



На правах рукописи

Егорова Анастасия Александровна

**ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ С
УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ХОЛОДОВОМУ ОСАХАРИВАНИЮ**

1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории генной инженерии, г. Новосибирск.

Научный
руководитель: **Кочетов Алексей Владимирович**
доктор биологических наук, академик РАН, заведующий лабораторией генной инженерии, директор ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные
оппоненты: **Боровский Геннадий Борисович**
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физиологической генетики ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук», г. Иркутск

Ганчева Мария Семеновна
кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет», г. Санкт-Петербург

Ведущее
учреждение: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:
пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,
тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278.
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИГиГ СО РАН и на сайте Института: www.icgbio.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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 холодному 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 холодного 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 холодовому 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. Продemonстрировано 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. Сабоиевым 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).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК, входящих в Международные базы цитирования (WoS, Scopus), а также глава в монографии.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Растительный материал. Для анализа содержания сахаров и оценки уровня экспрессии генов в клубнях использовали три сорта *Solanum tuberosum* L. – Невский, Никулинский, Симфония. Растения выращивали на экспериментальных участках Сибирского НИИ растениеводства и селекции - филиала ИЦиГ СО РАН, затем хранили при фиксированной температуре 4 °С. Отобранные для направленного мутагенеза генотипы выращивали в условиях *in vitro* на среде MS (Murashige and Skoog, 1962). Сорт Гала использовали для гибридизации с полученными генетически отредактированными линиями.

Анализ содержания сахаров в клубнях сортов. В клубнях культурного картофеля определяли содержание глюкозы в контрольной точке в момент закладки на хранение (0 дней) и спустя 90 дней хранения при температуре 4 °С с помощью глюкозооксидазного метода, используя набор «Глюкоза-Ново» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Для определения оптической плотности раствора использовали сканирующий спектрофотометр СПЕК ССП-705 (ЗАО «Спектроскопические системы», Москва). Содержание глюкозы рассчитывали по калибровочным графикам.

Анализ последовательностей гена *Pain-1* в исследуемых сортах картофеля. Фильтрованные прочтения геномов сортов картофеля картировали на референсный геном картофеля *Solanum tuberosum* DM1-3 v4.03 (Karetnikov *et al.*, 2023). Для выявления однонуклеотидных замен в гене *Pain-1* применялся конвейер GATK Best Practices пакета GATK. Далее проводилось сравнение выявленных замен с описанными в литературе однонуклеотидными полиморфизмами, связанными с устойчивостью к холодовому осахариванию (Draffehn *et al.*, 2010).

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии генов *Pain-1* (PGSC0003DMG400013856) и *Inh2* (LOC102586828) 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 помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Для анализа экспрессии генов *Ninv5* (PGSC0003DMG400009936) и *Sus4* (PGSC0003DMG400002895) в генетически отредактированных линиях суммарную РНК выделяли из клубней (после 15-дневного хранения при 4 °С) и корней пробирочных растений (использовали по три растения каждой линии). Для количественной оценки уровня экспрессии генов проводили ПЦР в режиме реального времени. Структуры праймеров были заимствованы из литературных источников (Slugina *et al.*, 2020; Abbas *et al.*, 2022; Datir and Regan, 2022), а также разрабатывали с помощью PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>).

Создание конструкций для нокаута целевых генов. Сайты-мишени для РНК-направленной нуклеазы Cas9 подбирали при помощи программ DeskGen (Hough *et al.*, 2017) и WuCRISPR (Wong, *et al.*, 2015). Для получения векторов была использована модульная векторная система CasCADE (Hoffie, 2023), разработанная и любезно предоставленная группой доктора Йохена Кумлена (IPK Gatersleben, Германия).

Оценка активности конструкции с нРНК и нуклеазой Cas9 в протопластах картофеля. Выделение и трансформацию протопластов производили

согласно протоколу, описанному в работе (Егорова *et al.*, 2020). Из трансформированных протопластов выделялась ДНК, которая далее использовалась для амплификации участков, содержащих сайты-мишени, нуклеотидные последовательности полученных ампликонов определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования на приборе Illumina MiSeq в ЦКП геномных исследований (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Эффективность мутагенеза подсчитывалась с помощью алгоритма Small_Indel_Analyzer (Hernandes-Lopes *et al.*, 2021).

Стабильная трансформация картофеля. Агробактериальную трансформацию картофеля проводили по ранее описанному протоколу (Колачевская, 2015) с изменениями.

Генетический анализ генетически отредактированных растений. Из растений-регенерантов выделялась ДНК, проводилась амплификация участков гена, содержащих сайты-мишени. Образцы были секвенированы по Сэнгеру, и с помощью высокопроизводительного секвенирования на приборе Illumina MiSeq. Для того, чтобы оценить соотношения аллелей и прочтений с различными мутациями, полученные нуклеотидные последовательности в формате fastq.gz обрабатывали с помощью алгоритма collapse (<https://usegalaxy.org/>) и выравнивали на референсную последовательность. Предсказания белковой последовательности проводили программой ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Скрининг на вставку участка генетической конструкции проводили с помощью количественной ПЦР, оценивали наличие гена *hpt*, кодирующего гигромицин фосфотрансферазу.

Анализ фенотипа генетически отредактированных растений. Полученные растения культивировали в условиях *in vitro* путем черенкования, тем самым из каждого растения была создана генетически отредактированная линия. Для анализа фенотипа, по четыре клон 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 клон каждой линии и контроля выращивали в условиях, приближенных к полевым: в ведрах с грунтом, расположенных в парнике, накрытом полупрозрачной тканью. Для морфологической оценки использовали растения-регенеранты, выращенные в закрытом грунте и полученные из них клубни (данное поколение обозначено как клубневое поколение V₁). Оценивали следующие параметры – рост растения, средняя длина листа, длина корней, количество и вес клубней. Также оценивали массу клубней у растений, полученных на аэропонных установках. Клубни просушивали и хранили 90 дней при температуре 4 °С. Анализ содержания сахаров проводили на клубнях поколения V₁ с использованием набора Sucrose, D-Fructose and D-Glucose (Megazyme, K-SUFRG 04/18) согласно инструкции производителя. Анализ пригодности клубней к переработке проводился на клубнях поколения V₂ (полученные из клубней поколения V₁). По три клубня с каждой линии (один клубень с растения) очищали, нарезали на пластины толщиной 1 мм на терке-шинковке и жарили в растительном масле при температуре 190 °С в течение 80 секунд. Интенсивность окраски чипсов оценивали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/>), по средней интенсивности 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).

Получение и анализ гибридов картофеля. Гибридизацию картофеля проводили вручную по методическим рекомендациям ВНИИКС (1967). 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.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводился в R (версия 4.3.2), а также с использованием ресурса <https://astatsa.com>. Статистическую обработку результатов анализа 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 использовали для оценки связи между количеством нокаутных аллелей и содержанием редуцирующих сахаров. Результаты считались статистически значимыми при значениях $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Выбор сорта для нокаута гена *Pain-1*. Было показано, что в клубнях картофеля у сортов Никулинский, Невский и Симфония во время хранения при низких температурах (4 °C) происходит накопление редуцирующего сахара глюкозы (Рисунок 1а). Кроме того, эти сорта были проанализированы на наличие ранее описанных однонуклеотидных замен, ассоциированных с повышенной устойчивостью к холодовому осахариванию (Draffehn *et al.*, 2010), однако в исследуемых генотипах данные замены не были обнаружены.

Поскольку влияние генов *Pain-1* и *Inh2* на холодовое осахаривание может зависеть от генотипа, был проведён анализ их экспрессии в клубнях растений с целью выявления сорта, в котором вакуолярная инвертаза вносит наибольший вклад в накопление сахаров. Обнаружены различия в паттернах экспрессии этих генов в клубнях исследуемых сортов при хранении на холоде (Рисунок 1б, в), что может указывать на генотип-зависимую регуляцию холодового осахаривания. Повышение экспрессии гена *Pain-1*, наблюдаемое у всех сортов в начале срока хранения, было наиболее выраженным и статистически достоверным только у растений сорта Симфония. При этом у растений сортов Никулинский и Невский произошло увеличение уровня экспрессии гена ингибитора инвертазы *Inh2* (Рисунок 1б, в). Вероятно, активность гена *Pain-1* в клубнях сортов Никулинский и Невский может быть снижена за счет его ингибирования продуктом гена *Inh2*, вследствие чего вакуолярная инвертаза не оказывает значительного влияния на процесс осахаривания в условиях эксперимента. В отличие от этих сортов, у сорта Симфония на фоне сниженной экспрессии гена *Inh2* наблюдали повышенную экспрессию 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 гена вакуолярной инвертазы в качестве генотипа-донора был выбран сорт Симфония.

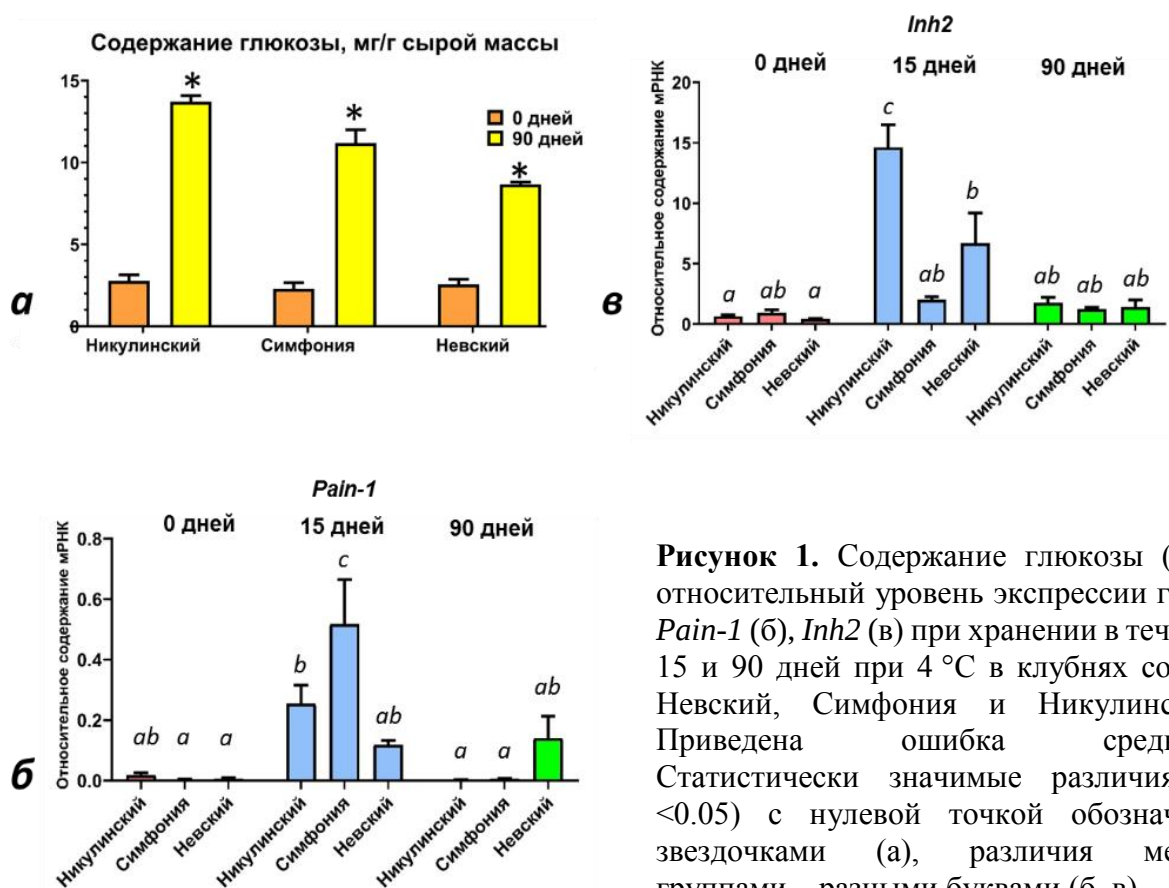


Рисунок 1. Содержание глюкозы (а) и относительный уровень экспрессии генов *Pain-1* (б), *Inh2* (в) при хранении в течение 15 и 90 дней при 4 °С в клубнях сортов Невский, Симфония и Никулинский. Приведена ошибка среднего. Статистически значимые различия ($p < 0.05$) с нулевой точкой обозначены звездочками (а), различия между группами – разными буквами (б, в).

Создание конструкций для нокаута гена *Pain-1*. Для повышения эффективности мутагенеза было решено использовать три направляющие РНК (нРНК) в одной конструкции. На последовательности гена *Pain-1* были выбраны три сайта-мишени: два из них расположены в начале первого экзона (№ 1 и № 2), а один (№ 3) — в третьем (Рисунок 2а). С использованием NGS-секвенирования на платформе Illumina Miseq была проанализирована аллельная структура участков гена в геноме сорта Симфония, содержащих сайты-мишени. Были обнаружены три аллеля (обозначены как А1, А2, А3), различающихся однонуклеотидными заменами (Рисунок 2а). Соотношение количества прочтений при секвенировании для каждого варианта свидетельствовало о наличии двух копий аллеля А1 и по одной копии А2 и А3 (2:1:1). Сайты-мишени № 2 и № 3 имели идентичную последовательность во всех трех аллелях, но сайт-мишень № 1 имел две однонуклеотидные замены в А3 (Рисунок 2а).

Для создания конструкций для нокаута была использована модульная векторная система CasCADE. Данная система содержит около 50 модульных векторов, совместимых с Golden Gate клонированием, среди которых – 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). Она позволила нам разработать мультиплексные конструкции, содержащие три нРНК, направленные на разные участки гена вакуолярной инвертазы. Для

тестирования эффективности мутагенеза на протопластах картофеля была создана конструкция рАЕ70, содержащая три нРНК, *cas9* и репортёрный ген *mCherry*. Для агробактериальной трансформации три нРНК и *cas9* были переклонированы в бинарный вектор (рАЕ73) (Рисунок 2б).

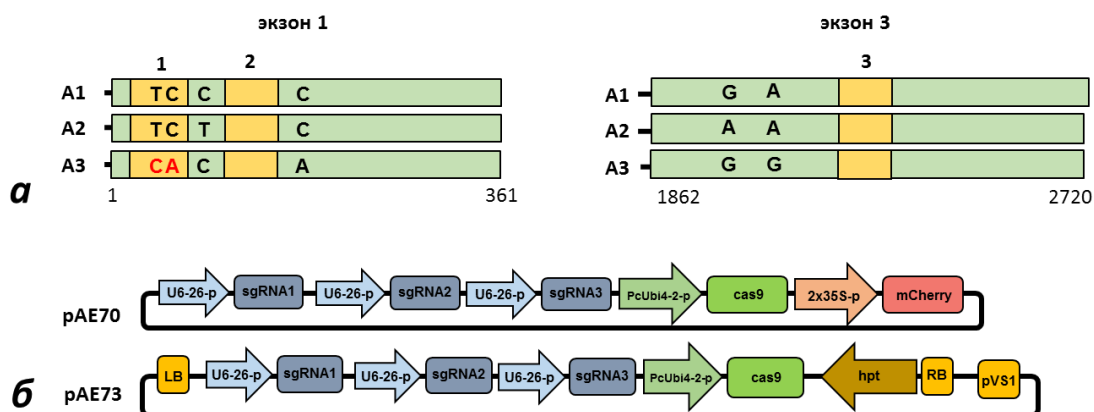


Рисунок 2. Создание конструкций для нокаута гена *Pain-1* в сорте картофеля Симфония. (а) Схема аллелей гена *Pain-1*. A1, A2, A3 – аллели, однонуклеотидные замены выделены буквами. Экзоны обозначены зелеными прямоугольниками, сайты-мишени – желтыми. (б) Схемы конструкций, использованных для трансформации протопластов (рАЕ70) и агробактериальной трансформации (рАЕ73). sgRNA – химерная направляющая РНК, *cas9* – ген нуклеазы Cas9 с оптимизированным для *Arabidopsis thaliana* кодоновым составом, U6-26p – промотор U6-26 *A. thaliana*, PcUbi-2-p – промотор убиквитина *Petroselinum crispum*, *mCherry* – ген красного флуоресцентного белка, *hpt* – ген устойчивости к гигромицину, кодирующий гигромицин фосфотрансферазу, pVS1 – ориджин репликации для *Agrobacterium tumefaciens*, LB и RB – последовательности, ограничивающие T-DNA.

Анализ эффективности мутагенеза гена *Pain-1* на протопластах картофеля. В данной работе впервые был проведен успешный эксперимент по направленной модификации генов в протопластах картофеля сорта Симфония. Был разработан авторский протокол (Егорова *et al.*, 2020) на основе методик, ранее описанных для модельных сортов растений (Nicolia *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011). Для повышения выхода протопластов 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 рАЕ70 была использована для тестирования эффективности мутагенеза на протопластах (Рисунок 3а). Были проведены четыре независимые трансформации протопластов, а также использован один контрольный нетрансформированный образец. Средняя эффективность трансформации составила 65 %, а максимальная – 74 %. С помощью секвенирования были выявлены более двадцати различных типов мутаций в сайтах-мишенях № 1 и № 2 (Рисунок 3б). Однако в последовательностях, содержащих сайт-мишень № 3, мутации обнаружены не были. Поскольку в геноме сорта Симфония ген *Pain-1* представлен тремя аллелями, доля прочтений с мутациями была подсчитана отдельно в каждом из них. Итоговая эффективность мутагенеза в среднем составила 72 % в вариантах A1 и A2; 25 % в варианте A3. Сниженная эффективность в аллеле варианте A3

скорее всего связана с тем, что в этом аллеле сайт-мишень № 1 отличается от нРНК, что свидетельствует о специфичности мутагенеза.

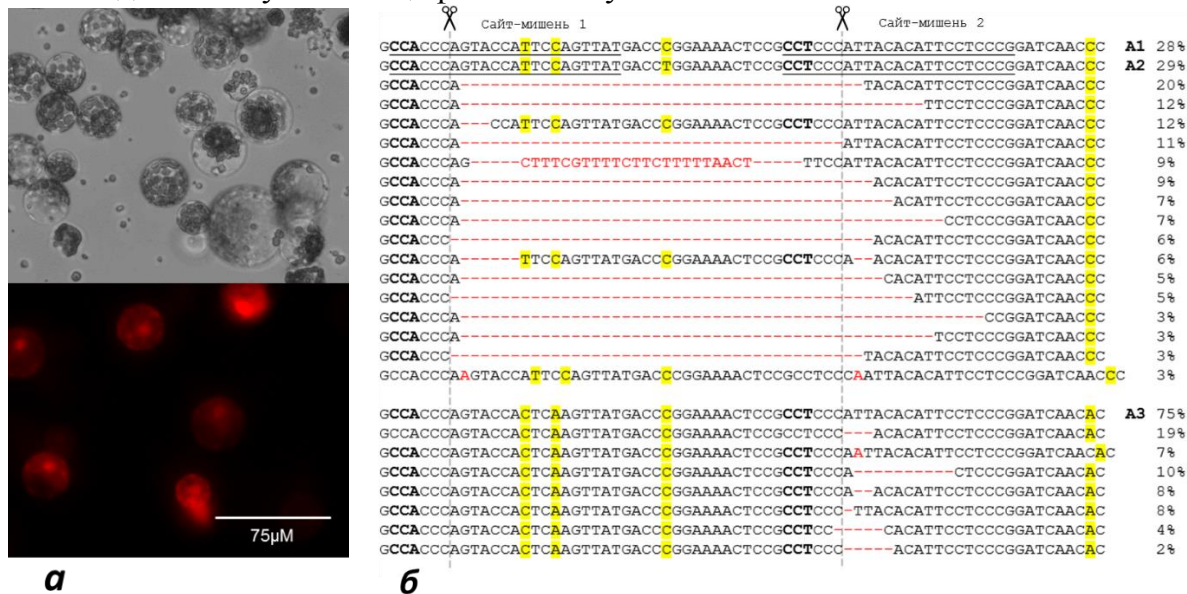


Рисунок 3. Анализ эффективности мутагенеза на протопластах. (а) Визуализация препарата протопластов картофеля при помощи системы EVOS M5000 через двое суток после трансформации. Снизу: поле зрения с использованием красного канала, сверху: светлое поле (brightfield). (б) Обобщенная иллюстрация различных мутаций, найденных в последовательности первого экзона гена *Pain-1*. В третьем экзоне мутации не были обнаружены. A1, A2, A3 – аллели. Желтым выделены однонуклеотидные замены, жирным шрифтом выделены РАМ (мотив, прилегающий к протоспейсеру), сайты-мишени подчеркнуты, пунктирной линией обозначен сайт разрезания Cas9. Указаны доли прочтений, содержащих различные мутации. Для подсчета разные биологические повторности были объединены.

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

Способность к регенерации у растений, а также чувствительность к ростовым факторам являются генотип-зависимыми (Wheeler *et al.*, 1985; Shirin *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2023). Поэтому был оптимизирован протокол агробактериальной трансформации (Колачевская, 2015) для сорта Симфония и проведена трансформация данного сорта конструкцией рАЕ73. Было уменьшено время инкубации на каллусообразующей среде с 5 до 3 дней и увеличена концентрация селективного агента (гигромицина) с 3 до 5 мг/л. В результате двух экспериментов было получено 40 растений-регенерантов, из которых 12 (30 % от всех растений) были трансгенными (содержали вставку в геном участка конструкции), из них 8 содержали мутации в сайтах-мишенях, то есть эффективность мутагенеза составила 67 %. Также были обнаружены 3 нетрансгенных растения. Каждое генетически отредактированное растение было клонировано путем черенкования и дало начало соответствующим линиям.

Использование высокопроизводительного секвенирования позволило нам различить аллели и идентифицировать в них конкретные мутации (Таблица 1). При использовании праймеров *Pain1_ex1_F* и *Pain1_ex1_R*, *Pain1_ex3_F* и *Pain1_ex3_R* (Рисунок 4), амплифицирующих короткие фрагменты (~300 п.н.), в некоторых линиях (7-2, 7-18, 7-23, 8-6, 8-10) были выявлены изменения в соотношении аллелей. В отличие от контрольных растений с ожидаемыми соотношениями 1:1:1:1 или

2:1:1, у отредактированных растений наблюдали нестандартные соотношения 1:1:1, 2:1, 1:1, а также отсутствие прочтений отдельных аллелей. Использование праймеров, амплифицирующих более длинные фрагменты, выявило протяжённые делеции в линиях 7-2, 7-23, 8-10 (Таблица 1, Рисунок 4), которые затрагивали сайты посадки изначальных праймеров. В линиях 7-18 и 8-6 конкретные мутации не были идентифицированы, однако выявление протяжённых делеций в других линиях позволяет предположить схожий механизм мутаций – наличие протяжённых делеций, которые не были детектированы.

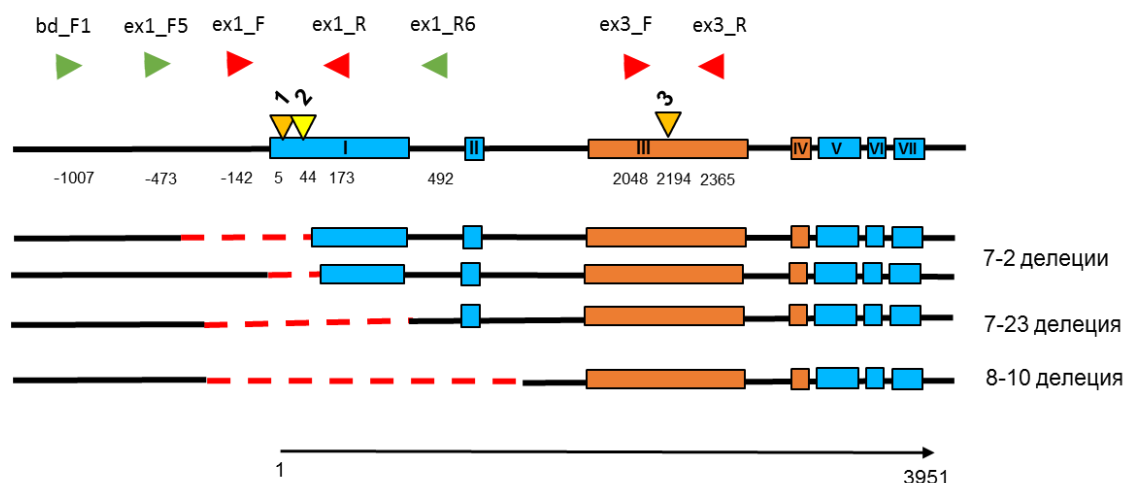


Рисунок 4. Схематичное изображение гена *Pain-1* и протяженных делеций. Синими прямоугольниками отмечены экзоны. Оранжевым выделен гликозилгидролазный домен. Желтыми треугольниками указаны сайты-мишени. Пары праймеров обозначены стрелками, под структурой гена указаны районы их посадки относительно первого нуклеотида. Делеции обозначены красным пунктиром.

Были получены три нетрансгенных генетически отредактированных растения (Таблица 1). Это можно объяснить тем, что при агробактериальной трансформации возможна транзientная экспрессия генетической конструкции (в данном случае – нРНК и Cas9) без её интеграции в геном. Двое из данных растений содержали небольшие мутации только в одной копии гена, что согласуется с данными Банфалви и соавторов (2020), в работе которых нетрансгенные растения имели небольшие делеции, а эффективность мутагенеза была ниже, тогда как у трансгенных растений встречалось больше мутаций, включая более протяжённые делеции.

Анализ структуры мутантных аллелей показал, что 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 1, Рисунок 5).

Линия	Аллель	сайт-мишень1	сайт-мишень2	Предсказанная аминокислотная последовательность
7-2 100% КО	A1(1)	GCCACCC---CCATTCAGTTATGACCGGAAAACTCA	---TCSTCCCGGATCAACCC	МАТPIPVMTKTHPPGSTFRFPPEVP*
	A1(2)	GCCACCC---ACCATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCCCA	---TACACATTCSTCCCGGATCAACCC	Отсутствие белок-кодирующей мРНК
	A2	GCCACCC---ACCATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCCCA	---TACACATTCSTCCCGGATCAACCC	МАТQPFQL*
	A3	---	---	Отсутствие белок-кодирующей мРНК
7-15 50% КО	A1(1)	GCCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---ACATTCTCTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSYDPENSASHIPPGSTRFRFPPEVP*
	A1(2)	GCCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---CACATTCTCTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSYDPENSASHSSRINIPATGSPKSSPAFSSPLSFCFL*
	A2	GCCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---ACATTCTCTCTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSYDPENSASH-TFLPDQPDGHRKSLKIISGIFLSLLLLL...
	A3	GCCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---ACATTCTCTCTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSYDPENSASH-TFLPDQHDGHRKSLKIISGIFLSLLLLL...
7-23 100% КО	A1(1)	GCCACCC---CATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---CACATTCTCTCTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSYDPENSASHIPPGSTRFRFPPEVP*
	A1(2)	GCCACCC---CATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---TACACATTCSTCCCGGATCAACCC	Отсутствие белок-кодирующей мРНК
	A2	GCCACCC---CATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---TACACATTCSTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSRINIPATGSPKSSPAFSSPLSFCFL*
	A3	GCCACCCAGTACCAATTCAGTTATGACCGGAAAACTCCGCTCC	---ACATTCTCTCTCCCGGATCAACCC	МАТQYHSSYDPENSASHQHIPPGSTRFRFPPEIP*

Рисунок 5. Типы мутаций, наблюдаемые в линиях 7-2, 7-15, 7-16, 7-23. РАМ выделены жирным, однонуклеотидные замены выделены желтым. Пунктирной линией обозначены сайты разрезания Cas9. Представлена предполагаемая структура белков, транслирующихся с мутантных аллелей. Красным выделены аминокислоты, либо делеции, отличные от последовательностей дикого типа. Звездочка – стоп кодон, троеточие – окончание белка как в диком типе. Указано количество нокаутных аллелей – четыре (100 % КО, knockout) или два (50 % КО).

Нокаут гена *Pain-1* приводит к снижению содержания редуцирующих сахаров в клубнях и светлой окраске чипсов. Для исследования влияния нокаута гена *Pain-1* на накопление сахаров и пригодность клубней к переработке были выбраны две линии с полным нокаутом (7-2 и 7-23), две линии с нокаутом двух копий гена (7-15 и 7-16), а также контрольная линия.

Растения были выращены на аэропонных установках и получены миниклубни. После хранения миниклубней при температуре 4 °C в течении 90 дней в них была проведена оценка накопления сахаров. В линиях с полным нокаутом (7-2, 7-23) наблюдали 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) также выявлено снижение содержания редуцирующих сахаров (до 50 % от уровня в контрольной линии), при этом в линии 7-15 снижение уровня глюкозы было статистически значимым (Рисунок 6).

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.

Чтобы подтвердить полученные результаты, был проведен повторный эксперимент в условиях, приближенных к полевым. Были получены клубни от трех линий – 7-2, 7-15 и 7-23, а также контрольной линии. Анализ накопления сахаров после 90-дневного хранения клубней при 4 °C вновь показал снижение содержания глюкозы и фруктозы в нокаутных линиях (7-2, 7-15, 7-23) по сравнению с контрольной. Особенно низкий уровень редуцирующих сахаров наблюдался в линии 7-23 (Рисунок 6).

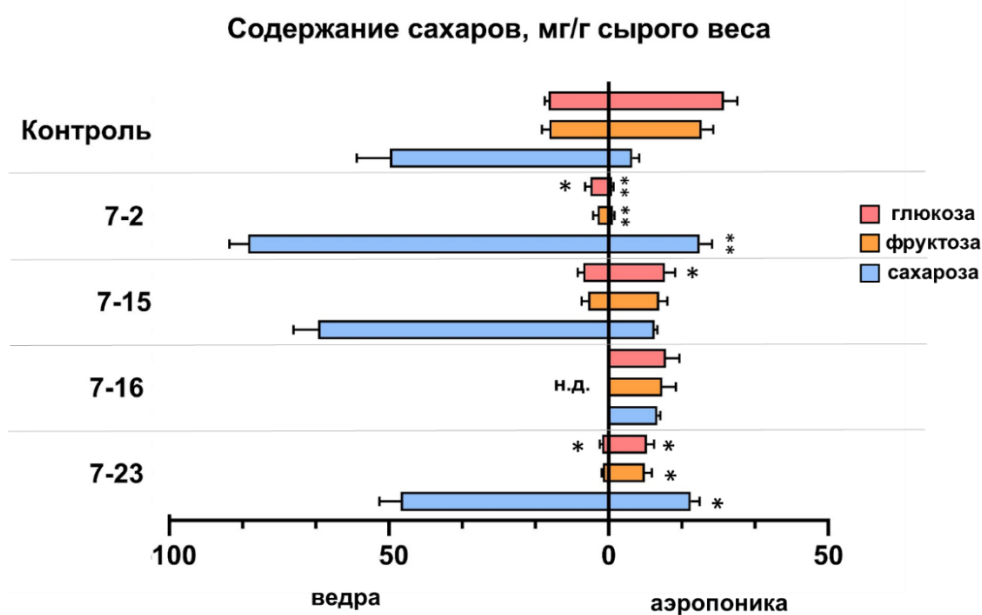
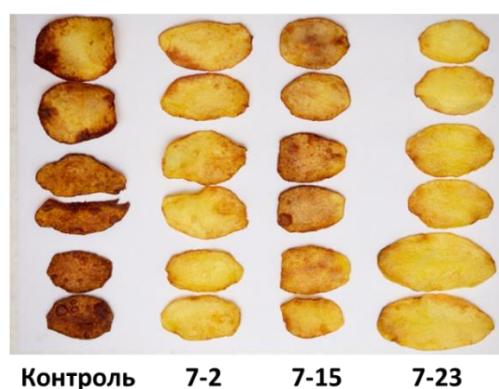
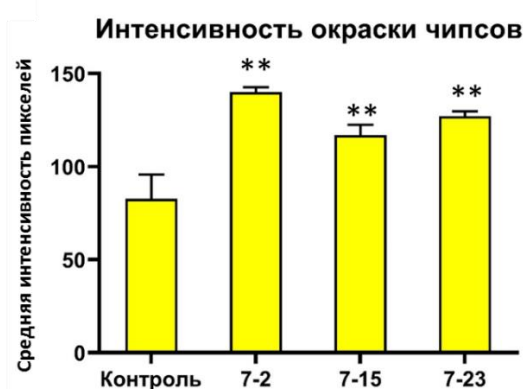


Рисунок 6. Влияние длительности хранения на содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы в клубнях картофеля четырех нокаутных линий и контроля. Каждый столбец соответствует среднему значению, вычисленному по трем биологическим повторам. Приведена ошибка среднего. Значимые различия с контрольной линией отображены звездочками (ANOVA; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$). Линия 7-16 не была получена в ведрах (н.д. – нет данных).

Клубни линий с полным нокаутом (7-2, 7-23), частичным нокаутом (7-15) и контрольной линии были использованы для получения чипсов и оценки их окраски. Чипсы из нокаутных линий, имели более светлую окраску, чем чипсы из контрольной линии (Рисунок 7а). Наблюдения были подтверждены оценкой интенсивности окраски в ImageJ (Рисунок 7б), а также, корреляционный анализ выявил отрицательную зависимость между количеством нокаутных аллелей и интенсивностью потемнения чипсов, $r(22) = -0.93$, $p \leq 0.05$.



а



б

Рисунок 7. Оценка окраски чипсов. (а) Фотографии чипсов, полученных из линий с полным нокаутом гена *Pain-1* (7-2, 7-23), линии с нокаутом половины аллелей (7-15), и контрольной линии. Было проанализировано три клубня каждой линии, представлено по два ломтика 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; **, $p < 0.01$).

Таблица 1. Сводная информация по генотипу и фенотипу полученных мутантных линий. «Отсутствие прочтения аллеля» обозначает аллель, прочтение которого не удалось получить с использованием никаких из разработанных пар праймеров.

Линия	Наличие трансгена	Мутации в каждом из аллелей			Кол-во мутантных аллелей	Кол-во нокаутных аллелей	Фенотип
		Аллель	Сайт-мишень 1	Сайт-мишень 2			
7-2	+	A1(1)	-4	-16	4	4	Уменьшение количества редуцирующих сахаров, до 3-30 % от изначального количества, светлая окраска чипсов.
		A1(2)	-426				
		A2	-2	-1			
		A3	-176				
7-14	+	A1(1)		-5	4	2	Анализ не проводился
		A1(2)		-4			
		A2		-3			
		A3		-3			
7-15, 7-16	+	A1(1)		-5	4	2	Уменьшение количества редуцирующих сахаров, до 50 % от изначального количества, окраска чипсов светлее контроля.
		A1(2)		-4			
		A2		-3			
		A3		-3			
7-18	-	A1		-3	4	2	Анализ не проводился
		A2	Отсутствие прочтения аллеля				
		A3		-5			
7-23	+	A1(1)	-5	-5	4	4	Уменьшение количества редуцирующих сахаров, до 7-30 % от изначального количества, светлая окраска чипсов.
		A1(2)	-590				
		A2	-40				
		A3		-2			
8-4	-	A1(1)		-12	1	0	Анализ не проводился
		A1(2)	wt				
		A2	wt				
		A3	wt				
8-6	+	A1(1)		-2	4	4	Анализ не проводился
		A1(2)	Отсутствие прочтения аллеля				
		A2		-16			
		A3		-5			
8-8	+	A1	-108		4	4	Анализ не проводился
		A2	-30	-12			
		A3		-4			
8-9	-	A1(1)		-3	1	0	Анализ не проводился
		A1(2)	wt				
		A2	wt				
		A3	wt				
8-10	+	A1(1)		+1	4	4	Анализ не проводился
		A1(2)		-2			
		A2	-43				
		A3	-1563				

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 (Abbass *et al.*, 2022), а изменение ее экспрессии влияет на рост и развитие различных видов растений (Tang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2018).

В данной работе не было выявлено значимых различий ростовых параметров (высота растения, средняя длина листа, корня, количество клубней) между контрольной линией и линиями 7-2 и 7-15, за исключением массы клубней у растений, полученных в ведрах, которая в случае нокаутных линий была меньше по сравнению с контролем. Однако при выращивании на аэропонных установках различий между группами по массе клубней не наблюдали. Это позволяет заключить, что мутации в гене вакуолярной инвертазы минимально влияют на ростовые параметры растений.

Был проведен анализ экспрессии генов *Sus4* и *Ninv5* в корнях пробирочных растений и в клубнях после 15-дневного хранения при 4 °C (Рисунок 8). Кодированные ими ферменты сахарозосинтаза и нейтральная инвертаза, соответственно, принимают активное участие в метаболизме сахаров и играют важную роль в росте и развитии растений (Welham *et al.*, 2009; Barratt *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 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 наблюдали (Рисунок 8). Это позволяет сделать предположение, что нокаут гена *Pain-1* не оказывает выраженного влияния на ростовые параметры за счет компенсаторного эффекта данных генов.

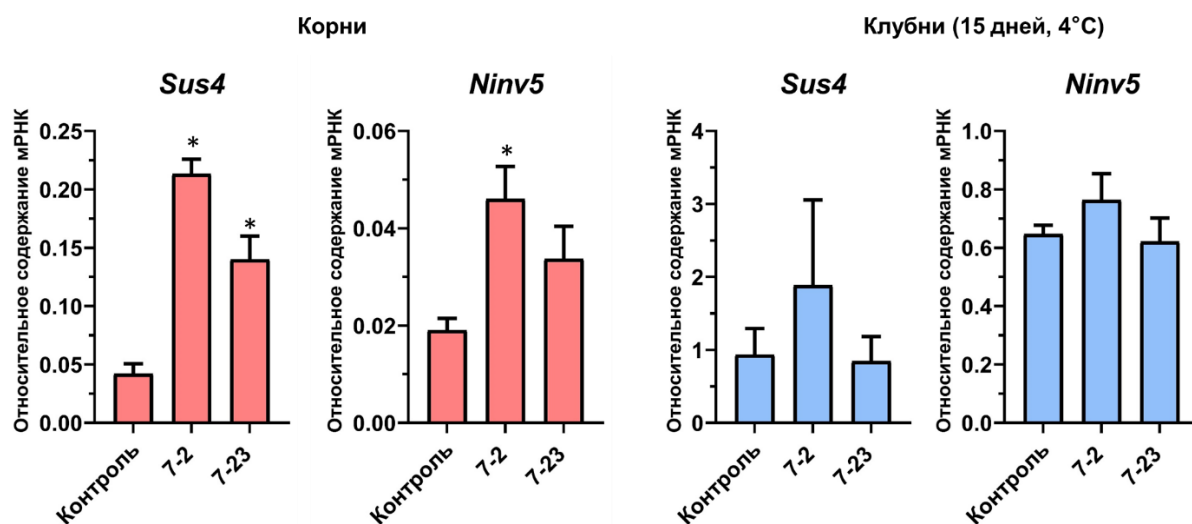


Рисунок 8. Относительный уровень экспрессии генов *Sus4* и *Ninv5* в генетически отредактированных линиях и контрольной. Приведены средние значения и ошибка среднего. Значимые различия с контрольной линией отображены звездочками (ANOVA; *, $p < 0.05$).

Оценка перспектив использования полученных генетических линий в качестве доноров для селекции. Для оценки пригодности полученных линий в качестве доноров в селекционных программах была проведена гибридизация линий

7-15 и 7-23 с сортом Гала, который успешно показал себя в гибридизации с различными сортами. В данных скрещиваниях генетически отредактированные линии использовали в качестве материнских растений. Проведен анализ 27 гибридов поколения F₁, полученных в результате скрещивания с линией 7-15 и 59 гибридов – с линией 7-23. Анализ на присутствие трансгена показал, что 15 из 27 и 30 из 59 гибридов были нетрансгенными. Секвенирование гена вакуолярной инвертазы у нетрансгенных растений выявило, что почти все они содержали два мутантных аллеля, причем мутации полностью соответствовали тем, что присутствовали в родительских линиях 7-15 и 7-23. В некоторых гибридных растениях наблюдали наличие трех или пяти аллелей вакуолярной инвертазы, присутствие двух одинаковых мутантных аллелей. Данные отклонения, вероятно, связаны с нарушением расхождения хромосом во время мейоза, или дупликацией участка, содержащего данный ген, что может происходить у тетраплоидного картофеля (Bethke *et al.*, 2021).

Полученные нетрансгенные гибриды с мутантными аллелями вакуолярной инвертазы демонстрируют, что от встройки трансгена можно избавиться путем гибридизации с другим сортом. Таким образом, линии 7-15 и 7-23, обладающие устойчивостью к холодовому осахариванию, могут быть использованы в качестве доноров для селекции в соответствующих схемах скрещиваний и отборов.

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 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 холодовому 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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 T.E., Kostina N.E., Saboiev I.A., Koloshina K.A., Filipenko E.A., 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., Сабоиев 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.