








doi 10.18699/vjgb-26-61

## Создание растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с инактивированным геном *StPain-1* с помощью CRISPR/Cas9

В.Д. Карлов , М.К. Волков , А.Д. Антипов , Ю.С. Монахова , А.С. Трофимов, Л.Н. Коновалова , А.В. Бабаков, Р.А. Комахин , В.В. Таранов 

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

 v4slvk@yandex.ru

**Аннотация.** Холодовое хранение клубней картофеля для последующей переработки осложнено развитием холодового осахаривания. При пониженной температуре происходит реакция ферментативного гидролиза сахарозы на глюкозу и фруктозу. Как следствие, высокое содержание гексоз негативно сказывается на качестве продуктов переработки картофеля – чипсов и фри, а также способствует образованию нейротоксина и канцерогена акриламида. Гидролиз сахарозы в процессе холодового осахаривания катализирует вакуолярная инвертаза, кодируемая геном *StPain-1*. Ранее было показано, что подавление активности фермента придает картофелю устойчивость к холодовому осахариванию, не снижая при этом питательных качеств клубней. В настоящей работе с помощью CRISPR/Cas9 были созданы растения культурного картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Фрителла с нокаутом гена *StPain-1*. Для редактирования целевого гена были собраны две генетические конструкции на основе вектора pKSE401 (Вектор А и Вектор В), каждая из которых несла две гидовые РНК: на участки в первом (sgRNA-P1.A и sgRNA-P1.B) и третьем (sgRNA-P3.A и sgRNA-P3.B) экзонах. Эффективность редактирования каждой gRNA была охарактеризована с применением высокопроизводительного секвенирования. С конструкцией Вектор А получено 48 трансформантов, среди которых 22 содержали нокаут всех аллелей гена *StPain-1*; с конструкцией Вектор В – 26 трансформантов, из них 10 были с нокаутом. Путем обжарки чипсов из клубней девяти отредактированных растений картофеля сорта Фрителла было наглядно продемонстрировано снижение активности вакуолярной инвертазы. Чипсы из образцов с нокаутом гена *StPain-1* имели более светлую окраску, чем чипсы из контрольного образца без редактирования. По результатам проведенной работы отобрано четыре растения с нокаутом гена *StPain-1*, по два для каждой конструкции, для которых количественная оценка глюкозы, фруктозы и сахарозы, а также измерение уровня мРНК подтвердили инактивацию фермента. Полученные растения обладают повышенной устойчивостью к холодовому осахариванию и являются перспективными источниками нефункциональных аллелей гена *StPain-1* для селекции новых сортов картофеля.

**Ключевые слова:** вакуолярная инвертаза; холодовое осахаривание; сахароза; глюкоза; фруктоза; картофель; CRISPR/Cas9; гидовая РНК

**Для цитирования:** Карлов В.Д., Волков М.К., Антипов А.Д., Монахова Ю.С., Трофимов А.С., Коновалова Л.Н., Бабаков А.В., Комахин Р.А., Таранов В.В. Создание растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с инактивированным геном *StPain-1* с помощью CRISPR/Cas9. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(4):601-611. doi 10.18699/vjgb-26-61

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, FGUM-2026-0008.

## Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with inactivated *StPain-1* gene using CRISPR/Cas9

V.D. Karlov , M.K. Volkov , A.D. Antipov , Yu.S. Monahova , A.S. Trofimov, L.N. Konovalova , A.V. Babakov, R.A. Komakhin , V.V. Taranov 

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

 v4slvk@yandex.ru

**Abstract.** Storage of potato tubers intended for further processing is complicated by their cold-induced sweetening (CIS). Enzymatic hydrolysis of sucrose into glucose and fructose occurs at low temperatures. The resulting high hexose content adversely affects the quality of processed potato products such as chips and fries and promotes the formation of acrylamide, which is a neurotoxin and carcinogen. During CIS, sucrose hydrolysis is catalyzed by vacuolar invertase encoded by the *StPain-1* gene. Previous studies have shown that suppression of the enzyme activity confers potato resistance to CIS without reducing the nutritional value of tubers. In this study, CRISPR/Cas9 technology was used to generate *Solanum tuberosum* L. cv. Fritella plants with a knockout of *StPain-1*. Two binary vectors based on pKSE401 were constructed (Vector A and Vector B), each carrying two gRNAs targeting exon 1 (sgRNA-P1.A or sgRNA-P1.B) and exon 3 (sgRNA-P3.A or sgRNA-P3.B). Editing efficiency with each gRNA was evaluated through next-generation sequencing (NGS). Transformation with Vector A produced 48 transformants, 22 of which carried knockouts in all *StPain-1* alleles. Transformation with Vector B yielded 26 transformants, including 10 plants with complete *StPain-1* knockout. Chips made from tubers of nine edited Fritella plants

demonstrated reduced vacuolar invertase activity: chips from *StPain-1* knockout lines were lighter compared to the non-edited control sample. Quantitative assessment of glucose, fructose, and sucrose levels, as well as *StPain-1* mRNA expression in tubers of four selected transformants (two per vector), confirmed enzyme inactivation. The resulting plants exhibit increased resistance to cold-induced sweetening and can be used as a promising source of nonfunctional *StPain-1* alleles for breeding new potato varieties.

**Key words:** vacuolar invertase; cold-induced sweetening; sucrose; glucose; fructose; potato; CRISPR/Cas9; guide RNA

**For citation:** Karlov V.D., Volkov M.K., Antipov A.D., Monahova Yu.S., Trofimov A.S., Konovalova L.N., Babakov A.V., Komakhin R.A., Taranov V.V. Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with inactivated *StPain-1* gene using CRISPR/Cas9. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(4):601-611. doi 10.18699/vjgb-26-61

## Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из главных продовольственных культур. По объему потребления картофель занимает третье место в мире и второе в России (Osipov, Zeldner, 2023). В странах умеренного климатического пояса урожай картофеля собирают один раз в год. Для сохранения товарных качеств клубни хранят при температурах 4–10 °C (Wustman, Struik, 2007). При таких температурах хранения в клубнях происходит холодное осахаривание – процесс избыточного накопления глюкозы и фруктозы (Zrenner et al., 1996). Клубни с холодным осахариванием становятся непригодными для дальнейшей переработки на чипсы или картофель фри, так как при обжарке приобретают темную окраску и горький вкус (Murata, 2021).

Ключевую роль в развитии холодного осахаривания играет фермент вакуолярная инвертаза ( $\beta$ -fructofuranosidase; EC 3.2.1.26) (Davies et al., 1989; Richardson et al., 1990; Blenkinsop et al., 2003), которая катализирует гидролиз сахарозы на гексозы – глюкозу и фруктозу (Zrenner et al., 1996; Zhu et al., 2024). При высокотемпературной обработке происходит реакция Майяра: гексозы взаимодействуют с аминокислотами белков и свободных аминокислот, приводя к образованию пигментов меланоидинов, а также акриламида – опасного для здоровья человека нейротоксина и канцерогена (Tareke et al., 2002; Siaw et al., 2018).

Содержание глюкозы и фруктозы в значительной степени определяет цвет, вкусовые качества и безопасность продуктов обжарки картофеля (Siaw et al., 2018). Использование для высокотемпературной переработки клубней с содержанием гексоз более 1 мг на 1 г сырой массы клубня (СМ) не рекомендуется ввиду высокого накопления акриламида в конечном продукте (Biedermann-Brem et al., 2003).

Для снижения уровня гексоз и повышения устойчивости клубней картофеля к холодному осахариванию было использовано несколько экспериментальных подходов, направленных на подавление ферментативной активности вакуолярной инвертазы, в частности сверхэкспрессия генов природных ингибиторов вакуолярной инвертазы (Greiner et al., 1999; McKenzie et al., 2013), подавление эндогенной экспрессии гена *StPain-1* методом РНК-сайленсинга (Zrenner et al., 1996; Zhang et al., 2008; Bhaskar et al., 2010; Wu et al., 2011; Zhu et al., 2014; Toufiq et al., 2025), а также инактивация гена *StPain-1* подходами геномного редактирования (Clasen et al., 2016; Yasmeen et al., 2022; Ly et al., 2023; Teper-Bamnolker et al., 2023; Shumbe et al., 2024; Egorova et al., 2025; Massa et al., 2025).

Для селекции сортов картофеля, устойчивых к холодному осахариванию, наиболее перспективным представляется метод геномного редактирования, поскольку он позволяет создать новые нефункциональные варианты гена *StPain-1*. Впоследствии нефункциональные аллели *StPain-1* могут быть переданы в новые сорта картофеля путем скрещивания. Причем достаточно инактивации части аллелей, чтобы в достаточной степени снизить активность фермента, что показано в работе (Yasmeen et al., 2022).

Ранее методами традиционной селекции получены сорта картофеля, предназначенные для переработки на чипсы и фри, такие как Королева Анна, Леди Клэр, Барин, Вымпел и др. При холодном хранении в клубнях этих сортов накапливаются меньшие количества глюкозы и фруктозы. Тем не менее содержания гексоз в них достаточно для снижения качества конечного продукта высокотемпературной обработки (Кулакова et al., 2022; Bruno et al., 2025). Растущий спрос на продукты переработки картофеля требует создания новых сортов с повышенной устойчивостью к холодному осахариванию.

Хотя существуют устойчивые к холодному осахариванию генотипы картофеля, созданные методами геномного редактирования на основе сортов Атлантик, Дезире, Симфония, однако наличие трансгена препятствует свободному использованию таких растений для промышленности в ряде стран ввиду законодательных ограничений (Ly et al., 2023; Teper-Bamnolker et al., 2023; Egorova et al., 2025; Massa et al., 2025).

В настоящей работе главной целью было осуществление нокаута гена вакуолярной инвертазы в растениях картофеля сорта Фрителла с целью создания растений – источников нефункциональных аллелей гена *StPain-1* для селекции новых сортов (Симаков и др., 2017). Выбор сорта был основан на повышенной пригодности клубней такого картофеля к переработке на фри и чипсы. Созданные в рамках работы растения представляются перспективными в качестве доноров для селекции новых нетрансгенных сортов картофеля с повышенной устойчивостью к холодному осахариванию.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Тетраплоидные асептические растения картофеля *S. tuberosum* L. сорта Фрителла (предоставлены ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха», г. Москва) культивировали на питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962) при температуре 20–22 °C,

световом периоде 16 ч день/8 ч ночь и освещенности 80 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Асептические растения были проверены на отсутствие вирусной контаминации с помощью коммерчески доступного набора «ФИТОСКРИН» Potato Virus X, Y, M, L, S, A, PSTVd-PB методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в рамках молекулярно-генетического экспертного исследования № 57/2023 от 26 июля 2023 г. компанией ООО «Синтол» (Москва, Россия). Агробактериальную трансформацию асептических листовых эксплантов растений картофеля выполняли согласно методике, опубликованной нами ранее (Vetchinkina et al., 2016). В теплице растения картофеля выращивали в сосудах при температуре 20–21 °С, световом периоде 16 ч день/8 ч ночь и освещенности 150 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Клубни хранили при температуре 4 °С в темноте.

**Штамм агробактерий.** Для трансформации эксплантов картофеля использовали бактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0.

**Подбор и клонирование gRNA.** Из листьев растений картофеля сорта Фрителла выделяли геномную ДНК с использованием цетилтриметиламмония бромидом (СТАВ). Для подбора gRNA кодирующие последовательности первого и третьего экзонов гена *StPain-1* анализировали с помощью алгоритма CRISPOR (<https://crispor.org>) (Concordet, Haecussler, 2018). В работе использовали четыре gRNA: две подобраны к первому экзону (sgRNA-P1.A и sgRNA-P1.B), две – к третьему экзону (sgRNA-P3.A и sgRNA-P3.B). Последовательность sgRNA-P3.A была взята из публикации (Yasmeen et al., 2022). Нуклеотидные последовательности gRNA были попарно клонированы в бинарный вектор для геномного редактирования rKSE401, согласно рекомендациям (Xing et al., 2014), в результате чего получены конструкции Вектор А (sgRNA-P1.A и sgRNA-P3.A) и Вектор В (sgRNA-P1.B и sgRNA-P3.B).

**Генотипирование трансгенных растений.** Геномную ДНК выделяли из листьев растений репродуктивного поколения T0 с применением цетилтриметиламмония бромида. Участки 1-го и 3-го экзонов гена *StPain-1* амплифицировали с использованием олигонуклеотидов, указанных в табл. S1 Приложения<sup>1</sup>.

Для проведения ПЦР готовили смесь 1× буфер для Taq-полимеразы, 0.2 мМ dNTP, 0.5 мМ каждого праймера, 1.25 ед. Taq ДНК-полимеразы («Евроген», Москва, Россия) и 20 нг геномной ДНК, с конечным объемом 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: 2 мин при 94 °С; затем 30 циклов 10 с при 94 °С, 15 с при 58–62 °С, 40 с при 72 °С; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С. Ампликоны анализировали в 1.5 % агарозном геле и очищали с помощью набора ColGen («Синтол», Москва, Россия). Секвенирование ампликонов осуществляли на платформе Illumina MiSeq в ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии». Качество секвенирования оценивали с помощью программы MultiQC (ver. 1.22.2) (Ewels et al., 2016). Эффективность редактирования це-

левого участка гена для каждого растения определяли в процентах как число прочтений, содержащих мутации, к общему числу прочтений с использованием программы CRISPResso2 (ver. 2.3.1) (Clement et al., 2019).

**Оценка содержания сахаров.** Отбирали 100 мг ткани клубня и гомогенизировали с помощью пестика в 500 мкл воды. Затем водой доводили объем гомогената до 1000 мкл и перемешивали с использованием вортекса. Остатки растительных тканей удаляли после центрифугирования 2 мин при 13 000 g. Для измерения содержания сахаров отбирали 100 мкл экстракта. Количественную оценку содержания глюкозы, фруктозы и сахарозы выполняли с применением коммерчески доступных наборов Enzytec Liquid D-Glucose/D-Fructose и Enzytec Liquid Sucrose/D-Glucose (R-Biopharm, Германия) согласно рекомендации производителя. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы приводится в мг на г сырой массы клубня (мг/г СМ).

**Оценка содержания крахмала.** Фрагмент клубня массой 50 мг гомогенизировали с помощью пестика в 500 мкл смеси диметилсульфоксида с соляной кислотой HCl (соотношение компонентов 4:1 соответственно). Объем суспензии доводили той же смесью до 1.25 мл, перемешивали с использованием вортекса и инкубировали 30 мин при 60 °С. Затем добавляли 2.5 мл ddH<sub>2</sub>O и титровали смесь 5 М раствором NaOH до pH 4–5. Смесь центрифугировали 2 мин при 13 000 g, для анализа отбирали 100 мкл надосадочной жидкости. Количественную оценку проводили с применением коммерчески доступного набора Enzytec Liquid Starch (R-Biopharm) согласно рекомендации производителя. Содержание крахмала приводится в мг/г СМ.

**Экстракция РНК.** Для экстракции РНК отбирали 100 мг ткани клубня и измельчали пестиком в ступке с жидким азотом. Выделение РНК проводили колоночным методом с помощью набора SKYprep RNA Pure Plant Plus Kit (SkyGen, Россия). Проверку качества РНК выполняли методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле.

**Обратная транскрипция.** Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью ревертазы MMLV («Евроген», Россия). Для проведения реакции готовили смесь 1 × First strand buffer, 0.2 мМ dNTP mix, 2 уМ праймера oligo(dT)<sub>15</sub>, 1 мг препарата выделенной РНК, 2 мМ DTT, 100 ед. MMLV-RT с конечным объемом 20 мкл согласно рекомендации производителя. Реакцию проводили 60 мин при 37 °С, а затем 10 мин при 70 °С. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения количественной ПЦР.

**Количественный ПЦР-анализ.** Реакционную смесь готовили с помощью 5 × qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Использованные олигонуклеотиды приведены в табл. S1. Реакция осуществлялась при следующих условиях: 3 мин при 95 °С, затем 50 циклов 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 72 °С. В качестве референсных последовательностей были гены *Tubulin* и *EF-1a* (см. табл. S1) (Nicot et al., 2005; Zhu et al., 2014). Относительную оценку экспрессии гена *StPain-1* рассчитывали методом 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Vandesompele et al., 2002).

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx34.xlsx>

**Жарка чипсов из клубней.** Собранные клубни расте-  
ний вегетативного поколения T0 после двух месяцев хра-  
нения при температуре 4 °C нарезали на ломтики толщи-  
ной примерно 1–2 мм и обжаривали в растительном масле  
в течение 2 мин при 170 °C.

**Статистический анализ.** Все эксперименты проводи-  
лись в трехкратной повторности. Для полученных данных  
выполняли дисперсионный анализ ANOVA. Сравнение  
исследуемых образцов с контролем осуществляли с ис-  
пользованием критерия Даннетта. Для построения диа-  
грамм, отображающих результаты количественной оценки  
сахаров, крахмала и оценки относительной экспрессии,  
рассчитывали средние величины и их стандартные от-  
клонения. Расчеты выполнялись с помощью программы  
GraphPad Prism 8.

## Результаты

### Подбор гидовых РНК для внесения нокаут-мутаций в ген вакуолярной инвертазы *StPain-1*

Ген вакуолярной инвертазы *StPain-1* состоит из 7 экзонов  
и 6 интронов (Abbas et al., 2022). В качестве мишеней для  
редактирования были выбраны первый и третий экзоны  
гена *StPain-1*, поскольку внесение мутаций в 5'-концевую

последовательность гена повышает вероятность нокаута.  
Для подбора gRNA было проведено таргетное секвени-  
рование ампликонов первого и фрагмента третьего экзо-  
нов гена *StPain-1*, полученных с геномной ДНК растения  
картофеля сорта Фрителла. Выравнивание нуклеотидных  
последовательностей ампликонов первого экзона с ре-  
ференсной последовательностью гена *StPain-1* (NCBI:  
HQ110080.1) показало наличие нескольких однонуклео-  
тидных полиморфизмов в 32-, 174- и 288-м положениях  
от старт-кодона, среди которых замена Т на С в 32-м по-  
ложении (с.32Т>С) приводила к аминокислотной замене  
Leu>Pro в трех аллелях из четырех (рис. 1). Нуклеотидные  
последовательности фрагмента 3-го экзона во всех аллелях  
были идентичны референсной (см. рис. 1, а).

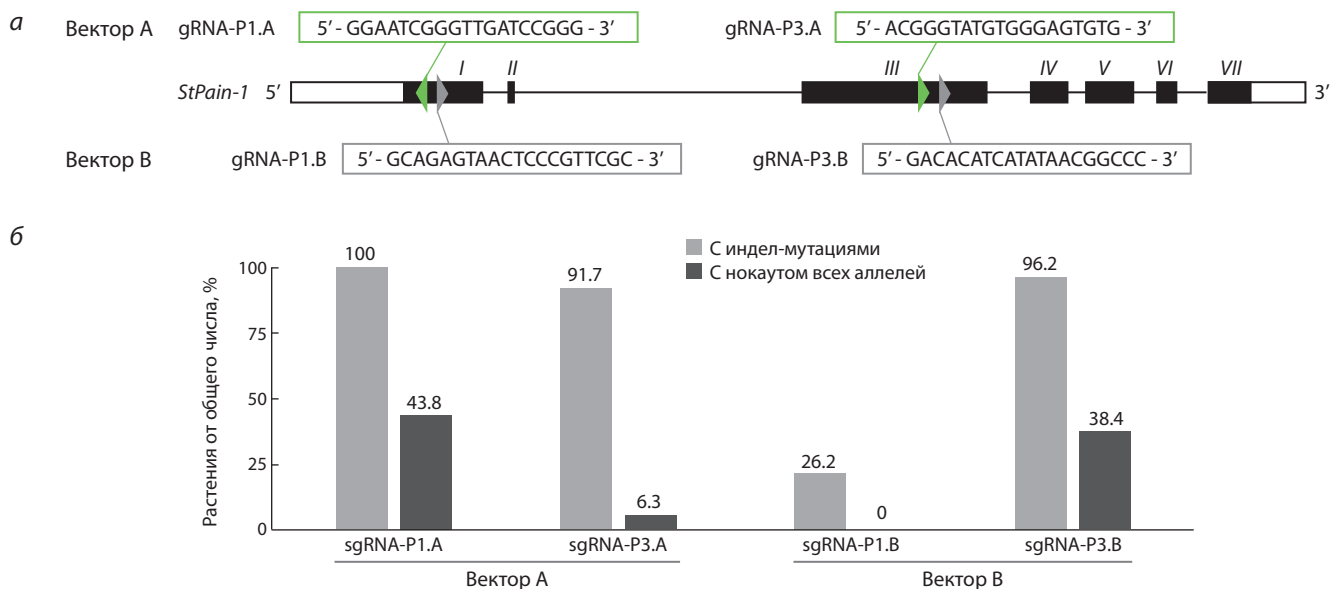
Для редактирования было подобрано четыре гидовые  
РНК к наиболее консервативным участкам гена вакуо-  
лярной инвертазы: две – на первый экзон (sgRNA-P1.A  
и sgRNA-P1.B) и две – на третий экзон (sgRNA-P3.A и  
sgRNA-P3.B) (см. рис. 1, а и рис. 2, а). Последователь-  
ности трех гидовых РНК (sgRNA-P1.A, sgRNA-P1.B и  
sgRNA-P3.B) были выбраны с использованием инстру-  
мента CRISPOR, одна гидовая РНК (sgRNA-P3.A) взята  
из работы (Yasmeen et al., 2022). По две гидовые РНК  
было клонировано в две генетические конструкции, обо-

HQ110080.1	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	HQ110080.1	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele1	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele1	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele2	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele2	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele3	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele3	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
Pain-1_ex1_allele4	ATGGCCACCCAGTACCATTCCAGTTATGACCTGGAAAACTCCGCTCCCATTCACATTC	Pain-1_ex3_allele4	GGACTTTAGAGACCCGACCCTGCTGGACCGGACCCCAAAATGGGCAATGGCTTTTAAAC
HQ110080.1	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	HQ110080.1	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele1	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele1	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele2	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele2	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele3	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele3	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
Pain-1_ex1_allele4	CTCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCTTAAATCATCTCCGGCATTTTC	Pain-1_ex3_allele4	AATCGGGTCTAAGATTGGTAAACCGGTTATGCACTGTTTATGAAACTTCCAACCTCAC
HQ110080.1	CTCTCTCTTTCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCCGATCCTCAACAACCAATCACCG	HQ110080.1	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele1	CTCTCTCTTTCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCCGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele1	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele2	CTCTCTCTTTCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCCGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele2	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele3	CTCTCTCTTTCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCCGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele3	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
Pain-1_ex1_allele4	CTCTCTCTTTCTTTTGGCTTCTGTAGCTCTTTCCGATCCTCAACAACCAATCACCG	Pain-1_ex3_allele4	AAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGCTGATCGGGTTCGGGGTACGGGTATCTGGGAGTG
HQ110080.1	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	HQ110080.1	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACCG
Pain-1_ex1_allele1	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele1	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACCG
Pain-1_ex1_allele2	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele2	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACCG
Pain-1_ex1_allele3	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele3	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACCG
Pain-1_ex1_allele4	GACTTGCAGAGTAACCTCCGTTTCGCGCGGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTC	Pain-1_ex3_allele4	TCTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAACAACCGGGTTGGACACATCATATAACCG
HQ110080.1	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	HQ110080.1	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele1	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele1	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele2	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele2	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele3	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele3	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
Pain-1_ex1_allele4	TCCGATAAGACTTTTGGAGATGCTGCTCAATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGTCCAAT	Pain-1_ex3_allele4	CCCGGGTGAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTTATAGTACAATAAGCAAGATCACTATGC
HQ110080.1	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGTCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	HQ110080.1	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele1	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGTCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele1	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele2	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGTCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele2	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele3	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGTCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele3	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC
Pain-1_ex1_allele4	GCTATGCTTAGCTGGCAAGAAGTCTTACCATTTCACACTCAAAAAAATGGATGAAC	Pain-1_ex3_allele4	TATTGGGACGTATGACTTGACAAGAATAAATGGACACC

6		1	10	20
	HQ110080.1_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele1_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele2_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele3_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		
	Pain-1_ex1_allele4_tr	MATQYHSSYDLENSASHYTF		

**Рис. 1.** Сходство между участками аллелей гена *StPain-1*.

а – выравнивание нуклеотидных последовательностей первого экзона и фрагмента третьего экзона выявленных четырех аллелей гена *StPain-1* на референсную последовательность (Madeira et al., 2024). Выделено: желтым цветом – полиморфизмы; зеленым – участки редактирования конструкцией Вектор А; серым – конструкцией Вектор В; б – трансляция первых 20 кодонов гена *StPain-1* референсной последовательности и последовательности четырех аллелей, обнаруженных в геноме картофеля сорта Фрителла. Полиморфизмы аминокислотных последовательностей аллелей выделены голубым цветом.



**Рис. 2.** Эффективность внесения мутаций с помощью разных гидовых РНК в ген вакуолярной инвертазы *StPain-1* растений картофеля сорта Фрителла.

*a* – схематичное изображение экзон-интронной структуры гена *StPain-1* и расположение гидовых РНК для конструкций Вектор А (выделены зеленым цветом) и Вектор В (выделены серым), стрелками указаны направления гидовых РНК; *б* – доля растений с индел-мутациями (указаны серым) и с нокаут-мутацией во всех аллелях (указаны черным) гена *StPain-1* среди трансформантов. Для конструкции Вектор А  $n = 48$  трансформантов, для конструкции Вектор В  $n = 26$  трансформантов.

значенные как Вектор А (sgRNA-P1.A и sgRNA-P3.A) и Вектор В (sgRNA-P1.B и sgRNA-P3.B) (см. рис. 2, *a*). Одновременное использование двух гидовых РНК в одной генетической конструкции было необходимо, чтобы повысить вероятность нокаута гена в случае низкой эффективности редактирования за счет аддитивного эффекта.

### Эффективность редактирования гена *StPain-1* зависит от выбора gRNA

В результате агробактериальной трансформации листовых эксплантов картофеля получено 48 регенерантов для конструкции Вектор А и 26 – для конструкции Вектор В. Оценка эффективности редактирования проводилась с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Среднее число прочтений составило 1447 при минимальном числе прочтений 128 и максимальном – 4251. Генотипирование трансформантов показало высокую эффективность внесения индел-мутаций обеими генетическими конструкциями (см. рис. 2, *б*).

Наиболее высокой эффективностью внесения мутаций отличились гидовые РНК sgRNA-P1.A и sgRNA-P3.B, создав индел-мутации в 100 и 96.2 % трансформантов соответственно. При этом нокаут всех аллелей гена удалось достичь только в 43.75 % трансформантов с помощью sgRNA-P1.A и в 38.4 % трансформантов – с помощью sgRNA-P3.B. В случае использования sgRNA-P3.A, несмотря на высокую эффективность внесения индел-мутаций (91.7 % трансформантов), нокаут всех аллелей гена *StPain-1* обнаружен только в 6.25 % трансформантов (3 из 48). Самая низкая эффективность внесения индел-мутаций оказалась у sgRNA-P1.B: всего лишь в 26.9 % растений (7 из 26) были детектированы индел-мутации,

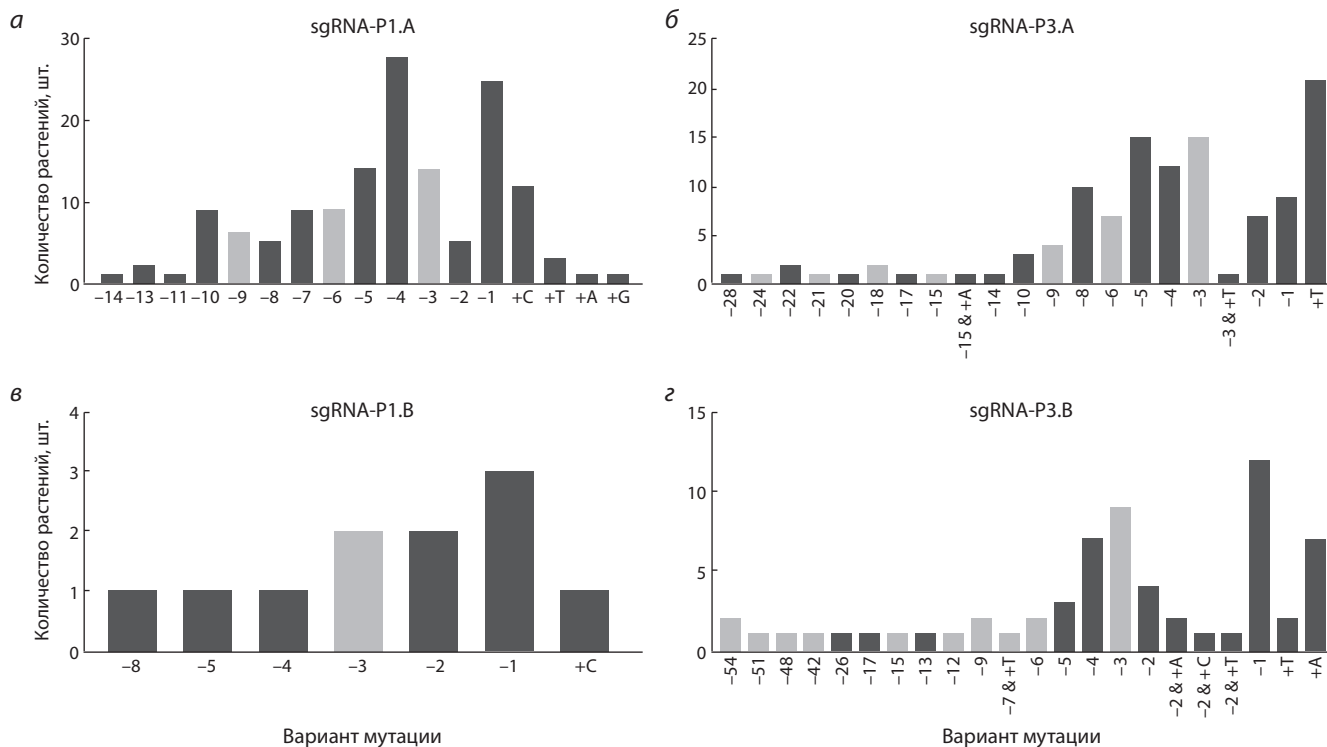
но ни в одном из трансформантов не получен нокаут всех аллелей гена-мишени. В табл. S2 и S3 приведены данные о процентном содержании индел-мутаций и нокаут-мутаций в трансформантах, рассчитанные по результатам NGS.

### Разнообразие мутантных вариантов зависит от участка редактирования

По результатам секвенирования на платформе Illumina было охарактеризовано разнообразие вариантов индел-мутаций для каждой из четырех gRNA при редактировании гена *StPain-1* (рис. 3). Количество вариантов мутаций соотносилось с эффективностью gRNA: наиболее эффективные гидовые РНК генерировали большее разнообразие мутаций. Преобладающее большинство мутаций относилось к делециям 1–10 нуклеотидов.

В результате редактирования гена *StPain-1* с помощью конструкции Вектор А в первом экзоне обнаружено 17 различных вариантов индел-мутаций, среди которых чаще всего встречались делеции 4 нуклеотидов (в 28 растениях) и 1 нуклеотида (в 24 растениях). Максимальный размер делеции составлял 14 нуклеотидов. Три варианта индел-мутаций не приводили к сдвигу открытой рамки считывания – делеции 3, 6 и 9 нуклеотидов (см. рис. 3, *a*). В третьем экзоне обнаружен 21 вариант индел-мутаций, среди которых наиболее распространенными оказались вставка 1 нуклеотида с тиминным основанием (21 растение) и делеции 5 и 3 нуклеотидов (у 15 растений каждая). Максимальный размер делеции в третьем экзоне составил 28 нуклеотидов (см. рис. 3, *б*).

При использовании конструкции Вектор В в первом экзоне обнаружено всего семь вариантов мутаций: делеции 8, 5, 4, 3, 2, 1 нуклеотидов и вставка 1 нуклеотида с



**Рис. 3.** Разнообразие индел-мутаций, вызывающих (черные столбцы) и не вызывающих (серые столбцы) сдвиг открытой рамки считывания в гене *StPain-1* у трансформантов картофеля сорта Фрителла, созданных с использованием конструкции Вектор А с направляющими sgRNA-P1.A (а) и sgRNA-P3.A (б) или конструкции Вектор В с направляющими sgRNA-P1.B (в) и sgRNA-P3.B (г).

цитозинового основанием (см. рис. 3, в). В третьем экзоне разнообразие индел-мутаций оказалось самым большим – 22 варианта. Наиболее распространенной была делеция 1 нуклеотида (12 растений). Максимальный размер делеции составил 54 нуклеотида (два растения). Почти половина детектированных индел-мутаций оказались делециями кратного трем числа нуклеотидов (см. рис. 3, г). Отсюда можно заключить, что высокая эффективность gRNA сопровождается генерацией большого разнообразия индел-мутаций. Причем разнообразие мутаций определяется конкретным сайтом редактирования. Большинство индел-мутаций приходится на делеции от 1 до 10 нуклеотидов (подробнее см. Приложение).

### Оценка растений с нокаутом гена *StPain-1* на устойчивость к холодному осахариванию

Для фенотипической оценки устойчивости трансформантов к холодному осахариванию с помощью обжарки чипсов были взяты клубни девяти растений, полученных с помощью Вектора А (5-2, 11-2, 12-1, 13-2, 26-1, 36-1, 45-1, 49-1, 57-2), и клубни пяти растений, полученных с помощью Вектора В (16-1, 20-1, 42-2, 50-2, 56-2). В качестве контроля были клубни трансгенного растения 27-3 (Вектор В), не содержащего индел-мутаций ни в одном из аллелей гена *StPain-1* (см. таблицу).

Результаты обжарки чипсов показали, что для образцов с редактированием гена вакуолярной инвертазы свойственна более светлая окраска, чем для контрольного образца. У образца 11-2 (Вектор А) наблюдалось явное расхож-

дение генотипа с фенотипом: при подтвержденном NGS нокауте чипсы практически полностью имеют темную окраску (подробнее см. в разделе «Обсуждение»).

В эксперимент также было взято несколько образцов от растений, содержащих одновременно редактированные аллели и аллели дикого типа (26-1 – Вектор А и 20-1, 50-2 – Вектор В). Цвет чипсов образца 50-2 был заметно светлее контрольных, но темнее, чем у образцов с нокаутом. В то же время образцам 26-1 и 20-1 оказалось достаточно инактивации части аллелей для сохранения светлой окраски чипсов. Подобный эффект ранее показан в статье (Yasmeen et al., 2022): при инактивации двух из четырех аллелей гена *StPain-1* редактированный картофель приобретал устойчивость к холодному осахариванию (подробнее см. в разделе «Обсуждение»). Для следующих экспериментов по измерению уровня мРНК *StPain-1*, а также количественной оценке сахаров, крахмала были отобраны клубни четырех растений: 36-1 и 45-1 – Вектор А, 16-1 и 56-2 – Вектор В.

Внесение индел-мутаций в кодирующую последовательность гена приводит к синтезу aberrантной мРНК, которая уничтожается клеточными системами контроля качества мРНК. При измерении экспрессии *StPain-1* в клубнях отобранных растений с нокаутом целевого гена наблюдалось значительное снижение уровня соответствующей мРНК относительно генов *Tubulin* и *EF-1a* (рис. 4, а).

Для подтверждения инактивации фермента вакуолярной инвертазы была проведена количественная оценка содержания сахаров и крахмала. Содержание глюкозы в образ-

Характеристика трансформантов картофеля сорта Фрителла по содержанию нокаут-мутаций в экзонах 1 и 3 гена *StPain-1* и реакции редуцирующих сахаров на обжарку ломтиков клубней

Конструкция	Образец	Прочтения с нокаут-мутациями, %		Чипсы
		в экзоне 1	в экзоне 3	
Вектор А	<u>27-3</u>	0	0	
	5-2	100	29	
	11-2	100	86	
	12-1	100	75	
	13-2	100	100	
	26-1	46	4	
	<u>36-1</u>	100	100	
	<u>45-1</u>	100	50	
	49-1	100	0	
	57-2	100	28	
Вектор В	<u>16-1</u>	20	100	
	20-1	0	47.5	
	42-2	0	100	
	50-2	24	64.7	
	<u>56-2</u>	0	100	

Примечание. Подчеркиванием отмечены образцы, взятые для оценки количества крахмала, сахаров, а также уровня мРНК *StPain-1*.

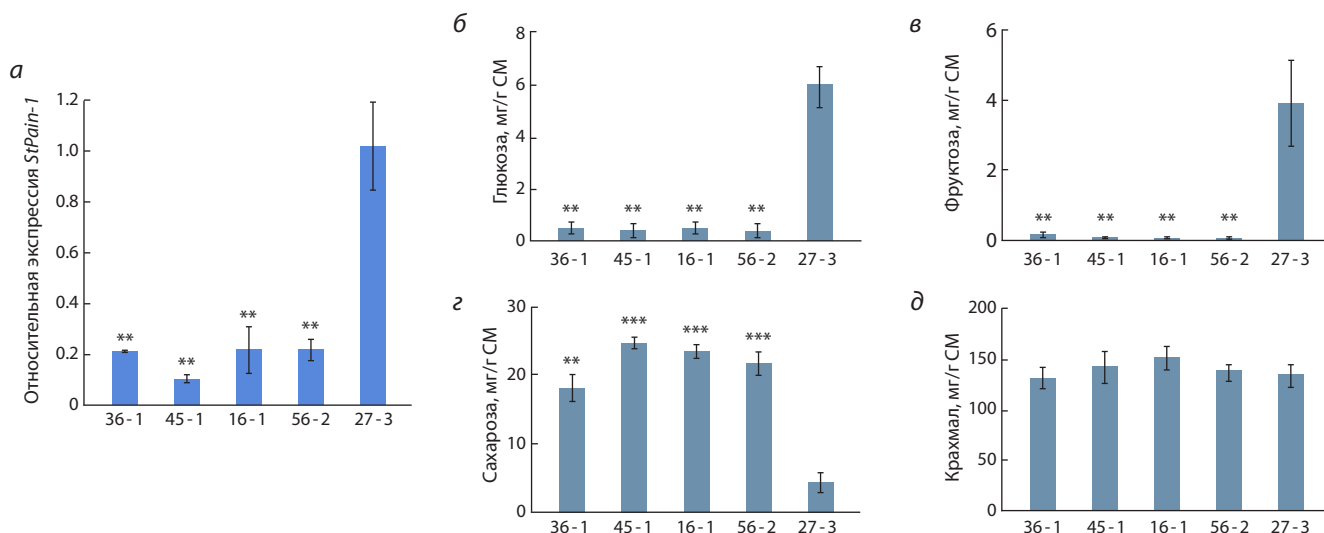
цах с нокаутом находилось в диапазоне от 0.2 до 0.6 мг/г сырой массы клубня (см. рис. 4, б), а фруктозы – от 0.1 до 0.2 мг/г СМ (см. рис. 4, в) и было достоверно ниже, чем в контрольном образце. Напротив, содержание сахарозы в образцах с нокаутом гена *StPain-1* колебалось в диапазоне от 18.1 до 24.5 мг/г СМ и оказалось значительно выше, чем в контроле (см. рис. 4, г). Как и ожидалось, при измерении содержания крахмала в клубнях различий между образцами не наблюдалось (см. рис. 4, д).

Таким образом, в результате работы созданы и охарактеризованы растения картофеля сорта Фрителла с нокаутом гена *StPain-1*. Содержание гексоз в клубнях полученных растений не превышало рекомендуемой величины в 1 мг гексоз на 1 г СМ (Biedermann-Brem et al., 2003). Создан-

ные растения являются перспективным источником нефункциональных аллелей гена *StPain-1* для селекции новых сортов картофеля, устойчивых к холодовому осахариванию.

### Обсуждение

Современные подходы геномного редактирования позволили значительно ускорить селекцию новых сортов сельскохозяйственных культур. На сегодняшний день приоритетными задачами современной селекции считаются улучшение питательных качеств, повышение устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам для обеспечения более рационального использования природных ресурсов и снижения экономических издержек для сельского хозяй-



**Рис. 4.** Оценка содержания углеводов и уровня мРНК гена *StPain-1* в клубнях некоторых трансформантов картофеля сорта Фрителла с нокаутом всех аллелей гена *StPain-1*.

а – сравнение уровня мРНК гена *StPain-1* относительно референсных генов картофеля *Tubulin* и *EF-1a* методом ПЦР в реальном времени; б – содержание глюкозы; в – содержание фруктозы; г – содержание сахарозы; д – содержание крахмала, измеренные в мг/г сырой массы клубня (СМ); На диаграммах отражены средние значения ( $n = 3$ ) и их стандартные ошибки. Достоверность различий, рассчитанная с использованием критерия Даннетта, обозначена звездочкой: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

ства. Настоящая работа посвящена одной из экономически значимых проблем пищевой промышленности – холодовому осахариванию клубней картофеля, вызванному работой фермента вакуолярной инвертазы.

Для инактивации гена вакуолярной инвертазы *StPain-1* в работе использован инструмент CRISPR/Cas9. На основе вектора pKSE401 (Xing et al., 2014) сделаны две конструкции, содержащие по паре гидовых РНК (Вектор А и Вектор В). В каждой конструкции одна gRNA нацелена на участок первого экзона, а другая – на участок третьего экзона. Обе генетические конструкции показали высокую эффективность редактирования гена-мишени. Согласно данным NGS, в результате применения конструкции Вектор А все 48 регенерантов содержали индел-мутации хотя бы в одном аллеле целевого гена, а при использовании конструкции Вектор В – 25 из 26 регенерантов. Причем с помощью конструкции Вектор А удалось добиться нокаута всех аллелей гена *StPain-1* в 22 из 48 регенерантов, а с помощью конструкции Вектор В – в 10 из 26 регенерантов. Высокая эффективность редактирования гена-мишени в значительной степени обеспечивалась одной из двух клонированных gRNA: для Вектора А – sgRNA-P1.A, для Вектора В – sgRNA-P3.B.

Наша работа наглядно демонстрирует критическую важность выбора гидовой РНК при редактировании генов сельскохозяйственных культур. С помощью таргетного секвенирования ампликонов проведено сравнение эффективностей внесения индел-мутаций четырех гидовых РНК. Последовательности sgRNA-P1.A, sgRNA-P1.B и sgRNA-P3.B были выбраны исходя из высоких прогнозируемых эффективностей и минимального количества потенциальных off-target мишеней, согласно алгоритмам CRISPR и CRISPR-P (Lei et al., 2014; Concordet, Haussler, 2018).

Последовательность sgRNA-P3.A была взята из статьи (Yasmeen et al., 2022). На практике sgRNA-P1.B показала самую низкую эффективность редактирования: индел-мутации обнаружены только в 7 растениях из 26, однако мутации содержались не во всех аллелях. Действительно, финальный результат редактирования генома растений зависит от целого ряда факторов, таких как способ доставки редактирующей системы, стабильность комплекса gRNA-Cas9, пространственная организация генома и доступность целевого участка комплексу gRNA-Cas9, работа систем репарации генома и др. А.А. Egorova с коллегами (2025) при редактировании гена *StPain-1* использовали три гидовых РНК внутри одной конструкции – gRNA1, gRNA2, gRNA3, две из которых были направлены на участки в первом экзоне (gRNA1 и gRNA2). При секвенировании полученной выборки растений оказалось, что редактирование с помощью gRNA2 идет гораздо эффективнее, чем с помощью gRNA1. В то же время gRNA3, несмотря на высокую прогнозируемую активность, на опыте показала самую низкую эффективность среди этих гидовых РНК. Более того, эффективность редактирования может зависеть от сорта. Так, при использовании одних и тех же гидовых РНК эффективность нокаута гена *StPain-1* в сорте Атлантик оказалась выше, чем в сорте Спунта (Massa et al., 2025).

Система CRISPR/Cas9 известна своей высокой специфичностью, однако при редактировании организмов нередко возникает off-target эффект – внесение индел-мутаций в нецелевые участки генома с частично комплементарной gRNA последовательностью. Дополнительные мутации, вызванные off-target эффектом, могут влиять на фенотип растения. Очевидно, что у двух различных гидовых РНК набор off-target мишеней отличается. Поэтому в полученных с применением разных гидовых РНК растениях

будет разный набор off-target мутаций. Таким образом, использование двух генетических конструкций в данной работе позволило учесть возможное влияние off-target эффекта при оценке фенотипа редактированных растений.

В результате редактирования гена *StPain-1* наблюдалось большое разнообразие мутантных аллелей, большинство из которых содержали делеции 1, 3 или 4 нуклеотидов. Следует отметить некоторые отличия в формировании индел-мутаций как при редактировании в разных экзонах, так и при редактировании в разных участках одного экзона. Размер экзона 1 составляет 361 п.о., экзона 3 – 860 п.о. Максимальный размер делеции в первом экзоне не превышал 14 нуклеотидов, в то время как в третьем экзоне максимальный размер делеции доходил до 54 нуклеотидов. При inserции одного нуклеотида в первом экзоне чаще включался нуклеотид «С», а в третьем экзоне – «Т». Также в третьем экзоне чаще формировались мутации, не приводящие к сдвигу рамки считывания (мутации, кратные 3).

Отличия при редактировании разных участков внутри одного экзона заключались преимущественно в эффективности создания индел-мутаций. Эффективность нокаута всех аллелей гидовой РНК sgRNA-P3.A оказалась меньше в 6 раз, чем гидовой РНК sgRNA-P3.B, при том что расстояние между сайтами разрезания нуклеазы Cas9 всего в 61 п.о. Еще большей оказалась разница в эффективности нокаута всех аллелей у гидовых РНК sgRNA-P1.A (43.8 %) и sgRNA-P1.B (0 %), дистанция между которыми 137 п.о.

Для наглядного подтверждения инактивации гена вакуолярной инвертазы в регенерантах картофеля сорта Фрителла был проведен опыт по обжарке чипсов. Среди 14 отобранных регенерантов, полученных с помощью Вектора А и Вектора В, нокаут всех аллелей гена показан у 11 растений. При обжарке ломтиков клубней из растений с нокаутом у клубней одного образца, 11 - 2 (Вектор А), наблюдалась темная окраска чипсов с небольшими светлыми сегментами. Такой эффект может объясняться рядом возможных причин. К примеру, темный цвет чипсов, вероятно, вызванный высоким содержанием гексоз в клубне, мог оказаться индивидуальной реакцией трансформанта, спровоцированной изменениями в метаболизме сахарозы вследствие нокаута гена *StPain-1*. Накопление гексоз в таком случае могло быть вызвано другими ферментами, способными гидролизовать сахарозу (например, сахарозосинтаза или гомологичные инвертазы).

В то же время при агробактериальной трансформации растений происходит включение Т-ДНК в геном растения, причем нередко в эухроматиновые участки. Такие модификации генома могут приводить в том числе к изменениям экспрессии отдельных генов, что могло спровоцировать преобразования в метаболизме сахарозы. Причиной наблюдаемого эффекта также могла служить химерность растения-регенеранта. Наличие в одном растении клеток с разными генотипами – известное явление, возникающее при агробактериальной трансформации каллуса. Яркой демонстрацией такого эффекта может быть растение, полученное при инактивации гена *StLEAFY* (Lebedeva et al., 2022).

Еще три растения-регенеранта, из клубней которых были обжарены чипсы, сохранили один или два аллеля дикого типа (26-1, 20-1, 50-2). Однако темный цвет наблюдался только на чипсах образца 50-2. Действительно, пониженное содержание редуцирующих сахаров наблюдалось ранее при нокауте гена *StPain-1* (Yasmeen et al., 2022).

Можно предложить несколько гипотез, объясняющих данное явление. Тетраплоидный картофель известен высокой степенью гетерозиготности. Разные аллели гена *StPain-1* могут содержать нуклеотидные полиморфизмы, влияющие на ферментативную активность вакуолярной инвертазы (Draffehn et al., 2010; Слугина, Кочиева, 2014). В связи с этим инактивация аллеля, кодирующего наиболее активный фермент, может приводить к значительному снижению холододового осахаривания и наоборот. В то же время на скорость реакции может влиять количество фермента, определяемое клеточными системами регуляции экспрессии генов. Причем чаще всего синтез мРНК происходит в аллель-специфичной манере (Pham et al., 2017). Поэтому внесение мутаций в активно транскрибируемые аллели гена *StPain-1* также могло повлиять на содержание глюкозы и фруктозы в клубнях исследуемых трансформантов.

## Заключение

На основе картофеля сорта Фрителла российской селекции, предназначенного для промышленной переработки, методом геномного редактирования получены растения с повышенной устойчивостью к холододовому осахариванию. Эти формы растений перспективны для использования в селекции новых сортов картофеля и служат донором нефункциональных аллелей гена вакуолярной инвертазы.

## Список литературы / References

- Кулакова А.В., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов  $\beta$ -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):507-514. doi 10.18699/VJGB-22-62
- [Kulakova A.V., Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of  $\beta$ -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2022;26(6):507-514. doi 10.18699/VJGB-22-62]
- Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Митюшкин А.В., Журавлев А.А. Сортовые ресурсы картофеля для целевого выращивания. *Картофель и овощи*. 2017;11:24-26
- [Simakov E.A., Anisimov B.V., Mityushkin A.V., Zhuravlev A.A. Varietal resources for intended potato growing. *Kartofel' i Ovoshchi = Potato and Vegetables*. 2017;11:24-26 (in Russian)]
- Слугина М.А., Кочиева Е.З. Вариативность фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у сортов картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/1):718-723
- [Slugina M.A., Kochieva E.Z. Variability of a fragment of the acid vacuolar invertase *Pain-1* gene in potato cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2014;18(4/1):718-723 (in Russian)]
- Abbas A., Shah A.N., Shah A.A., Nadeem M.A., Alsaleh A., Javed T., Alotaibi S.S., Abdelsalam N.R. Genome-wide analysis of invertase gene family, and expression profiling under abiotic stress conditions

- in potato. *Biology (Basel)*. 2022;11(4):539. doi 10.3390/biology11040539
- Bhaskar P.B., Wu L., Busse J.S., Whitty B.R., Hamernik A.J., Jansky S.H., Buell C.R., Bethke P.C., Jiang J. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiol*. 2010;154(2):939-948. doi 10.1104/pp.110.162545
- Biedermann-Brem S., Noti A., Grob K., Imhof D., Bazzocco D., Pfefferle A. How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking? *Eur Food Res Technol*. 2003;217:369-373. doi 10.1007/s00217-003-0779-z
- Blenkinsop R.W., Yada R.Y., Marangoni A.G. Metabolic control of low-temperature sweetening in potato tubers during postharvest storage. *Hortic Rev*. 2003;30:317-354. doi 10.1002/9780470650837.ch8
- Bruno F., Hein I., Jorat M.E., Ledbetter M., Harrower B., Davies B., Sturrock K., Montague G., Knott M., McNamara G., Fiore A. Effects of agronomical practices on potato growth, nutritional profile, and suitability for frying. *J Sci Food Agric*. 2025;105(7):3983-3992. doi 10.1002/jsfa.14147
- Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebe R., ... Haun W., Baltes N.J., Mathis L., Voytas D.F., Zhang F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J*. 2016;14:169-176. doi 10.1111/pbi.12370
- Clement K., Rees H., Canver M.C., Gehrke J.M., Farouni R., Hsu J.Y., Cole M.A., Liu D.R., Joung J.K., Bauer D.E., Pinello L. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol*. 2019;37(3):224-226. doi 10.1038/s41587-019-0032-3
- Concordet J.-P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W242-W245. doi 10.1093/nar/gky354
- Davies H.V., Jefferies R.A., Scobie L. Hexose accumulation in cold-stored tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.): the effects of water stress. *J Plant Physiol*. 1989;134(4):471-475. doi 10.1016/S0176-1617(89)80012-4
- Draffehn A.M., Meller S., Li L., Gebhardt C. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. *BMC Plant Biol*. 2010;10:271. doi 10.1186/1471-2229-10-271
- Egorova A.A., Zykova 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*. 2025;68:1571-1593. doi 10.1007/s11540-024-09800-6
- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32:3047-3048. doi 10.1093/bioinformatics/btw354
- Greiner S., Rausch T., Sonnewald U., Herbers K. Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nat Biotechnol*. 1999;17:708-711. doi 10.1038/10924
- Lebedeva M., Komakhin R., Konovalova L., Ivanova L., Taranov V., Monakhova Y., Babakov A., Klepikova A., Zlobin N. Development of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with *StLEAFY* knockout. *Planta*. 2022;256:116. doi 10.1007/s00425-022-04032-9
- Lei Y., Lu L., Liu H.-Y., Li S., Xing F., Chen L.-L. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*. 2014;7(9):1494-1496. doi 10.1093/mp/ssu044
- Ly D.N.P., Iqbal S., Fosu-Nyarko J., Milroy S., Jones M.G. Multiplex CRISPR-Cas9 gene-editing can deliver potato cultivars with reduced browning and acrylamide. *Plants (Basel)*. 2023;12(2):379. doi 10.3390/plants12020379
- Madeira F., Madhusoodanan N., Lee J., Eusebi A., Niewielska A., Tivey A.R.N., Lopez R., Butcher S. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):W521-W525. doi 10.1093/nar/gkae241
- Massa G.A., Décima Oneto C.A., González M.N., Poulsen Hornum A., Arizmendi A., Sucar S., Divito S.B., Feingold S.E. CRISPR/Cas9-mediated development of potato varieties with long-term cold storage and bruising resistance. *Biology (Basel)*. 2025;14(4):445. doi 10.3390/biology14040445
- McKenzie M.J., Chen R.K.Y., Harris J.C., Ashworth M.J., Brummell D.A. Post-translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold-induced sweetening of potato tubers. *Plant Cell Environ*. 2013;36(1):176-185. doi 10.1111/j.1365-3040.2012.02565.x
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3):473-497. doi 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murata M. Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. *Glycoconj J*. 2021;38:283-292. doi 10.1007/s10719-020-09943-x
- Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*. 2005;56(421):2907-2914. doi 10.1093/jxb/eri285
- Osipov V.S., Zeldner A.G. Potato production in Russia and Ukraine. In: Çalişkan M.E., Bakhsh A., Jabran K. (Eds) *Potato Production Worldwide*. Academic Press, 2023;341-363. doi 10.1016/B978-0-12-822925-5.00023-2
- Pham G.M., Newton L., Wiegert-Rininger K., Vaillancourt B., Douches D.S., Buell C.R. Extensive genome heterogeneity leads to preferential allele expression and copy number-dependent expression in cultivated potato. *Plant J*. 2017;92(4):624-637. doi 10.1111/tbj.13706
- Richardson D.L., Davies H.V., Ross H.A., Mackay G.R. Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. *J Exp Bot*. 1990;41(1):95-99. doi 10.1093/jxb/41.1.95
- Shumbe L., Soares E., Muhovski Y., Smit I., Vanderschuren H. Mutation of the *Vinv* 5' UTR regulatory region reduces acrylamide levels in processed potato to reach EU food-safety standards. *Plant Biotechnol J*. 2024;22(10):2738-2740. doi 10.1111/pbi.14400
- Siaw M.O., Ofosu I.W., Lutterodt H.E., Ankar-Brewoo G.M. Acrylamide exposure and risks in most frequently consumed foods in a total diet study. *Am J Food Sci Technol*. 2018;6(4):123-137. doi 10.12691/ajfst-6-4-1
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem*. 2002;50(17):4998-5006. doi 10.1021/jf020302f
- Teper-Bamnolker P., Roitman M., Katar O., Peleg N., Aruchamy K., Suher S., Doron-Faigenboim A., ... Fält A., Volpin H., Hofvander P., Gal-On A., Eshel D. An alternative pathway to plant cold tolerance in the absence of vacuolar invertase activity. *Plant J*. 2023;113(2):327-341. doi 10.1111/tbj.16049
- Toufiq N., Adeyinka O.S., Khan A., Shafique S., Jahan N., Bhatti M.U., Khalid R., Naeem A., Abbas Q., Shafique S., Tabassum B. Multiple transgenic strategies positively regulate cold-induced sweetening in low temperature stored potato tubers. *Potato Res*. 2025;68:69-88. doi 10.1007/s11540-024-09733-0
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):research0034. doi 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vetchinkina E.M., Komakhina V.V., Vysotskii D.A., Zaitsev D.V., Smirnov A.N., Babakov A.V., Komakhin R.A. Expression of plant antimicrobial peptide *pro-SmAMP2* gene increases resistance of transgenic potato plants to *Alternaria* and *Fusarium* pathogens. *Russ J Genet*. 2016;52:939-951. doi 10.1134/S1022795416080147
- Wu L., Bhaskar P.B., Busse J.S., Zhang R., Bethke P.C., Jiang J. Developing cold-chipping potato varieties by silencing the vacuolar

- invertase gene. *Crop Sci.* 2011;51(3):981-990. doi 10.2135/cropsci.2010.08.0473
- Wustman R., Struik P.C. The canon of potato science: 35. Seed and ware potato storage. *Potato Res.* 2007;50:351-355. doi 10.1007/s11540-008-9079-0
- Xing H.-L., Dong L., Wang Z.-P., Zhang H.-Y., Han C.-Y., Liu B., Wang X.-C., Chen Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 2014;14:327. doi 10.1186/s12870-014-0327-y
- Yasmeen A., Shakoor S., Azam S., Bakhsh A., Shahid N., Latif A., Shahid A.A., Husnain T., Rao A.Q. CRISPR/Cas-mediated knock-down of vacuolar invertase gene expression lowers the cold-induced sweetening in potatoes. *Planta.* 2022;256:107. doi 10.1007/s00425-022-04022-x
- Zhang C., Xie C., Song B., Liu X., Liu J. RNAi effects on regulation of endogenous acid invertase activity in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Chin J Agric Biotechnol.* 2008;5(2):107-112. doi 10.1017/S1479236208002192
- Zhu X., Richael C., Chamberlain P., Busse J.S., Bussan A.J., Jiang J., Bethke P.C. Vacuolar invertase gene silencing in potato (*Solanum tuberosum* L.) improves processing quality by decreasing the frequency of sugar-end defects. *PLoS One.* 2014;9:e93381. doi 10.1371/journal.pone.0093381
- Zhu X., Chen A., Butler N.M., Zeng Z., Xin H., Wang L., Lv Z., Eshel D., Douches D.S., Jiang J. Molecular dissection of an intronic enhancer governing cold-induced expression of the vacuolar invertase gene in potato. *Plant Cell.* 2024;36(5):1985-1999. doi 10.1093/plcell/koae050
- Zrenner R., Schöler K., Sonnwald U. Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta.* 1996;198(2):246-252. doi 10.1007/BF00206250

---

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2025. После доработки 16.02.2026. Принята к публикации 17.02.2026.