала в клубнях, полученных в ведрах после хранения 100 дней при температуре 4 °С (Рисунок 23). Было показано, что количество крахмала значительно уменьшилось (до 4 %) по сравнению с количеством крахмала в свежесобранных клубнях сорта Симфония (13–19 % по данным Гос. реестра сортов России). Это можно объяснить

распадом крахмала на сахара, которые расходуются в процессах дыхания и накапливаются в ответ на холод. Не было замечено значимого изменения количества крахмала в линиях, нокаутных по гену *Pain-1*. Можно сделать вывод, что нокаут вакуолярной инвертазы влияет на уменьшение количества редуцирующих сахаров и увеличения количества сахарозы (Рисунок 21), но не влияет на содержание крахмала.

Содержание крахмала в клубнях после хранения, %

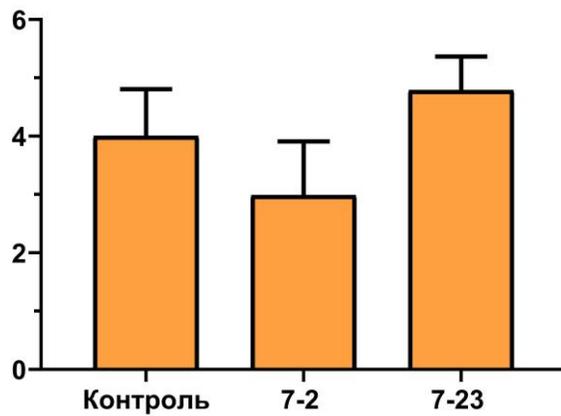


Рисунок 23. Содержание крахмала в клубнях картофеля двух генетически отредактированных линий и контроля после хранения 100 дней при 4 °С. Каждый столбец отражает среднее значение, вычисленное по трем биологическим повторам, и ошибку среднего.

Таблица 5. Сводная информация по генотипу и фенотипу полученных генетически отредактированных линий.

Линия	Наличие трансгена	Количество мутантных аллелей	Количество нокаутных аллелей	Фенотип
7-2	+	4	4	Уменьшение количества редуцирующих сахаров, до 3-30 % от изначального количества, светлая окраска чипсов.
7-14	+	4	2	Анализ не проводился
7-15, 7-16	+	4	2	Уменьшение количества редуцирующих сахаров, до 50 % от изначального количества, окраска чипсов светлее контроля.
7-18	-	4	2	Анализ не проводился
7-23	+	4	4	Уменьшение количества редуцирующих сахаров, до 7-30 % от изначального количества, светлая окраска чипсов.
8-4	-	1	0	Анализ не проводился
8-6	+	4	4	Анализ не проводился
8-8	+	4	4	Анализ не проводился
8-9	-	1	0	Анализ не проводился
8-10	+	4	4	Анализ не проводился

В данной работе было подтверждено снижение количества редуцирующих сахаров в растениях картофеля сорта Симфония, содержащих нокаутные аллели гена *Pain-1*, что согласуется с результатами, полученными при нокаутах этого гена на других генотипах (Clasen *et al.*, 2016; Ly *et al.*, 2023; Yasmeen *et al.*, 2022). К тому же мы, как и (Clasen *et al.*, 2016), наблюдали повышение содержания сахарозы в нокаутных линиях по сравнению с контрольной при хранении в холодных условиях (Рисунок 21).

Была выявлена корреляция между количеством нокаутных аллелей и содержанием редуцирующих сахаров – линии 7-2 и 7-23 с четырьмя нокаутными генотипами содержали меньшее количество глюкозы и фруктозы, чем линии 7-15 и 7-16 с двумя нокаутными генотипами (Рисунок 21). Этот результат согласуется с результатами, полученными (Clasen *et al.*, 2016), но, не во всех работах по нокауту гена *Pain-1* наблюдалась подобная зависимость (Таблица 6). Например, в работе Терер-Вамполкер *et al.* (2023) показано, что в сорте Бруке снижение редуцирующих сахаров происходит с одинаковой интенсивностью, независимо от того, 1 или 4 нативных аллеля было нокаутировано. Также, в работе Shumbe *et al.* (2024) показано, что инсерции одного нуклеотида в 5' UTR двух аллелей гена вакуолярной инвертазы в сорте Леди Розетта достаточно, чтобы значительно снизить содержание глюкозы и фруктозы в клубнях после хранения на холоде. Напротив, в работе Ly *et al.* (2023) были обнаружены полные нокауты по гену *Pain-1* в сорте Дезире, в которых не происходило снижения содержания редуцирующих сахаров. Это может быть объяснено генотип-зависимыми различиями в метаболизме сахаров, так как не только вакуолярная инвертаза играет роль в холодовом осахаривании.

Таблица 6. Результаты нокаута гена *Pain-1* в предыдущих исследованиях.

Авторы	Сорт	Количество использованных нРНК	Количество нокаутных аллелей	Количество редуцирующих сахаров, относительно содержания в немутантном сорте
Clasen <i>et al.</i> , 2016	Рэйнжер	1	2	~80 %
	Рассет		4	~0-10 %
Yasmeen <i>et al.</i> , 2022	АГБ Перпл	2, трансформировали сь независимо	2-14 % мутантных аллелей	30-50 %
Teper- Bamnolker <i>et al.</i> , 2023	Бруке	1	2, 4	~0-10 %
	Дезире	1	3	~5 %
			4	~0 %
Lu <i>et al.</i> , 2023	Атлантик	2 нРНК в одном векторе	4	~0-50 %
	Дезире	2 нРНК в одном векторе	4	~35-100 %
Shumbe <i>et al.</i> , 2023	Леди Розетта	1 нРНК, нацеленная на 5' UTR	2 аллеля с мутацией +1п.н.	~20-70 %
			2 аллеля с иными мутациями	~100 %
Данная работа	Симфония	3 нРНК в одном векторе	4	3-30 %
			2	50 %

3.7 Нокаут по гену *Pain-1* не оказывает выраженного влияния на ростовые параметры, предположительно, за счет компенсаторного эффекта других генов метаболизма сахаров

Известно, что ген вакуолярной инвертазы активно экспрессируется в различных частях растений картофеля (Abbas *et al.*, 2022), а изменение ее экспрессии влияет на рост и развитие у других видов растений (Chen *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010).

Для того чтобы проверить влияние нокаута гена *Pain-1* на ростовые параметры растений картофеля, на полученных генетически отредактированных растениях первого вегетативного поколения был проведен морфологический анализ (Рисунок 24), который показал различия только в массе клубней, полученных в ведрах, между контрольной линией и линиями 7-2 и 7-15 (Таблица 7). Но, так как не было выявлено различий между группами по массе клубней, полученных на аэропонике, то можно сделать вывод, что мутации в гене вакуолярной инвертазы незначительно влияют на ростовые параметры растений картофеля. Эти результаты согласуются с полученными ранее (Clasen *et al.*, 2016; Терер-Вамнолкер *et al.*, 2023).



Рисунок 24. Получение клубней и проведение морфологического анализа генетически отредактированных растений.

Таблица 7. Анализ мутантных растений и контроля по следующим параметрам – рост растения, средняя длина листа, длина корней, количество и вес клубней. Каждый столбец отражает среднее значение, вычисленное по трем биологическим повторам. Приведено стандартное отклонение. Значимые различия с контрольной линией отображены звездочками (ANOVA; *, $p < 0.05$).

	Контрольная линия	Мутантные линии		
		7-2	7-15	7-23
Высота растения, см	23.75 ± 2.98	16.83 ± 3.25	16.25 ± 5.56	30.75 ± 6.01
Средняя длина листа, см	13.3 ± 0.88	9.43 ± 2.6	11.12 ± 3.77	15.55 ± 5.30
Длина корня, см	33.12 ± 5.97	29.16 ± 11.42	17.12 ± 9.11	35.75 ± 7.42
Количество клубней	4.25 ± 1.89	3.66 ± 1.52	7.75 ± 6.23	6 ± 2.82
Средняя масса клубней, г	19.88 ± 17.08	7.88 ± 6.01 *	4.03 ± 4.12 *	14.08 ± 14.40
Средняя масса клубней, г (аэропоника)	3,73 ± 2,93	2,87 ± 1,99	4,49 ± 2,04	2,69 ± 2,28

Чтобы ответить на вопрос, почему нокаут гена *Pain-1* не оказал выраженного влияния на ростовые параметры, нами был проведен анализ экспрессии генов цитоплазматической инвертазы и сахарозосинтазы в корнях пробирочных растений и в клубнях после 15-дневного хранения при 4 °С. Кодлируемые ими ферменты сахарозосинтаза и нейтральная инвертаза, соответственно, также расщепляют сахарозу и принимают активное участие в метаболизме сахаров. Цитоплазматические инвертазы имеют низкую ферментативную активность, однако выполняют множество функций в процессах дифференцировки клеток, роста, и адаптации к стрессам у растений, являются необходимыми для развития корней и репродуктивных органов (Barratt *et al.*, 2009; Welham *et al.*, 2009). Сахарозосинтаза – ключевой фермент растений, катализирующий распад сахарозы на UDP-глюкозу и фруктозу. Этот процесс играет важную роль в росте и развитии растений. Она участвует в снабжении энергией активно растущие ткани, а также в образовании целлюлозы и каллозы, необходимых для роста клеток (Stein and Granot, 2019).

Было выявлено, что по сравнению с контрольной линией, в корнях генетически отредактированных растений наблюдается повышение экспрессии генов *Sus4* и *Ninv5*, в то время как в клубнях различий не наблюдалось (Рисунок 25). Это позволяет сделать предположение, что нокаут гена *Pain-1* незначительно влияет на ростовые параметры за счет компенсаторного эффекта данных генов.

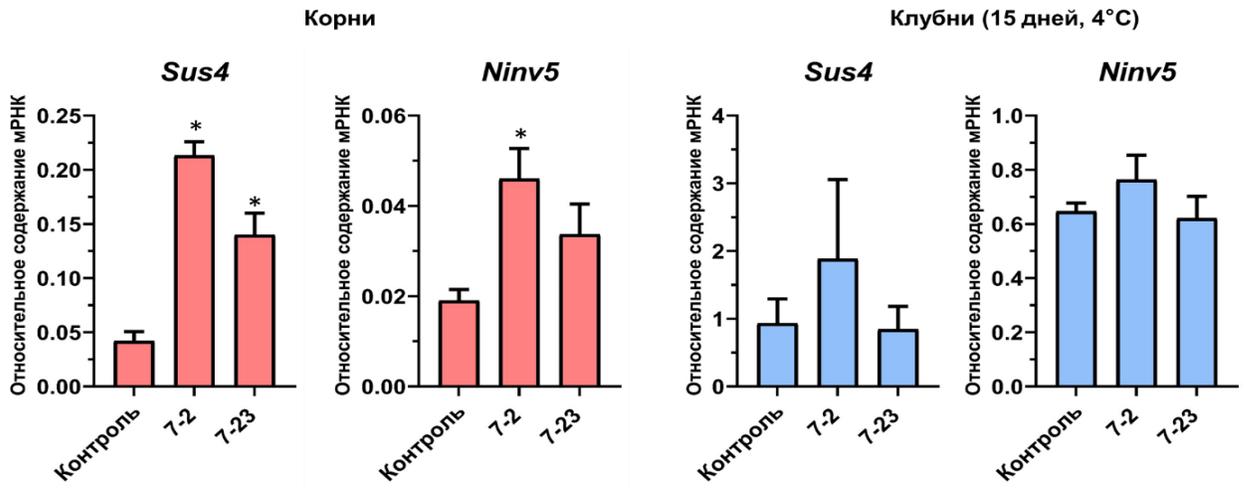


Рисунок 25. Относительный уровень экспрессии генов *Sus4* и *Ninv5* в генетически отредактированных линиях и контрольной. Приведены средние значения и ошибка среднего. Значимые различия с контрольной линией отображены звездочками (ANOVA; *, $p < 0.05$).

Было показано, что мутации в гене могут приводит к снижению его экспрессии в нокаутированных растениях (Yasmeen *et al.*, 2022). Нами был проведен анализ экспрессии гена *Pain-1* в клубнях, полученных в ведрах, до помещения на хранение и после хранения 15 дней при температуре 4 °C, а также в корнях пробирочных растений. Однако значимых изменений выявлено не было (Рисунок 26).

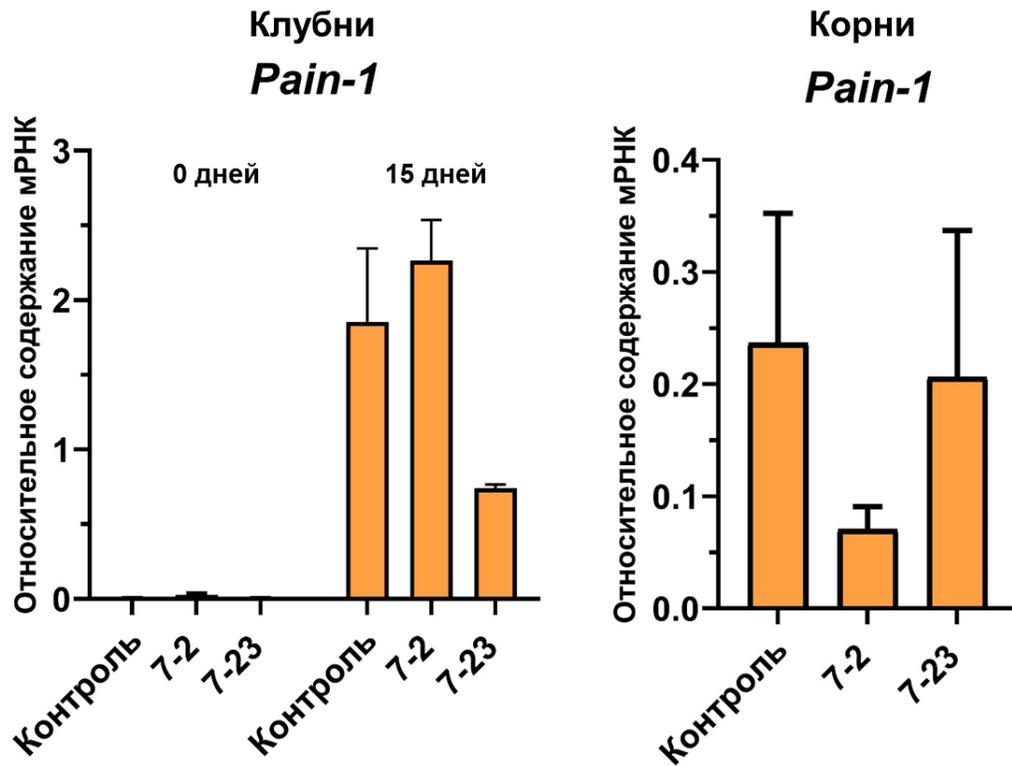


Рисунок 26. Относительный уровень экспрессии генов *Pain-1* в корнях пробирочных растений и в клубнях генетически отредактированных линий и контрольной. Приведены средние значения и ошибка среднего.

3.8 Селекционные перспективы

Агробактериальная трансформация является одним из самых эффективных и популярных методов доставки компонентов для редактирования генома в растения. Однако она сопровождается вставкой в клетки модифицированного растения трансгена. В настоящее время более предпочтительными для дальнейшего выращивания являются нетрансгенные генетически отредактированные растения, а также необходимо избавляться от

присутствия гена нуклеазы Cas9 в геноме, так как она может продолжать свою работу в последующих поколениях, внося новые, в том числе неспецифические мутации. Было отмечено, что мутации и их пропорции могут отличаться в T₀ и дальнейших клональных поколениях картофеля (Butler *et al.*, 2015, 2016). Однако в нашей работе мы не нашли различий в мутациях у растений-регенерантов поколения T₀ и в клубнях, полученных из этих растений. Поэтому можно утверждать, что зависимый от этих мутаций фенотип также будет оставаться стабильным в последующих вегетативных поколениях. Это было экспериментально подтверждено: клубни генетически отредактированных растений были получены двумя различными способами, в ведрах и на аэропонике, и в обоих случаях наблюдалось снижение количества редуцирующих сахаров в генетически отредактированных растениях, в сравнении с контрольными растениями, причем, степень снижения зависела от количества нокаутных аллелей. Также были получены клубни второго вегетативного поколения, на которых был проведен анализ пригодности клубней к переработке, показавший, что чипсы, полученные из генетически отредактированных растений, имели более светлую окраску. Таким образом, нами была показана не только корреляция между фенотипом и генотипом, а также стабильность полученных генотипов и фенотипов в различных условиях и в последующих поколениях, что позволяет использовать полученные растения в дальнейших биотехнологических и селекционных работах.

В данной работе были получены нетрансгенные линии с мутациями в гене вакуолярной инвертазы, но для существенного снижения редуцирующих сахаров, они содержат недостаточно нокаутных аллелей (Таблица 5), также, от линии 7-18 не удалось получить клубни. Однако это показывает возможность

получения нетрансгенных растений с устойчивостью к холодовому осахариванию.

Остальные полученные линии являются трансгенными, поэтому для дальнейшего использования в селекции необходимо избавиться от трансгена, чего можно добиться при скрещивании с другими сортами картофеля. Симфония уже показала себя как хороший донор для селекции – она выступала в качестве одного из родителей для сортов Сокур и Lionheart (<https://cygnetpb.com/varieties/lionheart/>, <https://sdelanounas.ru/blogs/143569/>), поэтому скрещивание полученных генетически отредактированных линий с подходящими сортами приведет к избавлению от трансгена и получению новых генотипов с устойчивостью к холодовому осахариванию.

Для скрещивания с выбранными линиями было решено использовать сорт Гала, так как он хорошо показал себя в гибридизации с различными сортами. Было высажено 10 растений сорта Гала и по 5 растений линий 7-15 и 7-23. Генетически отредактированные растения были использованы в качестве материнских, и было получено 4 ягоды в комбинации скрещивания линии 7-15 на Гала и 38 ягод комбинации линии 7-23 на Гала. Было высажено 50 семян комбинации с линией 7-15 и 100 семян комбинации с линией 7-23, потом в горшки пересажено 27 гибридов поколения F_1 с линией 7-15 и 59 гибридов поколения F_1 с линией 7-23. Анализ на трансген показал, что 15 и 30 гибридов из первой и второй комбинации были нетрансгенные. Анализ мутаций в гене вакуолярной инвертазы показал, что практически у всех гибридов, также как у родителей наблюдается четыре копии данного гена. Практически у всех гибридов выявили наличие двух аллелей с мутациями в гене *Pain-1*, причем, мутации соответствовали тем, что были изначально в линиях 7-15 и 7-23 (Приложение 3). В некоторых растениях наблюдалось наличие трех или пяти

аллелей гена вакуолярной инвертазы, а также двух одинаковых аллелей с мутацией (№ 38, 43, 52, 55, 107, Приложение 3). По-видимому, это связано с нарушением расхождения хромосом во время мейоза и образованием несбалансированных гамет, или дупликацией участка, содержащего данный ген, что может происходить у тетраплоидного картофеля (Bethke and Jansky, 2021).

Наличие трансгена в гибридах, а также мутаций в гене вакуолярной инвертазы свидетельствуют об успешной гибридизации.

Нами были получены нетрансгенные гибриды с мутантными аллелями вакуолярной инвертазы (Приложение 3). Таким образом, было показано, что полученные линии с устойчивостью к холодовому осахариванию можно использовать как доноров для селекции.

Заключение

Хранение клубней картофеля при низких температурах подавляет их прорастание и замедляет процессы гниения, однако приводит к холодовому осахариванию, что негативно сказывается на товарных качествах продукции. В данной работе мы предложили стратегию по получению новых генотипов картофеля, устойчивых к холодовому осахариванию, с использованием редактирования генома с помощью направленной нуклеазы Cas9. Основными этапами исследования являлись: (1) выбор сортов и генов-кандидатов для редактирования; (2) создание и тестирование системы нокаута гена вакуолярной инвертазы; (3) получение генетически отредактированных растений и их анализ; (4) оценка возможности использования модифицированных линий в селекционных программах.

Исследование холодового осахаривания у сортов Никулинский, Невский и Симфония выявило генотип-специфические различия в экспрессии генов *Pain-1* и *Inh2*. В клубнях сорта Симфония в ответ на холод была установлена высокая экспрессия *Pain-1* и низкая экспрессия *Inh2*, тогда как у сортов Никулинский и Невский наблюдалась противоположная зависимость. На основе этих данных для редактирования был выбран сорт Симфония, так как у него ожидается наибольший вклад гена *Pain-1* в процесс холодового осахаривания. Таким образом были не только показаны различия в процессе холодового осахаривания у трех сортов, но и продемонстрирована важность выбора подходящего генотипа для модификации.

Для эффективного редактирования всех копий гена *Pain-1* были разработаны конструкции с тремя различными нРНК, активность которых предварительно тестировалась на протопластах. Впервые были успешно

применены методы трансформации протопластов и агробактериальной трансформации сорта Симфония. Анализ на наличие мутаций проводился с использованием высокопроизводительного секвенирования. Данные подходы позволили получить и проанализировать растения сорта Симфония с нокаутом всех четырех копий *Pain-1*, демонстрирующие снижение накопления редуцирующих сахаров при хранении на холоде до 3%, а также светлую окраску чипсов. Эти результаты демонстрируют, что у сорта Симфония ген *Pain-1* действительно вносит значимый вклад в холодовое осахаривание, а примененные подходы можно использовать в дальнейшем для модификации других генов в различных сортах картофеля.

Несмотря на активное участие гена *Pain-1* в росте и развитии растений, нами было подтверждено, что его нокаут не влияет на ростовые параметры картофеля. В корнях генетически отредактированных линий было отмечено повышение экспрессии генов нейтральной инвертазы *Ninv5* и сахарозосинтазы *Sus4*, что позволяет предположить компенсаторный эффект данных генов. Данные результаты расширяют наше представление о регуляции углеводного метаболизма картофеля.

Для оценки прикладного потенциала генетически отредактированных линий были проведены скрещивания с сортом Гала. В результате получены нетрансгенные гибриды, содержащие мутантные аллели гена вакуолярной инвертазы, что демонстрирует возможность исключения трансгена путем гибридизации и успешного применения полученных линий в селекции.

Таким образом, полученные в данной работе результаты имеют теоретическое и прикладное значение: (1) получены новые знания о регуляции холодового осахаривания в разных сортах, которые способствуют расширению представлений о генотип-специфических молекулярно-генетических

механизмах регуляции ответа растений на воздействие низких температур; предположен компенсаторный эффект генов метаболизма сахаров в растениях картофеля, нокаутных по гену вакуолярной инвертазы; (2) разработаны новые подходы для эффективного геномного редактирования картофеля, получены линии - доноры для селекции по признаку устойчивости к холодovому осахариванию.

Данная работа демонстрирует успешный переход от теоретических научных результатов к практическому применению технологии в селекции.

Выводы

1) Изменения уровня транскрипции генов *Pain-1* и *Inh2* в клубнях во время хранения при температуре 4 °С различаются у сортов Симфония, Невский, Никулинский.

2) Сорт Симфония является наиболее подходящим из исследуемых для снижения содержания редуцирующих сахаров в клубнях при хранении на холоде путем нокаута гена *Pain-1*, так как у него ожидается наибольший вклад этого гена в процесс холодового осахаривания.

3) Разработанные конструкции обладают высокой эффективностью для мутагенеза одновременно четырех копий гена *Pain-1* в протопластах и растениях картофеля.

4) Нокаут гена *Pain-1* в сорте Симфония приводит к устойчивости к холодовому осахариванию, при этом уровень снижения редуцирующих сахаров в клубнях и их пригодность к переработке после хранения на холоде зависит от количества нокаутированных аллелей.

5) Нокаут гена *Pain-1* не оказывает выраженного влияния на рост и продуктивность генетически отредактированных линий сорта Симфония.

6) Возможно получение гибридов F₁ от скрещивания генетически отредактированных линий с сортом картофеля Гала, не содержащих встройку генетической конструкции.

Список использованной литературы

- Abbas, A., Shah, A.N., Shah, A.A., Nadeem, M.A., Alsaleh, A., Javed, T., et al. (2022) *Genome-Wide Analysis of Invertase Gene Family, and Expression Profiling under Abiotic Stress Conditions in Potato. Biology (Basel).*, **11**, 539.
- Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A., Brutnell, T.P., Citovsky, V., et al. (2016) *Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. Plant Cell*, **28**, 1510–1520.
- Amjad, A. (2017) *Screening potato cultivars for low sugar accumulation during storage at various storage temperatures. Pakistan J. Agric. Sci.*, **54**, 343–347.
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A.S., Samuelsson, M., and Hofvander, P. (2017) *Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (Solanum tuberosum) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep.*, **36**, 117–128.
- Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.-S., Ohlsson, P., Gonzalez, M.N., et al. (2018) *Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. Physiol. Plant.*, **164**, 378–384.
- Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.S., Ohlsson, P., Gonzalez, M.N., et al. (2018) *Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. Physiol. Plant.*, **164**, 378–384.
- Bánfalvi, Z., Csákvári, E., Villányi, V., and Kondrák, M. (2020) *Generation of transgene-free PDS mutants in potato by Agrobacterium-mediated transformation. BMC Biotechnol.*, **20**, 25.
- Barratt, D.H.P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., et al.

- (2009) *Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 13124–13129.
- Barrell, P.J., Meiyalaghan, S., Jacobs, J.M.E., and Conner, A.J. (2013) *Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. Plant Biotechnol. J.*, **11**, 907–920.
- Bennett, E.P., Petersen, B.L., Johansen, I.E., Niu, Y., Yang, Z., Chamberlain, C.A., et al. (2020) *INDEL detection, the ‘Achilles heel’ of precise genome editing: a survey of methods for accurate profiling of gene editing induced indels. Nucleic Acids Res.*, **48**, 11958–11981.
- Bethke, P.C. and Jansky, S.H. (2021) *Genetic and Environmental Factors Contributing to Reproductive Success and Failure in Potato. Am. J. Potato Res.*, **98**, 24–41.
- Bhaskar, P.B., Wu, L., Busse, J.S., Whitty, B.R., Hamernik, A.J., Jansky, S.H., et al. (2010) *Suppression of the Vacuolar Invertase Gene Prevents Cold-Induced Sweetening in Potato. Plant Physiol.*, **154**, 939–948.
- Bianchi, G., Scalzo, R. Lo, Testoni, A., and Maestrelli, A. (2014) *Nondestructive Analysis to Monitor Potato Quality during Cold Storage. J. Food Qual.*, **37**, 9–17.
- Bradshaw, J.E. (2017) *Review and Analysis of Limitations in Ways to Improve Conventional Potato Breeding. Potato Res.*, **60**, 171–193.
- Brummell, D.A., Chen, R.K.Y., Harris, J.C., Zhang, H., Hamiaux, C., Kralicek, A. V., and McKenzie, M.J. (2011) *Induction of vacuolar invertase inhibitor mRNA in potato tubers contributes to cold-induced sweetening resistance and includes spliced hybrid mRNA variants. J. Exp. Bot.*, **62**, 3519–3534.

- Butler, N.M., Atkins, P.A., Voytas, D.F., and Douches, D.S. (2015) *Generation and Inheritance of Targeted Mutations in Potato (Solanum tuberosum L.) Using the CRISPR/Cas System. PLoS One*, **10**, e0144591.
- Butler, N.M., Baltes, N.J., Voytas, D.F., and Douches, D.S. (2016) *Geminivirus-mediated genome editing in potato (Solanum tuberosum L.) using sequence-specific nucleases. Front. Plant Sci.*, **7**.
- Carlsen, F.M., Johansen, I.E., Yang, Z., Liu, Y., Westberg, I.N., Kieu, N.P., et al. (2022) *Strategies for Efficient Gene Editing in Protoplasts of Solanum tuberosum Theme: Determining gRNA Efficiency Design by Utilizing Protoplast (Research). Front. Genome Ed.*, **3**.
- Čermák, T., Curtin, S.J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T.J.Y., Konečná, E., et al. (2017) *A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. Plant Cell*, **29**, 1196–1217.
- Chavez, R., Brown, C.R., and Iwanaga, M. (1988) *Application of interspecific sesquiploidy to introgression of PLRV resistance from non-tuber-bearing Solanum etuberosum to cultivated potato germplasm. Theor. Appl. Genet.*, **76**, 497–500.
- Chen, L., Zheng, F., Feng, Z., Li, Y., Ma, M., Wang, G., and Zhao, H. (2021) *A Vacuolar Invertase CsVI2 Regulates Sucrose Metabolism and Increases Drought Tolerance in Cucumis sativus L. Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 176.
- Chen, S., Hajirezaei, M.R., Zanor, M.-I., Hornyik, C., Debast, S., Lacomme, C., et al. (2007) *RNA interference-mediated repression of sucrose-phosphatase in transgenic potato tubers (Solanum tuberosum) strongly affects the hexose-to-sucrose ratio upon. Wiley Online Libr.*, **31**, 165–176.

- Choudhary, A., Wright, L., Ponce, O., Chen, J., Prashar, A., Sanchez-Moran, E., et al. (2020) *Varietal variation and chromosome behaviour during meiosis in Solanum tuberosum*. *Heredity (Edinb)*., **125**, 212–226.
- Clasen, B.M., Stoddard, T.J., Luo, S., Demorest, Z.L., Li, J., Cedrone, F., et al. (2016) *Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout*. *Plant Biotechnol. J.*, **14**, 169–176.
- Concordet, J.-P. and Haeussler, M. (2018) *CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens*. *Nucleic Acids Res.*, **46**, W242–W245.
- Conner, A. and Meredith, C. (1989) *Genetic manipulation of plant cells*. In: *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise Molecular Biology* (Marcus, A., ed) , pp. 653–688. Orlando: Academic Press.
- Conner, A.J., Jacobs, J.M.E., and Genet, R.A. (1997) *Transgenic potatoes versus “traditional” potatoes: what’s the difference?* In: *Commercialisation of Transgenic Crops: Risk, Benefit and Trade Considerations* (McLean, G.D., Waterhouse, P.M., and Gibbs, M.J., eds) , pp. 23–36. Canberra: Cooperative Research Centre for Plant Science and Bureau of Resource Sciences.
- Coombs, J.J., Douches, D.S., Li, W., Grafius, E.J., and Pett, W.L. (2002) *Combining engineered (Bt-cry3A) and natural resistance mechanisms in potato for control of Colorado potato beetle*. *journals.ashs.org*, **127**, 62–68.
- Datir, S. (2011) *Cold-induced sweetening in potato (Solanum tuberosum L.): genetic analysis of the apoplasmic invertase inhibitor gene*.
- Datir, S.S. (2021) *Invertase inhibitors in potato: towards a biochemical and molecular understanding of cold-induced sweetening*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*,

61, 3804–3818.

- Datir, S.S. and Regan, S. (2022) *Role of alkaline/neutral invertases in postharvest storage of potato. Postharvest Biol. Technol.*, **184**, 111779.
- Devaux, A., Kromann, P., and Ortiz, O. (2014) *Potatoes for Sustainable Global Food Security. Potato Res.*, **57**, 185–199.
- Draffehn, A.M., Meller, S., Li, L., and Gebhardt, C. (2010) *Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. BMC Plant Biol.*, **10**, 271.
- Egorova, A.A., Zykova, T.E., Hertig, C.W., Hoffie, I., Morozov, S. V., Chernyak, E.I., et al. (2024) *Accumulation of Anthocyanin in the Aleurone of Barley Grains by Targeted Restoration of the MYC2 Gene. Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 12705.
- Enciso-Rodriguez, F., Manrique-Carpintero, N.C., Nadakuduti, S.S., Buell, C.R., Zarka, D., and Douches, D. (2019) *Overcoming self-incompatibility in diploid potato using CRISPR-cas9. Front. Plant Sci.*, **10**.
- Fritsch, C., Staebler, A., Happel, A., Cubero Márquez, M., Aguiló-Aguayo, I., Abadias, M., et al. (2017) *Processing, Valorization and Application of Bio-Waste Derived Compounds from Potato, Tomato, Olive and Cereals: A Review. Sustainability*, **9**, 1492.
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017) *Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature*, **551**, 464–471.
- Gavrilenko, T.A. and Yermishin, A.P. (2017) *Interspecific hybridization of potato: theoretical and applied aspects. Vavilov J. Genet. Breed.*, **21**, 16–29.
- Gebhardt, C. (2013) *Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends Genet.*, **29**, 248–256.

- Gerasimova, S. V., Korotkova, A.M., Hertig, C., Hiekel, S., Hofe, R., Budhagatapalli, N., et al. (2019) *Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. Vavilov J. Genet. Breed.*, **22**, 1033–1039.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009) *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat. Methods*, **6**, 343–345.
- Gibson, R.W., Jones, M.G.K., and Fish, N. (1988) *Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Theor. Appl. Genet.*, **76**, 113–117.
- González, M.N., Massa, G.A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.S., et al. (2020) *Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleoprotein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. Front. Plant Sci.*, **10**.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R., and Hofacker, I.L. (2008) *The Vienna RNA websuite. Nucleic Acids Res.*, **36**, 70–74.
- Gupta, S.K. and Crants, J. (2019) *Identification and impact of stable prognostic biochemical markers for cold-induced sweetening resistance on selection efficiency in potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding programs. PLoS One*, **14**, e0225411.
- Hahn, F. and Nekrasov, V. (2019) *CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? Plant Cell Rep.*, **38**, 437–441.
- Hamernik, A.J., Hanneman, R.E., and Jansky, S.H. (2009) *Introgression of Wild Species Germplasm with Extreme Resistance to Cold Sweetening into the*

Cultivated Potato. Crop Sci., **49**, 529–542.

- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B.M., Demorest, Z.L., Lowy, A., Ray, E., et al. (2014) *Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. Plant Biotechnol. J.*, **12**, 934–940.
- Haverkort, A.J., Boonekamp, P.M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L.A.P., Kessel, G.J.T., et al. (2016) *Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project. Potato Res.*, **59**, 35–66.
- Helgeson, J.P., Pohlman, J.D., Austin, S., Haberlach, G.T., Wielgus, S.M., Ronis, D., et al. (1998) *Somatic hybrids between Solanum bulbocastanum and potato: a new source of resistance to late blight. Theor. Appl. Genet.*, **96**, 738–742.
- Hellwege, E.M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L., and Heyer, A.G. (2000) *Transgenic potato (Solanum tuberosum) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (Cynara scolymus) roots. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 8699–8704.
- Hernandes-Lopes, J., Pinto, M.S., Vieira, L.R., Monteiro, P.B., Gerasimova, S. V., Nonato, J.V.A., et al. (2023) *Enabling genome editing in tropical maize lines through an improved, morphogenic regulator-assisted transformation protocol. Front. Genome Ed.*, **5**.
- Hoffie, I.V.O. (2023) *Entwicklung des modularen CasCADE-Vektorsystems und dessen Verwendung zur gezielten Mutagenese der Stp13-Orthologe von Weizen und Gerste für die Etablierung dauerhafter Resistenz gegen Rost-und Mehltaupilze.*
- Hoffie, R.E., Otto, I., Perovic, D., Budhagatapalli, N., Habekuß, A., Ordon, F., and

- Kumlehn, J. (2021) *Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley*. *Front. Genome Ed.*, **3**.
- Hofgen, R. and Willmitzer, L. (1988) *Storage of competent cells for Agrobacterium transformation*. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9877–9877.
- Hothorn, M., Van den Ende, W., Lammens, W., Rybin, V., and Scheffzek, K. (2010) *Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 17427–17432.
- Hou, J., Zhang, H., Liu, J., Reid, S., Liu, T., Xu, S., et al. (2017) *Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways*. *J. Exp. Bot.*, **68**, 2317–2331.
- Hough, S.H., Kancleris, K., Brody, L., Humphryes-Kirilov, N., Wolanski, J., Dunaway, K., et al. (2017) *Guide Picker is a comprehensive design tool for visualizing and selecting guides for CRISPR experiments*. *BMC Bioinformatics*, **18**.
- Ibragimova, S., Romanova, A., Saboiev, I., PlantGen2021, E.S.-, and 2021, U. (2021) *Regeneration capacity of potato cultivars prone to cold sweetening*. In: *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021)*. Novosibirsk ICG SB RAS 2021.
- Jansky, S.H., De Jong, W.S., Douches, D.S., Haynes, K.G., and Holm, D.G. (2021) *Cultivar Improvement with Exotic Germplasm: An Example from Potato*. In: *The Wild Solanums Genomes*, pp. 215–230. Springer Cham.
- Jansky, S.H. and Spooner, D.M. (2018) *The Evolution of Potato Breeding*. In: *Plant Breeding Reviews*, pp. 169–214. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., and Weeks, D.P. (2013)
Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Res., **41**, e188–e188.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012) *A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science (80-.)*, **337**, 816–821.
- Jo, K.-R., Kim, C.-J., Kim, S.-J., Kim, T.-Y., Bergervoet, M., Jongtsma, M.A., et al. (2014) *Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. BMC Biotechnol.*, **14**, 50.
- Kang, B.-C., Yun, J.-Y., Kim, S.-T., Shin, Y., Ryu, J., Choi, M., et al. (2018)
Precision genome engineering through adenine base editing in plants. Nat. Plants, **4**, 427–431.
- Karetnikov, D.I., Vasiliev, G. V, Toshchakov, S. V, Shmakov, N.A., Genaev, M.A., Nesterov, M.A., et al. (2023) *Analysis of Genome Structure and Its Variations in Potato Cultivars Grown in Russia. Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5713.
- Kieu, N.P., Lenman, M., Wang, E.S., Petersen, B.L., and Andreasson, E. (2021)
Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. Sci. Rep., **11**, 4487.
- Kim, H., Kim, S.-T., Ryu, J., Kang, B.-C., Kim, J.-S., and Kim, S.-G. (2017)
CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat. Commun., **8**, 14406.
- Kubo, K., Paape, T., Hatakeyama, M., Entani, T., Takara, A., Kajihara, K., et al. (2015) *Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of S-RNase-based self-incompatibility in Petunia. Nat. Plants*, **1**, 14005.

- Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V., and Yadavilli, K.S. (2013) *Invertase and its applications – A brief review. J. Pharm. Res.*, **7**, 792–797.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007) *The Role of Chromatin during Transcription. Cell*, **128**, 707–719.
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., et al. (2017) *Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun.*, **8**, 14261.
- Liu, X., Chen, L., Shi, W., Xu, X., Li, Z., Liu, T., et al. (2021) *Comparative transcriptome reveals distinct starch-sugar interconversion patterns in potato genotypes contrasting for cold-induced sweetening capacity. Food Chem.*, **334**, 127550.
- Liu, X., Lin, Y., Liu, J., Song, B., Ou, Y., Zhang, H., et al. (2013) *StInvInh2 as an inhibitor of StvacINV1 regulates the cold-induced sweetening of potato tubers by specifically capping vacuolar invertase activity. Plant Biotechnol. J.*, **11**, 640–647.
- Liu, X., Song, B., Zhang, H., Li, X.Q., Xie, C., and Liu, J. (2010) *Cloning and molecular characterization of putative invertase inhibitor genes and their possible contributions to cold-induced sweetening of potato tubers. Mol. Genet. Genomics*, **284**, 147–159.
- Liu, X., Zhang, C., Ou, Y., Lin, Y., Song, B., Xie, C., et al. (2011) *Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, StvacINV1, regulates cold-induced sweetening of tubers. Mol. Genet. Genomics*, **286**, 109–118.
- Lopez-Pardo, R., Ruiz de Galarreta, J.I., and Ritter, E. (2013) *Selection of*

- housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. Mol. Breed.*, **31**, 39–45.
- Love, S.L., Pavék, J.J., Thompson-Johns, A., and Bohl, W. (1998) *Breeding progress for potato chip quality in North American cultivars. Am. J. Potato Res.*, **75**, 27–36.
- Lu, Y. and Zhu, J.-K. (2017) *Precise Editing of a Target Base in the Rice Genome Using a Modified CRISPR/Cas9 System. Mol. Plant*, **10**, 523–525.
- Luthra, S., Gopal, J., Kumar, D., Journal, B.S.-P., and 2009, U. (2009) *Solanum wild and cultivated species as source of resistance to cold induced sweetening. Potato J.*, **36**, 115–120.
- Ly, D.N.P., Iqbal, S., Fosu-Nyarko, J., Milroy, S., and Jones, M.G.K. (2023) *Multiplex CRISPR-Cas9 Gene-Editing Can Deliver Potato Cultivars with Reduced Browning and Acrylamide. Plants*, **12**, 379.
- Makhotenko, A. V., Khromov, A. V., Snigir, E.A., Makarova, S.S., Makarov, V. V., Suprunova, T.P., et al. (2019) *Functional Analysis of Coilin in Virus Resistance and Stress Tolerance of Potato Solanum tuberosum using CRISPR-Cas9 Editing. Dokl. Biochem. Biophys.*, **484**, 88–91.
- Malakhova, N.P., Skiba, Y.A., Iskakova, G.A., Naizabayeva, D.A., Tezekbaeva, B.K., Ismagulova, G.A., and Maltseva, E.R. (2021) *A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy. Vavilov J. Genet. Breed.*, **25**, 157.
- Malzahn, A., Lowder, L., and Qi, Y. (2017) *Plant genome editing with TALEN and CRISPR. Cell Biosci.*, **7**, 21.
- McCann, L.C., Bethke, P.C., and Simon, P.W. (2010) *Extensive Variation in Fried*

Chip Color and Tuber Composition in Cold-Stored Tubers of Wild Potato (Solanum) Germplasm. J. Agric. Food Chem., **58**, 2368–2376.

- McCue, K.F., Breksa, A., Vilches, A., and Belknap, W.R. (2018) *Modification of Potato Steroidal Glycoalkaloids with Silencing RNA Constructs. Am. J. Potato Res.*, **95**, 9–14.
- McKenzie, M.J., Sowokinos, J.R., Shea, I.M., Gupta, S.K., Lindlauf, R.R., and Anderson, J.A.D. (2005) *Investigations on the role of acid invertase and UDP-glucose pyrophosphorylase in potato clones with varying resistance to cold-induced sweetening. Am. J. Potato Res.*, **82**, 231–239.
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Lehnert, H., Sprink, T., Kohl, C., Keilwagen, J., and Wilhelm, R. (2020) *Which Factors Affect the Occurrence of Off-Target Effects Caused by the Use of CRISPR/Cas: A Systematic Review in Plants. Front. Plant Sci.*, **11**, 574959.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant.*, **15**, 473–497.
- Nadakuduti, S.S., Buell, C.R., Voytas, D.F., Starker, C.G., and Douches, D.S. (2018) *Genome editing for crop improvement – applications in clonally propagated polyploids with a focus on potato (solanum tuberosum L.). Front. Plant Sci.*, **871**.
- Nicolia, A., Fält, A.-S., Hofvander, P., and Andersson, M. (2021) *Protoplast-Based Method for Genome Editing in Tetraploid Potato. In: Methods in Molecular Biology*, pp. 177–186. Humana Press Inc.
- Nicolia, A., Proux-Wéra, E., Åhman, I., Onkokesung, N., Andersson, M., Andreasson, E., and Zhu, L. (2015) *Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. J. Biotechnol.*, **204**, 17–24.

- Novy, R.G., Secor, G.A., Farnsworth, B.L., Lorenzen, J.H., Holm, E.T., Preston, D.A., et al. (1998) *NorValley: A white-skinned chipping cultivar with cold-sweetening resistance. Am. J. Potato Res.*, **75**, 101–105.
- Occhialini, A., Pfothner, A.C., Frazier, T.P., Li, L., Harbison, S.A., Lail, A.J., et al. (2020) *Generation, analysis, and transformation of macro-chloroplast Potato (*Solanum tuberosum*) lines for chloroplast biotechnology. Sci. Rep.*, **10**, 21144.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., et al. (2012) *Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics*, **28**, 1166–1167.
- Ou, Y., Song, B., Liu, X., Xie, C., Li, M., Lin, Y., et al. (2013) *Promoter regions of potato vacuolar invertase gene in response to sugars and hormones. Plant Physiol. Biochem.*, **69**, 9–16.
- Park, J.S., Park, K.H., Park, S.J., Ko, S.R., Moon, K.B., Koo, H., et al. (2023) *WUSCHEL controls genotype-dependent shoot regeneration capacity in potato. Plant Physiol.*, **193**, 661–676.
- Peloquin, S.J. and Hougas, R.W. (1958) *Fertility in Two Haploids of *Solanum tuberosum*. Science (80-)*, **128**, 1340–1341.
- Plaisted, R.L. and Hoopes, R.W. (1989) *The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. Am. Potato J.*, **66**, 603–627.
- Qian, W., Xiao, B., Wang, L., Hao, X., Yue, C., Cao, H., et al. (2018) *CsINV5, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic Arabidopsis. BMC Plant Biol.*, **18**.
- R Ortiz (1998) *Potato breeding via ploidy manipulations. In: Plant breeding reviews.*
- Raffan, S. and Halford, N.G. (2019) *Acrylamide in food: Progress in and prospects*

- for genetic and agronomic solutions. Ann. Appl. Biol.*, **175**, 259–281.
- Sawai, S., Ohyama, K., Yasumoto, S., Seki, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., et al. (2014) *Sterol Side Chain Reductase 2 Is a Key Enzyme in the Biosynthesis of Cholesterol, the Common Precursor of Toxic Steroidal Glycoalkaloids in Potato. Plant Cell*, **26**, 3763–3774.
- Shelton, A.M., Zhao, J.-Z., and Roush, R.T. (2002) *Economic, Ecological, Food Safety, and Social Consequences of the Deployment of Bt Transgenic Plants. Annu. Rev. Entomol.*, **47**, 845–881.
- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., et al. (2017) *Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. Nat. Biotechnol.*, **35**, 441–443.
- Shirin, F., Hossain, M., Kabir, M., Roy, M., and Sarker, S. (2007) *Callus Induction and Plant Regeneration from Internodal and Leaf Explants of Four Potato (Solanum tuberosum L.) Cultivars. World J. Agric. Sci.*, **3** (1), 1–6.
- Shumbe, L., Soares, E., Muhovski, Y., Smit, I., and Vanderschuren, H. (2024) *Mutation of the *Vinv* 5' UTR regulatory region reduces acrylamide levels in processed potato to reach EU food- safety standards. Plant Biotechnol. J.*, **22**, 2738–2740.
- Shumbe, L., Visse, M., Soares, E., Smit, I., Dupuis, B., and Vanderschuren, H. (2020) *Differential DNA methylation in the *Vinv* promoter region controls Cold Induced Sweetening in potato. BioRxiv.*
- Slater, A.T., Cogan, N.O.I., Hayes, B.J., Schultz, L., Dale, M.F.B., Bryan, G.J., and Forster, J.W. (2014) *Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. Theor. Appl. Genet.*, **127**, 2279–2292.

- Slugina, M., Shchennikova, A., Meleshin, A.A., and Kochieva, E.Z. (2020) *Homologs of vacuolar invertase inhibitor INH2 in tuber-bearing wild potato species and Solanum tuberosum: gene polymorphism and co-expression with saccharolytic enzyme genes in response to cold stress. Sci. Hortic. (Amsterdam).*, **269**, 109425.
- Sowokinos, J.R. (2001) *Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. Am. J. Potato Res.*, **78**, 221–236.
- Spooner, D.M. and Hijmans, R.J. (2001) *Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000. Am. J. Potato Res.*, **78**, 237–268.
- Stein, O. and Granot, D. (2019) *An Overview of Sucrose Synthases in Plants. Front. Plant Sci.*, **10**, 1–14.
- Sun, K., Wolters, A.M.A., Vossen, J.H., Rouwet, M.E., Loonen, A.E.H.M., Jacobsen, E., et al. (2016) *Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. Transgenic Res.*, **25**, 731–742.
- Sun, X., Hu, Z., Chen, R., Jiang, Q., Song, G., Zhang, H., and Xi, Y. (2015) *Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. Sci. Rep.*, **5**, 10342.
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K., and Mark Cigan, A. (2016) *Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun.*, **7**, 13274.
- Tang, G.Q., Lüscher, M., and Sturm, A. (1999) *Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. Plant Cell*, **11**, 177–189.
- Tang, X., Lowder, L.G., Zhang, T., Malzahn, A.A., Zheng, X., Voytas, D.F., et al. (2017) *A CRISPR–Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. Nat. Plants*, **3**, 17018.

- Teper- Bannolker, P., Roitman, M., Katar, O., Peleg, N., Aruchamy, K., Suher, S., et al. (2023) *An alternative pathway to plant cold tolerance in the absence of vacuolar invertase activity. Plant J.*, **113**, 327–341.
- Veillet, F., Kermarrec, M.-P., Chauvin, L., Chauvin, J.-E., and Nogué, F. (2020) *CRISPR-induced indels and base editing using the Staphylococcus aureus Cas9 in potato. PLoS One*, **15**, e0235942.
- Veillet, F., Perrot, L., Guyon-Debast, A., Kermarrec, M.-P., Chauvin, L., Chauvin, J.-E., et al. (2020) *Expanding the CRISPR Toolbox in P. patens Using SpCas9-NG Variant and Application for Gene and Base Editing in Solanaceae Crops. Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1024.
- Vinterhalter, D., Zdravkoviü-Koraü, S., Mitiü, N., Dragiüeviü, I., Cingel, A., and Raspor, M. (2008) *Protocols for Agrobacterium-mediated transformation of potato.*
- Visse-Mansiaux, M., Shumbe, L., Brostaux, Y., Ballmer, T., Smit, I., Dupuis, B., and Vanderschuren, H. (2024) *Identification of potato varieties suitable for cold storage and reconditioning: A safer alternative to anti-sprouting chemicals for potato sprouting control. Food Res. Int.*, **184**, 114249.
- Waltz, E. (2022) *GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market. Nat. Biotechnol.*, **40**, 9–11.
- Wang, L., Li, X.R., Lian, H., Ni, D.A., He, Y.K., Chen, X.Y., and Ruan, Y.L. (2010) *Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and arabidopsis root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively. Plant Physiol.*, **154**, 744–756.
- Wang, S., Zhang, S., Wang, W., and Xiong, X. (2015) *Efficient targeted mutagenesis*

- in potato by the CRISPR / Cas9 system. Plant Cell Rep.*, **34**, 1473–1476.
- Wang, W., Akhunova, A., Chao, S., and Akhunov, E. (2016) *Optimizing multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for wheat. bioRxiv*, 51342.
- Watanabe, K.N., Orrillo, M., Vega, S., Valkonen, J.P.T., Pehu, E., Hurtado, A., and Tanksley, S.D. (1995) *Overcoming crossing barriers between nontuber-bearing and tuber-bearing Solanum species: towards potato germplasm enhancement with a broad spectrum of solanaceous genetic resources. Genome*, **38**, 27–35.
- Welham, T., Pike, J., Horst, I., Flegel, E., Katinakis, P., Kaneko, T., et al. (2009) *A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, Lotus japonicus. J. Exp. Bot.*, **60**, 3353–3365.
- Wheeler, V.A., Evans, N.E., Foulger, D., Webb, K.J., Karp, A., Franklin, J., and Bright, S.W.J. (1985) *Shoot Formation from Explant Cultures of Fourteen Potato Cultivars and Studies of the Cytology and Morphology of Regenerated Plants. Ann. Bot.*, **55**, 309–320.
- Wong, N., Liu, W., and Wang, X. (2015) *WU-CRISPR: Characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. Genome Biol.*, **16**, 1–8.
- Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S. Il, Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., et al. (2015) *DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat. Biotechnol.*, **33**, 1162–1164.
- Wright, S.I., Kalisz, S., and Slotte, T. (2013) *Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, **280**, 20130133.
- Wu, L., Bhaskar, P.B., Busse, J.S., Zhang, R., Bethke, P.C., and Jiang, J. (2011) *Developing Cold-Chipping Potato Varieties by Silencing the Vacuolar Invertase Gene. Crop Sci.*, **51**, 981–990.

- Xu, X., S, P., S, C., B, Z., D, M., and Al, E. (2011) *Genome sequence and analysis of the tuber crop potato*. *Nature*, **475**, 189–195.
- Xu, Y., Li, R., Luo, H., Wang, Z., Li, M.-W., Lam, H.-M., and Huang, C. (2022) *Protoplasts: small cells with big roles in plant biology*. *Trends Plant Sci.*, **27**, 828–829.
- Yasmeen, A., Shakoor, S., Azam, S., Bakhsh, A., Shahid, N., Latif, A., et al. (2022) *CRISPR/Cas-mediated knockdown of vacuolar invertase gene expression lowers the cold-induced sweetening in potatoes*. *Planta*, **256**, 107.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J. (2007) *Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis*. *Nat. Protoc.*, **2**, 1565–1572.
- Zaheer, K. and Akhtar, M.H. (2016) *Potato Production, Usage, and Nutrition—A Review*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **56**, 711–721.
- Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., et al. (2015) *Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System*. *Cell*, **163**, 759–771.
- Zhang, H., Hou, J., Liu, J., Zhang, J., Song, B., and Xie, C. (2017) *The roles of starch metabolic pathways in the cold- induced sweetening process in potatoes*. *Starch - Stärke*, **69**.
- Zhang, H., Liu, J., Hou, J., Yao, Y., Lin, Y., Ou, Y., et al. (2014) *The potato amylase inhibitor gene Sb AI regulates cold- induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity*. *Plant Biotechnol. J.*, **12**, 984–993.
- Zhao, X., Andersson, M., and Andersson, R. (2018) *Resistant starch and other dietary fiber components in tubers from a high-amylose potato*. *Food Chem.*, **251**,

58–63.

- Zhivagui, M., Ng, A.W.T., Ardin, M., Churchwell, M.I., Pandey, M., Renard, C., et al. (2019) *Experimental and pan-cancer genome analyses reveal widespread contribution of acrylamide exposure to carcinogenesis in humans*. *Genome Res.*, **29**, 521–531.
- Zhu, X., Richael, C., Chamberlain, P., Busse, J.S., Bussan, A.J., Jiang, J., and Bethke, P.C. (2014) *Vacuolar Invertase Gene Silencing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Improves Processing Quality by Decreasing the Frequency of Sugar-End Defects*. *PLoS One*, **9**, e93381.
- Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., et al. (2017) *Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion*. *Nat. Biotechnol.*, **35**, 438–440.
- Андрюшина, Н.А., Бацанов, Н.С., Будина, Л.В., Гриневич, В.Ф., Ильин, В.Ф., Клюквина, Ю.В., and Яшина, И.М. (1967) *Методика исследований по культуре картофеля*. М.: Колос.
- Волков, Д.И., Ким, И.В., Гисюк, А.А., and Клыков, А.Г. (2021) *Оценка клубней сортов картофеля на содержание редуцирующих сахаров и лежкость*. *Дальневосточный аграрный вестник*, **1**, 5–13.
- Гайзатулин, А.С. (2021) *Селекция картофеля на пригодность к переработке на картофелепродукты*.
- Гайзатулин, А.С., Митюшкин, А.В., Журавлев, А.А., Митюшкин, А.Р.В., Салюков, С.С., and Овечкин, С.В. (2019) *Идентификация генотипов картофеля в селекции на пригодность к переработке в процессе длительного хранения*. *Вестник Красноярского государственного аграрного*

университета, **151**, 16–23.

- Егорова, А., Иванова, К., and Герасимова, С. (2020) *ИЗОЛЯЦИЯ ПРОТОПЛАСТОВ SOLANUM TUBEROSUM И SOLANUM VERRUCOSUM И ИХ PEG-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ*. In: *МЕТОДЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ* (Закиян, С.М., Медведев, С.П., Дементьева, Е.В., and Власов, В.В., eds) , pp. 89–99. Издательство Сибирского отделения РАН (Новосибирск).
- Колачевская, О.О. (2015) *Влияние гена биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифического промотора на клубнеобразование картофеля *in vitro**.
- Колошина, К., Полухин, Н., and Мызгина, Г. (2018) *Особенности выращивания мини-клубней картофеля сортов селекции сибнирс в условиях аэропоники в зависимости от сроков посадки. Научные исследования для АПК в Сибири и Казахстане*, 56–64.
- Мазин, А.В. (1990) *Методы молекулярной генетики и геной инженерии*, АН СССР. С., (Мазин, А.В., Кузнецов, К.Д., and С., К.А., eds).
- Слугина, М. and Кочиева, Е. (2014) *Вариабельность фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции*, **18**.
- Слугина, М. and Кочиева, Е. (2018) *Использование генов углеводного обмена для улучшения качества клубней картофеля (*Solanum tuberosum L.*)*. *Сельскохозяйственная биология*, **53**, 450–463.

Приложения

Приложение 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название	Последовательность 5'-3'	Назначение	Источник
AE11	CATGGGTCTCACGAATTAAGCC AAGCTCGAAATTAACCCTCAC	Конструирование вектора pAE68	Разработаны в данной работе (Hoffie, 2023)
AE12	AGTGGGTCTCGCGGATCGAGG CTTGCATGCAGGCCTCTG		
SH223	CTCGATCCGCGAGACCCACTG GCCGTCGGTTTCTTAG		
SH224	CTTAATTCGTGAGACCCATGGT CCGCAGGAAAG		
AE14	CATGTTATCCTCCTCGCCC	pAE68 секвенирование	Разработаны в данной работе (Hoffie, 2023)
AE15	GGCCAACATGGTGGATTG		
SH150	GGGTCCGCGCACATTTC		
SH42	GATCGCCGAAGTATCGAC		
SH43	CGGCTTAACTCAAGCGTTAG		
SH79	GCTGCGCCTTATCCGGTAAC		
SH10	GCGTGAGCTATGAGAAAG		
IK70	GCTCACATGTTCTTTCCTGCG		
IK71	CACCTGACGTCTAAGAAACC		
CH159- p6I-RB	GAGTTCCCGCCACAGACC		
CH160- p6I-E9	TGTCAAATCGTGGCCTCTAA		
PAIN1_R	AAACCCCATTACACATTCCTCC	Олигонуклеотиды	Разработаны в

Название	Последовательность 5'-3'	Назначение	Источник
GEN1_F	C	для конструирования нРНК к гену <i>Pain-1</i>	данной работе
PAIN1_R	ATTGGGGAGGAATGTGTAATG		
GEN1_R	GG		
PAIN1_R	AAACCCCGGCATTGGTGTCAA		
GEN2_F	GGAT		
PAIN1_R	ATTGATCCTTGACACCAATGCC		
GEN2_R	GGG		
PAIN1_R	AAACCCCAAGTACCATTCCAGTT	Праймеры для секвенирования гена <i>Pain-1</i>	Разработаны в данной работе
GEN3_F	AT		
PAIN1_R	ATTGATAACTGGAATGGTACTG		
GEN3_R	GG		
Pain1_ex 1_F	GGTCATTTCTCTAATCCCAAGT GT		
Pain1_ex 1_R	TGGTTGTTGAGGATCGGAAAG		
Pain1_ex 3_F	CACTGGCTCTACTTGCCTTT		
Pain1_ex 3_R	GGGTATCGGGTGTCCATTTAT		
Pain1_bd F1	GACCATACGTGGCTGACAAA		
Pain1_ex 1F5	GGTTGGCAAGTTCGGGATAA		
Pain1_ex 1R6	ACCCCAACAGATCAATAGCC		
PAIN1_rt _F	GAGGCTCCGGGAGTTGGTAA		Праймеры, использованные

Название	Последовательность 5'-3'	Назначение	Источник
PAIN1_rt _R	ССААТСТТGACGGAGGCAG	для анализа экспрессии генов	Разработаны в данной работе (Lopez-Pardo <i>et al.</i> , 2013) (Slugina <i>et al.</i> , 2020)
Inh2_rt_F	ACCACCCTAGGCCTCATCAT		
Inh2_rt_R	ACGGCTACCGTTACATCAGC		
APRT_rt_ F	GAACCGGAGCAGGTGAAGAA		
APRT_rt_ R	GAAGCAATCCCAGCGATACG		
ef1 α _rt_F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA		
ef1 α _rt_R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA		
sec3_rt_F	GCTTGCACACGCCATATCAAT		
sec3_rt_R	TGGATTTTACCACCTTCCGCA		
SUS4_rt_ F	GCATCCTTTCCTAAACCAACC		
SUS4_rt_ R	GAGGTATTCCTCTGCCTTCC		
NINV5 F	GAGATCAACCTGTGGGAACTA TT		
NINV5 R	TCAGGTTCAACCATTCATCAAGA		
Hpt_U	CAGGCTCTCGATGAGCTGATG		
Hpt_R	GACATTGTTGGAGCCGAAATC C		
Hpt_PF	[FAM]TGGGCCGAGGACTGCC CG[BHQ1]		

Приложение 2. Предсказанные нецелевые сайты, согласно CRISPOR 5.2.

Сайт-мишень (РАМ выделен)	Последовательность нецелевого сайта	Позиции отличающихся нуклеотидов в сайте	Количество отличающихся нуклеотидов	Расположение нецелевого сайта
ATAACTGGAA TGGTACTGGG TGG	ATAACTGGAA TGATAATAAG AGG *..**.	4	intergenic:XM_006338216.2-XM_006338217.2
	ATATCCGGAA TGGTAATGGT AGG	...*.*...*.*	4	intergenic:XR_367008.2/XR_367005.2/XR_367004.2/XR_001473058.1/XR_001473057.1/XR_001473056.1/XR_001473055.1-XM_006343682.2
	ATAAATAGGA TGGTAATGGG TGG	...*.*.**.*	4	intergenic:XM_015313567.1-XR_001474779.1
	AGAAATGGAA AGGTAATGGG AGG	.*..*.... *....*....	4	intergenic:XM_006360844.2-XM_015315038.1
	ATAACGGGAA AGGTAATGGG CGG*.... *.....* *	4	exon:XM_006339940.2
	ATATCAGGAA TGGTACCGGT AGG	...*.*....*.*	4	intergenic:XM_006353825.2-LOC102581108
	ATATCTGGAA TGGTAAAGGT AGG	...*.....**.*	4	intergenic:XR_367008.2/XR_367005.2/XR_367004.2/XR_001473058.1/XR_001473057.1/XR_001473056.1/XR_001473055.1-XM_006343682.2
	ACAACGGGAT TTGTACTTGGAGG	.*.....* *.....* *.....*	4	intergenic:XM_006361691.2-XR_001475383.1
	ACAACGGGAT TTGTACTTGGAGG	.*.....* *.....* *.....*	4	intergenic:rna-TRNAR-UCU-12-XM_015303942.1/XM_015303943.1/XM_006364377.2
	ATAATTGGAA TGGAACCTTGAGG*.... ..*...**.	4	intron:XR_001474309.1/XM_015311900.1/XM_015311899.1/XM_006354462.2

Сайт-мишень (РАМ выделен)	Последовательность нецелевого сайта	Позиции отличающихся нуклеотидов в сайте	Количество отличающихся нуклеотидов	Расположение нецелевого сайта
	ATACGAGGAA TGGAАCTGGG GGG	...***... ...*.....	4	intergenic:XM_015310707.1- XM_015310708.1/XM_006351872.2
	ATTACTGGAA TTGCACTTGG AGG	..*..... *.*...*	4	exon:XM_015306995.1/XM_015306994.1
	ATATCTGGAA TGGTAAGGGC AGG	..*..... ...**..*	4	intergenic:XM_006339966.2-XM_006339967.2
	ATATCTGGAA TGGTAAGGGC AGG	..*..... ...**..*	4	intergenic:XM_006355841.2-XM_006355812.2
	ATAAATGCAA TGGTACTTGG AGG	...*.*.*..	3	exon:XM_006340459.2
CGGGAGGAAT GTGTAATGGG AGG	GGGAAGGAAT GAGTAATGGT CGG	*.*..... .*.....*	4	intergenic:XM_015308592.1-XM_015308583.1
	CGAGAGGACT GTGAAATGGA GGG	.*.....*. ..*.....*	4	intergenic:XR_001473143.1-XM_015307472.1
	AGGGAGGAAG GTGAAATAGG AGG*. .*.*..*	4	intron:XM_006345712.2
	CGGAAGGGGT GTCTAATGGG TGG	..*...*. ..*.....	4	intron:XM_015305405.1/XM_015305404.1
	GGGGACGAAT GTCAAATGGG AGG*..... **.....	4	intergenic:XR_367268.2-XM_015308379.1
	GGGTAGGGAT GTGTAAAGGG GGG	..*...*.*....	4	intergenic:XR_001471987.1-XM_006340477.2
	CGGAAGGAAT TTGCAATTGG AGG	..*.....* .*.*...*	4	intergenic:XM_015312109.1-XR_367867.2

Сайт-мишень (РАМ выделен)	Последовательность нецелевого сайта	Позиции отличающихся нуклеотидов в сайте	Количество отличающихся нуклеотидов	Расположение нецелевого сайта
	GTTCAGGAAT GTGTAATGGG TGA	***.....	4	intron:XM_006366597.2
	CGGGACGAAT GTGGGGTGGG CGG	...*..... .***....	4	intergenic:XM_006355097.1-XM_015312189.1
	CGGGACGATT GTGGAGTGGG CGG	...*.*.. ..*.*...	4	intergenic:XM_006360132.2-XM_015314727.1
	TGAGAGAAAT GTGGAATGGG GGG	.*...*.. ..*.....	4	intron:XM_006367055.2
	GGGGAGGATT GTGTAATGGC AGG*..*	3	intergenic:XM_006358600.2/XM_006358599.2- XM_006358599.2
TCCTTGACAC CAATGCCGGG TGG	TCCTTGACAG CAGTGACGGT AGG*.. *..*..*	4	intergenic:XM_015308612.1/XM_006346882.2/XM_006346883.2-XM_006346884.2
	TCCTTGATACC AATGTCGATT GG*.. ...*..**	4	intergenic:XM_015315219.1-XM_006361263.2
	TCCTTGAGCCC AATCCGGGT GG*.. ..*.....	3	exon:XM_006355428.2

Приложение 3. Анализ на наличие мутаций в гене вакуолярной инвертазы в нетрансгенных гибридах F₁, полученных при скрещивании генетически отредактированных линий 7-15, 7-23 и сорта Гала.

Номер гибрида	Мутация	Генотип (экзон 1)
Гала x 7-23		
30	-5 и -5 -40 wt wt	CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
32	-5 и -5 -590 wt wt	CCACC-----CCATTCAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
35	-40 -590 wt wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
36	-40 -590 wt wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
37	-5 и -5 -40 wt wt	CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC
38	-40 -40 wt wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
42	-40 -590 wt wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
43	-40 -2 wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC
44	-40 -2 wt wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC
47	-40 -40 wt wt	CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----ТТACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
50	-5 и -5 -590 wt	CCACC-----CCATTCAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT

Номер гибрида	Мутация	Генотип (экзон 1)	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
52	-40	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-40	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
7	8	CCACC-----CCATTCAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	wt	CCACCCAGTACCACTTCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
8	8	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC
	-590	-----	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC		
91	-5 и -5	CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-40	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
92	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	-590	-----	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC		
93	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	-590	-----	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT		
94	-5 и -5	CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-40	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
97	-40	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-590	-----	
	wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT		
98	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	-590	-----	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC		
100	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	-5 и -5	CCACC-----CCATTCAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
102	-40	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-590	-----	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT		
105	-5 и -5	CCACC-----CCATTCAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	-2	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACCTCCGCCTCCCA--ACACATTCCTCCCGGATCAACAC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC	
	wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACCTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT	

Номер гибрида	Мутация	Генотип (экзон 1)
107	-40 -40 wt wt	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
108	-40 -590 wt wt	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
112	-5 и -5 -590 wt wt	CCACC-----CCATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
114	-5 и -5 -40 wt wt	CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC
115	-40 -590 wt wt	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC ----- CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
116	-40 -5 и -5 wt wt	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
118	-2 -590 wt wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA--ACATTCCTCCCGGATCAACAC ----- CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
119	-40 -5 и -5 wt wt	CCACCC-----TTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCC-----CATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCC
Глава 7-15		
55	-3 -4 -5 wt wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----CACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
57	-5 -4 wt wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCC
59	-5 -3 wt wt	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTTACACATTCCTCCCGGATCAACCC
63	-4 -5	CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC

Номер гибрида	Мутация	Генотип (экзон 1)
	wt wt	CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
68	-3 -3 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
69	-5 -3 wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
72	-5 -3 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----CACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
73	-5 -3 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCC-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
76	-4 -5 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
77	-3 -3 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
78	-4 -3 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCA-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCACTCAAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACAC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
79	-4 -3 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCA-----CACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT
80	-4 -5 wt wt	CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCCA-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCCGGAAAACTCCGCCTCCC-----ACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCC CCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATTCCTCCCGGATCAACCT