

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НОКАУТА ГЕНА *PDS* У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

¹К.И. Сайфуллина, ^{1,2}Е.В. Михайлова

¹Уфимский государственный нефтяной технический университет,
Российская Федерация, 450064, Уфа, ул. Космонавтов, 1, E-mail: sayf_kamilla@mail.ru

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
Российская Федерация, 450054, Уфа, Проспект октября 71, E-mail: mikhele@list.ru

Резюме

Ген *PDS*, кодирующий фермент фитоендесатуразу (*phytoene desaturase*), играет важную роль в синтезе каротиноидов в растительных клетках и представляет большой интерес для геномного редактирования в качестве селективного маркера. Нокаут (инактивация) данного гена приводит к потере пигментации (альбинизму) и карликовости, что позволяет выявлять растения с отредактированным геномом визуально. Было накоплено значительное количество данных о роли гена *PDS* в синтезе каротиноидов, а также о его применении в геномном редактировании как селективного маркера. На сегодняшний день нокаут и функциональное исследование гена *PDS* проведены у множества видов растений, включая представителей семейств Паслёновые, Тыквенные, Банановые, Бобовые, Сложноцветные и т.д., тогда как у ряда других экономически значимых культур роль этого гена остается не валидированной, что подчёркивает сохраняющуюся актуальность его изучения для совершенствования методов геномного редактирования.

Ключевые слова: фитоендесатураза, *PDS*, CRISPR/Cas9, альбинизм, нокаут, геномное редактирование, модельный ген

Цитирование: Сайфуллина К.И., Михайлова Е.В. Характерные особенности нокаута гена *PDS* у различных видов растений. *Biomics*. 2025. 17(4). 282-297. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-25

© Авторы, К.И. Сайфуллина, Е.В. Михайлова, 2025

CHARACTERISTIC ASPECTS OF THE *PDS* GENE KNOCKOUT IN DIFFERENT PLANT SPECIES

¹K.I. Saifullina, ^{1,2}E.V. Mikhaylova

¹Ufa State Petroleum University
1 Kosmonavtov St., Ufa, 450064, Russian Federation, E-mail: sayf_kamilla@mail.ru
²Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS,
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation, E-mail: mikhele@list.ru

Resume

The *PDS* gene encoding the enzyme phytoene desaturase plays an important role in the synthesis of carotenoids in plant cells and is of great interest in genome editing as a selective marker. Knockout (inactivation) of this gene leads to loss of pigmentation (albinism) and dwarfism, which allows for visual selection of edited plants. A significant amount of data has been accumulated on the role of the *PDS* gene in carotenoid synthesis, as well as on its use in genome editing as a selective marker. To date, the knockout and functional study of the *PDS* gene has been carried out in many plant species, including representatives of the *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Musaceae*, *Fabaceae*, *Asteraceae* families, etc., while in a number of other economically significant crops the role of this gene is not validated yet, which underscores the importance of its further analysis to improve genetic editing methods.

Keywords: phytoene desaturase, *PDS*, CRISPR/Cas9, albinism, knockout, genome editing, model gene

Citation: Saifullina K.I., Mikhaylova E.V. Characteristic aspects of the *PDS* gene knockout in different plant species. *Biomics*. 2025. 17(4). 282-297. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-25 (In Russian)

© The Authors, K.I.Saifullina, E.V. Mikhaylova, 2025

Введение

Каротиноиды представляют собой критически важные компоненты фотосинтетического аппарата растений, выполняющие две ключевые функции: во-первых, они участвуют в процессе поглощения света для последующей фотохимической реакции, а во-вторых, обеспечивают защиту фотосистем путем рассеивания излишней световой энергии [Wang et al., 2009]. Помимо каротиноидов, обуславливающих яркую желтую, оранжевую и красную окраску растений, существуют эпоксикаротиноиды, а также виолаксантин и неоксантин. Данные соединения выступают в качестве предшественников абсцизовой кислоты, являющейся растительным гормоном, и витамина А,

играющего ключевую роль в питании как человека, так и животных [Efremov et al., 2023].

История методов нокаута генов у растений начинается с 1990-х годов, когда были впервые клонированы и охарактеризованы ключевые гены, такие как *PDS*, кодирующий фермент фитоендесатуразу. Фитоендесатураза представляет собой фермент, который ограничивает скорость синтеза каротиноидов. Этот фермент катализирует двухэтапную реакцию десатурации, в ходе которой фитоеен преобразуется в окрашенный ζ-каротин [Bartley, Scolnik, 1995]. Процесс образования каротиноидов в растительных клетках, представлен на рисунке 1.

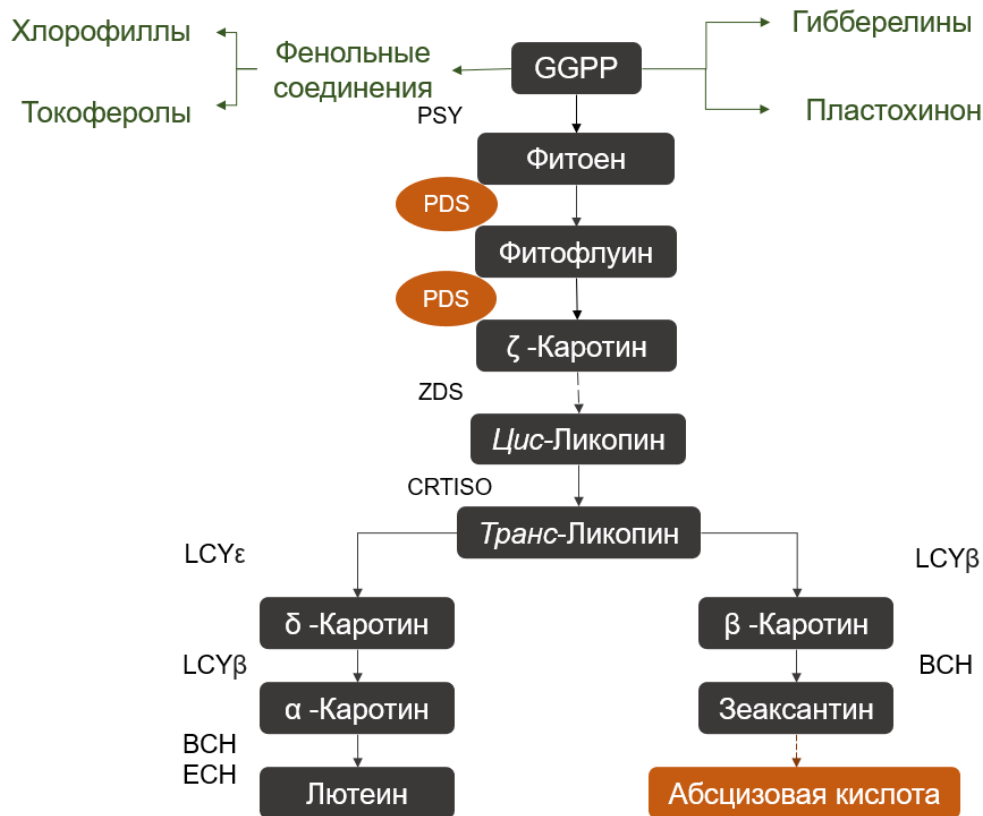


Рисунок 1. Схема синтеза каротиноидов в растениях. Ферментативные реакции на схеме обозначены стрелками, а пунктирные линии указывают на последовательность нескольких ферментативных стадий. Ферменты: фитоеенсинтаза (*PSY*), фитоендесатураза (*PDS*), ζ-каротиндесатураза (*ZDS*), ликопин-β-циклаза (*LCYβ*), ликопин-ε-циклаза (*LCYε*), каротиноидизомераза (*CRTISO*), β-гидроксилаза (*BCH*), ε-гидроксилаза (*ECH*) и диоксигеназа, расщепляющая каротиноиды (*CCD*). Соединения: геранилгеранилдифосфат (*GGPP*).

Figure 1. Scheme of carotenoid synthesis in plants. The enzymatic reactions in the diagram are indicated by arrows, and the dotted lines indicate the sequence of several enzymatic steps. Enzymes: phytoensynthase (*PSY*), phytoendesaturase (*PDS*), ζ-carotene desaturase (*ZDS*), lycopene β-cyclase (*LCYβ*), lycopene ε-cyclase (*LCYε*), carotenoid isomerase (*CRTISO*), β-hydroxylase (*BCH*), ε-hydroxylase (*ECH*) and carotenoid cleavage dioxygenase (*CCD*). Compounds: geranylgeranyl diphosphate (*GGPP*).

Ген *PDS* широко используется в геномном редактировании CRISPR/Cas в качестве модельного гена [Awasthi et al., 2021]. Нарушение функции гена *PDS* приводит к угнетению синтеза хлорофилла, каротиноидов и гиббереллина, что обуславливает фотообесцвечивание, альбинизм и карликовость у растений [Vaia et al., 2022].

Впервые этот ген был использован в качестве мишени для антисенс-РНК, которые комплементарны мРНК гена-мишени, тем самым препятствуют трансляции или вызывают её деградацию. В конце 1980-х годов была открыта косупрессия, при которой дополнительная копия гена в правильной ориентации приводит к образованию двухцепочечной РНК, запускающей РНК-интерференцию и деградацию всех копий мРНК [Naroli et al., 1990]. Эти методы предшествовали развитию технологий CRISPR и VIGS, которые позволили более точно и эффективно отключать растительные гены.

Тем не менее, не у всех растений данный ген был нокаутирован и даже идентифицирован. Также существует значительное количество растительных видов, геномы которых остаются несеквенированными.

В данном обзоре обобщены результаты исследований, посвященных нокауту гена *PDS* у различных видов растений. Рассмотрены особенности альбиносного фенотипа, роста и развития растений с отредактированным геномом, а также их способность к размножению.

Развитие методов нокаута гена *PDS*

Группа исследователей Hirschberg et al. (1991) клонировала и охарактеризовала ген *PDS* у цианобактерий (*Synechococcus*) и растений, показав, что они кодируют фермент, катализирующий десатурацию фитоена. Ген *PDS* был одним из первых охарактеризованных генов в пути биосинтеза каротиноидов у растений. Его функция, заключающаяся в превращении фитоена в ζ -каротин, была установлена в начале 1990-х годов [Bartley et al., 1991].

В 1994-1995 годах были опубликованы работы по подавлению экспрессии *PDS* в томате и табаке методами косупрессии и антисенс-РНК. В результате исследований мутированные растения проявляли альбинизм, что подтвердило роль *PDS* в биосинтезе каротиноидов [Kumagai et al., 1995].

Метод антисенс-технологии был основан на встройке в клетку копии гена в обратной ориентации (антисенс-РНК). При транскрипции образуется антисенс-РНК, комплементарная мРНК гена-мишени. Антисенс-РНК связывается с мРНК, препятствуя её трансляции или вызывая деградацию. В результате

снижается количество белка и проявляется фенотип, аналогичный частичному нокауту гена.

При использовании метода косупрессии происходит встройка дополнительной копии гена в правильной ориентации. Механизм заключается в образовании двухцепочечной РНК, запускающей РНК-интерференцию и приводящей к деградации всех копий мРНК, включая эндогенные и трансгенные. Этот эффект впервые был обнаружен на петунии в конце 1980-х годов, когда попытка усилить пигментацию привела к побелению лепестков [Naroli et al., 1990].

В исследовании гена *PDS* также используется вирус-индуцированный сайленсинг генов вирусами (VIGS), представляющий собой широко используемый инструмент высокопроизводительного анализа биологических функций генов-мишеней в растениях благодаря его способности быстро разрушать мРНК гена-мишени. VIGS впервые был успешно применен именно для подавления гена *PDS* в листьях табака, что привело к видимому обесцвечиванию [Ratcliff et al., 2001].

В настоящее время система CRISPR/Cas9 является одним из самых важных инструментов для внесения специфических мутаций в гены различных растений. Она состоит из белка *Cas* и гидовой РНК (gRNA), которые обычно доставляются в составе плазмиды методом агробактериальной трансформации. Однако требуется отработка технологии на каждом новом объекте, для чего наиболее удобно использовать модельный ген, позволяющий легко обнаруживать отредактированные растения. Одни из первых исследований с применением технологии CRISPR/Cas9 для нокаутирования гена *PDS* были проведены на растениях томата (*Solanum lycopersicum*) и табака (*Nicotiana tabacum*). Современные исследования показывают активное и успешное применение системы CRISPR/Cas9 для геномного редактирования с использованием гена *PDS* в различных сельскохозяйственных культурах, таких как томат, табак, картофель, горох, папайя, кофе, нут, хмель, лук, тыква и др. [Wang et al., 2009; Siddappa et al., 2023; Li et al., 2023; Brewer, Chambers, 2022; Casarin et al., 2022; Gupta et al., 2023; Mainkar et al., 2023; Thakur, Meru, 2023].

Особенности нокаута гена *PDS* у растений семейства Пасленовые (*Solanaceae*)

Томат и табак относятся к семейству *Solanaceae*. Томат (*S. lycopersicum*) – одна из самых широко культивируемых овощных культур с ежегодным производством около 180 миллионов тонн. Селекция томатов направлена на повышение продуктивности, устойчивости к стрессам и

улучшение питательной ценности. Томат также служит моделью для исследований в генетике и устойчивости к патогенам благодаря коротким циклам развития и способности к самоопылению [Komatsu et al., 2020]. В ходе исследования Naing et al. [2019] с применением VIGS томаты с нокаутированным геном *PDS* не достигали зрелости, оставаясь бледно-желтыми, пока плоды не становились мягкими. В то же время контрольные томаты созревали естественным образом, и размягчение у них наступало примерно на 10 дней раньше, чем у томатов с подавленной активностью *PDS*.

Wang et al. [2009] в своих исследованиях предположили, что подавление гена *PDS* у растений табака (*Nicotiana tabacum*) привело к снижению уровня хлорофилла, однако вопреки гипотезам, корреляция между концентрацией хлорофилла и функционированием фотосинтетических белков не была подтверждена.

С помощью технологии VIGS удалось подавить экспрессию *PDS* у различных видов семейства пасленовых, таких как томаты и перец чили [Liu et al., 2002; Chung et al., 2004]. При подавлении гена *PDS* у томатов наблюдалось обесцвечивание верхних листьев [Liu et al., 2002]. В случае с перцем при подавлении генов *PDS* также наблюдалось появление фенотипов с обесцвеченными листьями через 2 недели после инокуляции [Chung et al., 2004]. Однако метод VIGS не дает возможности объективно оценить влияние нокаута гена на фенотип и способность растения к размножению, поскольку на эти параметры может оказывать влияние также и заражение вирусом. Поэтому результаты геномного редактирования более информативны для оценки влияния нокаута гена на жизнедеятельность растения.

В рамках исследований Nezhdanova et al. [2023] ген *PDS* был инактивирован в геноме табака *N. tabacum* сорта Samsun с использованием технологии CRISPR/Cas9. В результате были получены девять трансгенных линий, на листьях которых были обнаружены мозаичные участки со сниженной пигментацией. Растения с сильным обесцвечиванием листьев оказались нежизнеспособными. Мозаичная пигментация свидетельствовала о частичном нокаутировании гена, что является характерной особенностью CRISPR/Cas9-редактирования при применении агробактериальной трансформации растений. Именно мозаичность обеспечила выживаемость регенерантов, в отличие от растений с практически полностью белыми листьями, что подчеркивает жизненно важную роль гена *PDS* для роста и развития растения.

Nicotiana benthamiana – это дикорастущий вид табака, который применяется для биосинтеза

различных природных соединений, таких как алкалоиды, лигнаны, беталаины и терпеноиды. Высокая восприимчивость данного растения к агробактериям и вирусам обуславливает его широкое применение в биотехнологии для экспрессии трансгенов, что позволяет осуществлять производство рекомбинантных белков [Donini, Marusic, 2019]. В ходе исследования Komatsu et al. [2020] с использованием гидовой РНК были генетически отредактированы два ортолога гена *PDS* у *N. benthamiana*. Мутации в гене *PDS* привели к фенотипическим изменениям, проявляющимся в виде альбинизма у растений томата и *N. benthamiana*. Мутации, вызванные геномным редактированием, передались следующему поколению. В случае с томатами на неселективной среде было получено 12 растений с альбинизмом, одно из которых содержало целевую мутацию в гене *SIPDS1*.

В исследовании Siddappa et al. [2023] использовалась технология CRISPR/Cas9 для редактирования гена *PDS* в популярном индийском сорте картофеля (*Solanum tuberosum*) Kufri Chipsona-I. В результате проведенных экспериментов было установлено, что 81% тестируемых трансгенных растений демонстрировали альбинизм как в условиях культивирования *in vitro*, так и в тепличных условиях. Делеционные мутации были обнаружены в гене *StPDS* у отредактированных растений, и эффективность мутаций в 72% для gRNA1 и gRNA2 были выявлены с помощью секвенирования по Сэнгеру.

В исследовании Upadhyay et al. [2013] экспрессия gRNA и гена *Cas9* в листьях *Nicotiana benthamiana* в возрасте 3–4 недель осуществлялась методом агроинфильтрации, по методике Vos et al. [2006]. Через четыре дня после процедуры поражённый участок выделялся для дальнейшего анализа ДНК и РНК. В результате редактирования во всех исследованных образцах были обнаружены инсерции-делеции. Для генетической трансформации растений *N. benthamiana* использовался штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Интересно, что частота мутаций у пшеницы оказалась значительно выше по сравнению с *N. benthamiana*.

Phad et al. [2024] поставили перед собой задачу модифицировать геном баклажана (*Solanum melongena*), создав растения с нокаутированным геном фитоендесагуразы (*SmPDS*). Для этого они использовали технологию CRISPR/Cas9. Отбор трансформированных эксплантов осуществлялся на основе устойчивости к канамицину. В результате фенотипического анализа были выявлены три типа регенерированных растений: альбиносы, химерные растения и зелёные растения без редактирования, которые выращивались на среде с канамицином вместе с нетрансформированными растениями дикого

типа. Эффективность агробактериальной трансформации составила 71%. Фенотипический анализ показал, что 57 растений продемонстрировали альбинизм, в то время как 10 растений имели частичное побеление. Оставшиеся 18 растений сохранили полностью зеленую окраску, несмотря на культивирование на среде, содержащей канамицин, что указывало на отсутствие целевой мутации несмотря на успешную трансформацию. Эффективность нокаута системой CRISPR/Cas9 составила 67%. Растения-альбиносы характеризовались замедленным ростом, карликовостью и уменьшенной площадью листовой поверхности по сравнению с контрольными растениями. Анализ с использованием фермента T7 эндонуклеазы подтвердил наличие мутаций, индуцированных системой CRISPR/Cas9 в гене *SmpDS*. Для определения генотипа растений по гомозиготности мутантного аллеля была применена методика ПЦР с использованием трех праймеров. Результаты анализа показали, что все исследованные растения с фенотипом альбиноса являются гомозиготными по мутантному аллелю.

Исследования Bulle et al. [2024] показали, что у 62,5% трансформированных растений перца чили (*Capsicum annuum L.*) проявился как альбинизм, так и химеризм (частичное побеление). Гомозиготные мутантные растения с альбинизмом, выращенные *in vitro*, отличались замедленным развитием. Альбиносы были чувствительны к свету и плохо выживали в тепличных условиях. В то же время растения с частичным побелением адаптировались и успешно росли в почве. У перца ген *PDS* играл ключевую роль не только в синтезе каротиноидов. Также было установлено, что нарушение функции гена *PDS* приводило к дефициту гиббереллинов, а также вызывало фотообесцвечивание, альбинизм и карликовость. В линиях перца с нокаутом гена *PDS* наблюдалось снижение уровня основных фотосинтетических пигментов (хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов).

Особенности нокаута гена *PDS* у представителей семейства Тыквенные (*Cucurbitaceae*)

Технология CRISPR/Cas9 была опробована на тыкве (*Cucurbita pepo*) авторами Thakur и Meru [2023] посредством нокаута гена *PDS* методом биобаллистики. Эффективность трансформации семядольных узлов тыквы сорта Black Beauty составила 4,5%, и все полученные трансгенные растения демонстрировали фенотип альбиносов. Нокаут гена *CpPDS* позволил осуществлять визуальный отбор трансгенных растений уже через 6–8 недель после проведения трансформации благодаря выраженному фенотипу. Секвенирование по Сэнгеру

выявило делеции в области мишени CpPDS-gRNA1 (одно-, двух- и трехнуклеотидные делеции). В то же время, в области CpPDS-gRNA2 мутации зафиксированы не были.

Еще одним исследованием нокаута гена *PDS* является работа Tian et al. [2017], где в качестве объекта был выбран арбуз (*Citrullus lanatus*). Для повышения эффективности агробактериальной трансформации и тестирования потенциала множественных gRNA применяли конструкцию PHSE3, содержащую две gRNA, направленные на два участка гена *PDS*. После трансформации примерно 960 фрагментов семядолей было получено 16 трансгенных линий. Анализ продуктов ПЦР с использованием рестрикционных ферментов показал, что обе мишени были успешно отредактированы во всех 16 линиях. Для проверки возможности получения гомозигот в поколении T0 и определения типов мутаций, случайным образом были отобраны два растения-альбиноса (линии 10 и 14) и одно мозаичное растение (линия 3) для проведения секвенирования по методу Сэнгера. В результате линия 10 оказалась гомозиготной с делецией 7 п.н. и вставкой 1 п.н., линия 14 была гетерозиготной по обоим мишеням с делециями 17 п.н. и 5 п.н., линия 3 по мишени 1 – гетерозиготной, а по мишени 2 проявляла химеризм. В результате редактирования генома были получены трансгенные растения арбуза с мутациями в гене *CIPDS*. Все растения с альбинизмом оказались нежизнеспособными, что свидетельствует о летальности гена *CIPDS* для арбузов.

Nooghvorst, López-Cristoffanini и Nogués [2019] в своей работе исследовали нокаут гена фитоендесатуразы (*CmpDS*) в дыне (*Cucumis melo*) с использованием технологии CRISPR/Cas9. Ген *PDS* был выбран в качестве мишени для геномного редактирования с использованием двух gRNA, нацеленных на экзоны 1 и 2. Рекомбинантная конструкция (*pHSE-CmpDS*), включающая как гидовые РНК, так и ген белка *Cas9*, была использована для трансформации протопластов с помощью полиэтиленгликоля. В результате анализа протопластов были выявлены мутации, индуцированные обеими gRNA. Далее была проведена трансформация семядольных эксплантов с использованием агробактерий, что привело к успешному получению альбиносов и химер. Секвенирование методом Сэнгера показало частоту мутаций на уровне 42–45%. В отредактированных растениях и протопластах дыни большинство мутаций представляли собой однонуклеотидные замены (91%), за которыми следовали инсерции (7%) и делеции (2%). При изменении функции гена *CmpDS* у растений проявлялись фенотипические признаки: альбинизм и карликовость. У альбиносов была сильно

уменьшена площадь листьев, а рост составлял менее 0,5 см, и они также не могли размножаться *in vitro*.

Особенности нокаута гена *PDS* у ягодных культур

В рамках исследования Ntui et al. [2019] был разработан эффективный протокол редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 для бананов и плантанов на примере гена *PDS*. Конструкция CRISPR/Cas9, содержащая две гидовых РНК, была введена в эмбрионные клеточные суспензионные культуры банана (*Musa acuminata*) сорта "Sukali Ndiizi" и плантана (*Musa paradisiaca*) сорта "Gonja Manjaya" путем агробактериальной трансформации. У регенератов были обнаружены альбинизм и химеризм, указывающие на мутации в целевых участках, нарушающие функцию гена *PDS*. Большинство мутантных растений (52/77 для "Sukali Ndiizi" и 16/17 для "Gonja Manjaya") были альбиносами. Секвенирование целевых участков подтвердило наличие делеции во всех 18 проанализированных образцах, продемонстрировав 100% эффективность мутации у обоих сортов. Несколько случаев появления альбиносов у обоих сортов было обусловлено гомозиготными мутациями.

В исследовании Luo et al. [2025] с помощью технологии CRISPR/Cas9 был выполнен нокаут генов *PDS* (*AcPDS1* и *AcPDS2*) у киви (*Actinidia chinensis*). Рекombинантная плазмида *pHSE401-AcPDS* с двумя кассетами гидовых РНК, *Cas9* и гигромициновым маркером была введена в экспланты методом агробактериальной трансформации. После пары недель культивирования начали появляться регенеранты с уменьшенными листьями, характеризующимися альбинизмом или частичным побелением. Рост альбиносов был значительно медленнее по сравнению с дикими формами и сопровождался карликовостью, характеризующейся задержкой в развитии. В результате из 150 трансформированных черешков получилось 16 регенерантов, из которых 13 были ПЦР-положительными. Таким образом, эффективность трансформации составила 81,25%. Эффективность редактирования была оценена путем анализа положительных трансгенных линий на наличие мутаций в гене *AcPDS* с помощью секвенирования. В четырех исследованных линиях были обнаружены замены или делеции нуклеотидов в целевых участках, что свидетельствовало о частоте мутаций 23,07%. Линия L10 характеризовалась гетерозиготным редактированием с заменой основания А на G, которая вызвала замену аминокислоты треонина на аланин и проявилась в виде мозаичного альбинозного фенотипа. Линия L13 подверглась биаллельному редактированию, где произошла замена основания С на Т и делеция А, что вызвало сдвиг рамки считывания и образование преждевременного стоп-

кодона, что привело к полному альбинозному фенотипу. В линиях L5 и L6 наблюдались однонуклеотидные замены, что привело к формированию бледно-зеленых фенотипов.

В исследовании Wilson et al. [2019] технология CRISPR/Cas9 была использована для нокаута гена *PDS* в клубнике (*Fragaria vesca*) диплоидного сорта "Hawaii 4" (*Fragaria vesca* ssp. *vesca*) и октоплоидного "Calypso" (*Fragaria* × *ananassa*). В ходе исследования установлено, что 62% трансгенных линий сорта "Hawaii 4" и 45% линий сорта "Calypso" демонстрировали альбинизм. Обесцвеченные побеги формировались либо непосредственно из каллуса, либо в виде пазушных побегов от пестрых побегов. Для анализа мутагенных эффектов были исследованы две группы трансгенных линий. В первой группе, содержащей линии pAtU6-26, процентное соотношение альбиносов составило 53% (25 из 47 линий) для сорта "Hawaii 4" и 50% (19 из 38 линий) для сорта "Calypso". Во второй группе, включающей линии с промотором *F. vesca* U6III, соответствующие значения были 88% (67 из 76 линий) для "Hawaii 4" и 38% (6 из 16 линий) для "Calypso". На основе полученных результатов был сделан вывод о том, что промотор *F. vesca* U6III обладает более высокой эффективностью для индуцирования мутагенеза у сорта "Hawaii 4".

В работе Ren et al. [2021] изучали эффективность CRISPR/Cas9 технологии путем нокаута гена *PDS* у винограда (*Vitis vinifera* L.). В исследовании применяли следующие промоторы: VvU3 (VvU3.1 и VvU3.2), VvU6 (VvU6.1 и VvU6.2) и UBQ2. Были сконструированы векторы CRISPR/Cas9 на основе вектора pCAMBIA2300. Промотор UBQ2 использовали для экспрессии Cas9, а промоторы VvU3/U6 – для экспрессии sgRNA, нацеленной на ген *PDS*. Затем векторы ввели в эмбрионные клетки винограда с помощью агробактериальной трансформации. Результаты показали, что частота мутаций VvU6.1-PDS (34,48%, 10/29) и VvU6.2-PDS (43,24%, 16/37) была выше, чем у AtU6-PDS (23,53%, 4/17). Использование промоторов VvU3/U6 и UBQ2 показало высокую эффективность редактирования винограда. Нокаут гена *PDS* привел к нарушению синтеза каротиноидов и, как следствие, к альбинизму.

Vaia et al. [2022] для нокаута гена *PDS* использовали технологию CRISPR/Cas9 с агробактериальной трансформацией на высокорослой голубике (*Vaccinium corymbosum* L.). Для нокаута гена *VcPDS* были разработаны две специфические гидовые РНК. Несмотря на низкую эффективность редактирования (23,8%), удалось получить альбиносы и образцы с частичным побелением, у которых наблюдались зелёные участки или антоциановые включения.

Другим успешным примером нокаута гена *PDS* с помощью CRISPR/Cas9 является модификация папайи (*Carica papaya L.*), реализованная Brewer и Chambers [2022]. В результате трансформации было получено 73 стабильно трансформированные линии, из которых 59 линий (81%) продемонстрировали полный альбинизм. Это свидетельствует о том, что редактирование гена *SpPDS* привело к нарушению синтеза хлорофилла в папайе. Для анализа генетических изменений, произошедших в целевой области гена *PDS*, проведено генотипирование десяти экспериментальных линий, одной нетрансформированной контрольной линии и одной линии, трансформированной вектором отрицательного контроля рAC0026, не содержащим конструкции гидовых РНК. Сравнительный анализ результатов секвенирования по методу Сэнгера выявил различные генетические модификации в растениях, трансформированных конструкцией рAC0025. Были обнаружены вставки длиной до 415 п.н., инверсии, крупные делеции между сайтами-мишенями гидовых РНК и множественные мелкие делеции. Наиболее распространёнными оказались крупные делеции между сайтами, на которые нацелены гидовые РНК. Альбиносные растения демонстрировали признаки аномального развития: у них были короткие стебли и листья, которые не раскрывались полностью.

Нокаут гена *PDS* у злаковых и бобовых растений

Протокол, описанный Uradhyau et al. [2013], описывает редактирование генома пшеницы (*Triticum aestivum*) с помощью технологии CRISPR/Cas9. Мутагенез был направлен на гены инозитолоксигеназы (*INOX*) и фитоендесатуразы (*PDS*) с использованием клеточной суспензионной культуры пшеницы, а также на ген *PDS* в листьях суспензионных клеток пшеницы, полученных из незрелых эмбрионов. Частота мутаций у пшеницы оказалась выше по сравнению с таковой у *N. benthamiana*. Четыре области генов *INOX* и *PDS* были подвергнуты редактированию, после чего для каждого случая трансформации анализировалось не менее 75 клонов. Частота мутаций у пшеницы оказалась выше по сравнению с таковой у *N. benthamiana*. В различных протоспейсерах пшеницы наблюдались мутации с частотой 18–22%. Были выявлены как делеции, так и инсерции.

В экспериментах Vanakar et al. [2020] при редактировании гена *PDS* риса (*Oryza sativa*) нуклеазой LbCas12a получено десять каллусных линий: LbCas12a1, -2, -3, -9, -13, -18, -22, -23, -30 и -34. Все мутации представляли собой делеции разного размера. У пяти линий (LbCas12a-1, -2, -13, -22 и -23) произошло биаллельное редактирование. Эти линии имели бесцветный каллус вместо типичного бледно-

желтого. В LbCas12a-2 получены проростки-альбиносы, остальные четыре линии не дали проростков.

Исследование, проведённое Zhang et al. [2025], сосредоточено на оценке эффективности CRISPR/Cas9 при редактировании сорго (*Sorghum bicolor*) дикорастущего типа линии T x430. Для агробактериальной трансформации сорго были сконструированы две гидовые РНК, нацеленные на ген *PDS*. В рамках исследования было проанализировано 72 чашки Петри, каждая из которых содержала 7 каллусных тканей, полученных из *in vitro*. В первом варианте опыта (SRM) растения культивировались на среде с селективными условиями, во втором варианте (RM) – на среде без селективных условий. После проведения биобаллистической трансформации альбиносные растения с мутацией в гене *PDS* были выявлены через две недели в обоих вариантах. В SRM из 146 проанализированных растений было обнаружено 16 альбиносов, что соответствует эффективности редактирования гена *PDS* на уровне 10,9%. В RM из 8 366 растений было выявлено 18 альбиносов, при этом эффективность редактирования составила около 0,2%. Методами ПЦР и секвенирования был подтвержден факт редактирования целевого гена *PDS*. В группе RM среди 18 альбиносных растений 4 были идентифицированы как растения с редактированием, выполненным с использованием системы CRISPR/Cas9 без интеграции трансгенов, что составляет 22,2% от общего числа проанализированных образцов. Мутация гена *PDS* вызвала альбинизм у растений сорго.

Kasirajan et al. [2025] проанализировали эффективность редактирования генома сахарного тростника (*Saccharum officinarum*). В рамках исследования не предусматривалось проведение нокаута гена фитоендесатуразы (*PDS*) в культуре сахарного тростника, однако в процессе реализации эксперимента по нокауту гена *CAD* (циннамил алкоголь дегидрогеназы) с использованием технологии CRISPR/Cas9 было обнаружено случайное нарушение функционирования гена *PDS*. Для осуществления манипуляций с геном *CAD* была синтезирована гидовая РНК и клонирована в CRISPR/Cas9 вектор рRGEB31 для дальнейшей агробактериальной трансформации штаммом *A. tumefaciens* LBA4404. При регенерации побегов около 90% трансгенных растений были альбиносами. Анализ последовательностей выявил случайное частичное совпадение между разработанной gRNA для гена *CAD* (выше последовательности PAM) и кодирующей последовательностью гена *PDS* (в позициях 609–616 п.н.). Результаты количественной ПЦР в реальном времени продемонстрировали

значительное снижение уровня экспрессии гена *PDS* в растениях-альбиносах.

В исследовании Wolabu et al. [2020] рассматривали эффективность редактирования генома люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) с помощью CRISPR/Cas9. В поисках эффективных промоторов для *Cas9* были созданы четыре модульных вектора с промоторами UBQ10-Cas9, EC1.2-Cas9, AMGE3-Cas9 и 35S-Cas9, нацеленных на ген *MtPDS*. Мутанты *MtPDS* были получены методом индукции каллуса и последующей регенерации. Полученные каллусы идентифицировались по фенотипам альбиноса и мозаичности и делились на три категории: линии с альбинизмом, мозаичные линии и линии дикого типа. Эффективность мутаций увеличивалась от I версии вектора к IV и от первой стадии культивирования к третьей. На третьей стадии культивирования эффективность мутировавших каллусов составила 5%, 13%, 7% и 36% для векторов I, II, III и IV соответственно. Фенотип альбиноса в каллусах с улучшенной версией вектора IV показал наиболее высокие результаты: 18%, 30% и 36% на стадиях культивирования, адаптации и адаптации, что свидетельствует о высокой эффективности вектора IV. Также была проведена оценка передачи мутаций, выявленных в поколении T0 у *M. truncatula*, с целью подтверждения их наследования в следующем поколении через самоопыление. Исследование показало, что мозаичные формы содержат гетерозиготные мутации, которые в последующем поколении приводят к появлению альбинизма, что и у их родительских особей.

Нут (*Cicer arietinum*), будучи одной из наиболее востребованных бобовых культур, плохо поддается культивированию тканей *in vitro*. В исследованиях Gurta et al. [2023] был разработан модифицированный и оптимизированный протокол трансформации нута, направленный на повышение эффективности и воспроизводимости процесса получения стабильных мутантных линий. В вектор pPZP200 был проклонирован ген *SpCas9* под контролем промотора CaMV35S и гидовая РНК к гену *PDS* под контролем промотора U6.1 *Medicago truncatula*. Процесс трансформации проводился с применением трёх штаммов *A. tumefaciens* GV3101, EHA105 и LBA4404. Анализ показал, что штамм GV3101 продемонстрировал наивысшую эффективность трансформации, составившую 17,56%, а одна gRNA позволяет достичь 42% эффективности редактирования. Мутации, индуцированные в гене *PDS*, привели к фенотипическим проявлениям альбинизма.

Lu и Tian [2022] в своей работе над исследованием нокаута гена *PDS* у сои (*Glycine max*) разработали разнообразные генетические

конструкции и для целенаправленного редактирования гена. В частности, особое внимание было уделено созданию двух конструкций (*GmPDS1* и *GmPDS3*), специфически направленных на ген *GmPDS18g*. Также была разработана отдельная конструкция (*GmPDS7*), целенаправленно модифицирующая ген *GmPDS11g*. Были синтезированы две конструкции (*GmPDS8* и *GmPDS9*), мишенями которых были выбраны консервативные области генов *GmPDS18g* и *GmPDS11g*. Исследование растений T1, полученных из трех линий, трансформированных *GmPDS8*, показало, что три растения линии №5 имели карликовый и альбиносный фенотипы. В трёх растениях линии №5 проявились карликовость и альбинизм. Делеции 18 и 25 п.н. из T0 передались потомству T1, подтвердив наследование мутаций, вызванных CRISPR/Cas9.

Особенности нокаута гена *PDS* у плодовых культур

Casarin et al. [2022] в своей работе применяли систему CRISPR/Cas9 для получения мутаций в 14 экзоне гена *PDS* у кофе (*Coffea canephora*). Были использованы эмбрионные каллусы и вектор, содержащие две gRNA под контролем промотора U6 *C. canephora*, нацеленные на разные экзоны гена *PDS*. После генетической трансформации с использованием *A. tumefaciens* были регенерированы соматические проростки и эмбрионы с фенотипами белого, пестрого и зеленого цветов. Молекулярно-генетический анализ подтвердил наличие вставки гена *Cas9* и мутаций в областях gRNA в геноме 77% проростков. Более того, у 50% исследованных растений как минимум один из целевых генетических локусов имел гомозиготную мутацию. Соматические эмбрионы, проявляющие мутации в последнем экзоне гена *CcPDS*, не демонстрировали полный альбинизм, но имели другие морфологические изменения. Среди них отмечались уменьшение размера, изменения в расположении и пигментации (желтизна, хлороз или антоциановая окраска), уменьшение количества листьев и аномалии при образовании корней. Также были отмечены случаи аномального развития семядолей и ограниченного роста. Выбор гена *PDS* в качестве мишени позволил установить, что генотипические особенности растения, условия культивирования с бактериальными агентами и интенсивность светового излучения оказывают существенное влияние на эффективность генетической трансформации и регенеративную способность трансгенных растений. Генотипические особенности были выявлены путём сравнения результатов трансформации у растений с разным генотипом – анализировали, как одни и те же условия культивирования и интенсивность освещения влияют

на регенерацию и проявление мутаций у растений с различными генотипами.

В рамках исследования Nishitani et al. [2016] был проведен эксперимент по нокауту гена *PDS* полукарликового подвойного сорта яблони "JM2" (*Malus prunifolia* (Wild.) Borkh. 'Seishi' × *M. pumila* Mill. var. *paradisiaca* Schneid. "M.9") с помощью одной gRNA. В результате трансформации были получены регенерированные трансгенные побеги яблони, демонстрирующие мутантные фенотипы, такие как альбинизм, бледно-зеленая и пестрая окраска. Эти фенотипы проявились через восемь месяцев после трансформации и были локализованы в прикорневой области зеленых побегов. Альбинизм трансгенных яблонь был схож с фенотипами мутантов *PDS*, наблюдаемыми у других растений. Данное сходство позволило предположить, что фенотипические эффекты были вызваны воздействием системы CRISPR/Cas9 на ген *PDS*. Трансформанты, содержащие sgRNA и Cas9, а также ген *NPTII*, были регенерированы из 30-54 листовых пластинок для каждой конструкции. Анализ ПЦР показал, что все трансформанты, демонстрирующие внешние изменения, содержали мутации в гене *PDS*. У двух зелёных трансформантов, не проявляющих видимых фенотипических изменений, были обнаружены частично мутированные последовательности. Альбиносные яблони демонстрировали значительно более медленные темпы роста по сравнению с контрольными. Также были получены растения с частичным побелением, для которых использовались множественные направляющие РНК, у большинства из этих мутантных форм края листьев имели белый или бледно-зеленый цвет. Побеги яблони, содержащие много мутировавших клеток, часто возникали из-за разветвления зелёных побегов, которые мутировали медленнее. Результаты показали, что одинаковые мутации у растений-трансформантов появились потому, что они были получены из одних и тех же исходных клеток.

Еще одним примером успешного нокаута гена *PDS* у плодовых растений является работа Dutt et al. [2020]. В этом исследовании проводилась трансформация эмбрионных клеточных культур апельсина (*Citrus sinensis* (L.) сорта "E2" двумя конструкциями CRISPR/Cas9 (pC-PDS1 и pC-PDS2), направленными на ген *C. sinensis* (*CsPDS*). Каждая из конструкций содержала две последовательности gRNA. Все трансгенные эмбрионы были альбиносами, пестрого фенотипа не наблюдалось. После трансформации и успешной регенерации ни один из альбиносов не выживал более двух последовательных циклов размножения *in vitro*, а нетрансгенные эмбрионы всегда оставались полностью зелеными.

Было выделено 12 линий, полученных с каждой из конструкций для дальнейшего анализа. ПЦР геномной ДНК показала наличие гена *Cas9* у всех линий. Результаты секвенирования по Сэнгеру ПЦР-амплифицированной последовательности гена показали, что все эмбрионы-альбиносы имели по крайней мере одну мутацию в гене *CsPDS*. Часто наблюдались изменения отдельных оснований. Частота замен была выше, чем частота делеций. Все клоны с одинаковой мутацией были классифицированы как биаллельные и гомозиготные.

Pavese et al. [2021] работали над исследованием нокаута гена *PDS* у европейского каштана (*Castanea sativa* Mill.) с помощью технологии CRISPR/Cas9, направленной на два консервативных участка гена. Через восемь недель на селективной среде были получены эмбрионы, обладающие устойчивостью к канамицину. Они были перенесены на селективную среду для формирования трансформированных линий. В соответствии с исследованием Corredoira et al. [2015], трансформированные линии поддерживались через вторичный эмбриогенез с регулярными пересадками на новую селективную среду каждые шесть недель. Секвенирование по Сэнгеру подтвердило успешное редактирование в этих линиях. Их репродуктивные возможности были оценены посредством подсчета количества соматических эмбрионов, полученных из эксплантатов, и сопоставлены с контрольной эмбрионной линией. Соматические эмбрионы, подвергшиеся трансформации, были типичными альбиносами, также была зафиксирована низкорослость с укороченными междоузлиями и уменьшенными размерами листьев.

В исследованиях Malabarba et al. [2020] технология CRISPR/Cas9 была использована для нокаута гена *PDS* в груше (*Pyrus communis* L. и *P. pyrifolia* Nak). Две направляющие РНК под промоторами MdU3 и MdU6 были объединены с редактором оснований, содержащим цитидиндеаминазу, слитую с никазой *Cas9*. Фенотип трансгенных линий анализировали в течение 6–10 месяцев после завершения всех экспериментов по трансформации. Две линии грушевых деревьев показали нормальный рост и морфологию. У одной из них вскоре появились белые участки, которые увеличивались после нескольких пересадок и в итоге привели к появлению полностью белых побегов. На второй линии груш белые участки не наблюдались. Добавление дополнительной стадии регенерации из листьев первичных трансгенных растений (T0) для уменьшения химеризма оказалось неэффективным. Из сотен придаточных почек, полученных из пестрой линии T0, 89% были однородными альбиносами, были 6,25% зелеными и только 4,75% по-прежнему

имели неоднородную и пеструю окраску. Было проанализировано двенадцать из этих регенерированных линий в целевой области. Выяснилось, что 99% аллелей регенератов T0 (RT0), как и ожидалось, продуцировали усеченный целевой белок. Также было установлено, что 67% растений RT0 имели менее гетерогенные профили редактирования по сравнению с T0. Большинство трансгенных линий яблони отличались замедленным ростом и более тонкими листьями по сравнению с контрольными образцами, однако белые участки у них отсутствовали.

Нокаут гена *PDS* у прочих культур

В рамках исследования Mainkar et al. [2023] был проведен эксперимент по редактированию двух экзонов гена, кодирующего фитоен десатуразу в сорте лука (*Allium cepa* L.) Bhima Super. Агробактерии, содержащие генно-инженерные конструкции, сокультивировались с 8-недельными эмбрионными каллусами. Из 617 каллусов был получен 21 регенерант, среди которых наблюдалось три различных фенотипа: белый, пестрый и бледно-зеленый. Общее содержание хлорофилла было значительно снижено в побегах-альбиносах и существенно уменьшено в химерных побегах по сравнению с контрольными образцами. Из шести регенерированных побегов, прошедших ПЦР-анализ на наличие гена *Cas9*, два проявили фенотип альбиноса вследствие инсерций/делеций и нуклеотидных замен в целевых участках гена *PDS* и прилегающих областях. Глубокое секвенирование ампликонов выявило существенную вариабельность частоты делеций между двумя gRNA, которая варьировалась от 1,2% до 63,4%, а также частоту замен 53,4%. В альбиносных побегах инсерции и делеции привели к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона в гене *AcPDS*, что вызвало преждевременную терминацию белка и, как следствие, альбинизм.

В исследовании Odipio et al. [2017] рассматривалось редактирование генома тропической маниоки (*Manihot esculenta*) с помощью технологии CRISPR/Cas9. В рамках эксперимента авторы модифицировали ген фитоендесатуразы в двух сортах маниоки с использованием гидовых РНК, нацеленных на две последовательности в экзоне 13 гена *MePDS*. После агробактериальной доставки системы CRISPR/Cas9 проявления альбинизма наблюдали у регенерантов из соматических эмбрионов, начиная со стадии семядолей. У регенерантов наблюдался как полный альбинизм, так и химерный, что говорит о присутствии мозаичных мутаций. Анализ последовательностей подтвердил, что 38 исследованных линий растений содержали мутации в целевом сайте гена *MePDS*, включая инсерции,

делеции и замены, что свидетельствует о мультиаллельной природе полученных изменений. У сорта 60444 (5,23%) была обнаружена одна предположительно моноаллельная гомозиготная линия, в то время как в сорте TME 204 (21,1%) были выявлены четыре биаллельные гомозиготные линии, соответственно. Большинство других линий (89,5% из сорта 60444 и 78,9% из сорта TME 204) были классифицированы как гетерозиготные. Кроме того, были выявлены незначительные изменения в нуклеотидной последовательности, включающие замены и/или делеции, расположенные как до, так и после целевой области гена *MePDS*. Было отмечено, что растения с модифицированным геном *MePDS* продемонстрировали не только фенотипические изменения, выражающиеся наличием альбизма, но и другие характерные особенности. Было установлено, что у растений сорта TME 204 наблюдалась карликовость, а у растений сорта 60444 отмечался замедленный рост, укорачивание черешков и уменьшение площади листовой поверхности по сравнению с немодифицированными контрольными образцами.

Wang et al. [2024] исследовали нокаут гена *PDS* генома китайской капусты (*Brassica oleracea* var. *chinensis* Lei) с помощью CRISPR/Cas9. Процедура агробактериальной трансформации была проведена для 3200 эксплантов. Для анализа была выделена геномная ДНК из побегов трансгенных растений и растений дикого типа. Было получено восемнадцать устойчивых к селективному агенту и ПЦР-положительных растений. Эффективность трансформации составила 0,56%, а ПЦР-положительными были – 69,23% устойчивых растений. По результатам секвенирования генов *BocPDS1* и *BocPDS2* из 18 трансгенных линий двойные мутанты составляли 11,11%, в то время как на восемь одиночных мутантов *BocPDS1* приходилось 44,44%, а на один одиночный мутант *BocPDS2* приходилось 5,55%. Двойные мутации генов *BocPDS1* и *BocPDS2* проявлялись в полном обесцвечивании, тогда как одиночные мутации этих генов приводили к мозаичному фенотипу, что свидетельствует о том, что функции генов *BocPDS1* и *BocPDS2* имеют как пересекающиеся, так и взаимодополняющие механизмы действия. Потеря функции любого из этих генов приводила к фенотипам альбиносов, что позволяет сделать вывод о необходимости обоих генов для биосинтеза хлорофилла.

Нокаут гена фитоендесатуразы технологией CRISPR/Cas9 у сельдерея (*Apium graveolens* L.) сорта "Jinnan Shiqin" провели Liu et al. [2022]. В их исследованиях в штамм *A. tumefaciens* GV3101 была интегрирована генетическая конструкция, содержащая гидовую РНК, специфичную к гену

AgPDS. В результате агробактериальной трансформации, были получены регенераты зеленого цвета и альбиносы. Часть растений-альбиносов не сформировала нормальных корней и характеризовалась карликовостью. ПЦР-анализом на ген *Cas9* были идентифицированы две мутантные линии сельдерея №5 и 11, у которых затем были выявлены делеции. Обе линии проявляли альбинизм.

В исследованиях Cao et al. [2022] был осуществлен нокаут гена *PDS* на 10 сортах батата (*Ipomoea batatas* [L.] Lam), включая "JiJishu26" и два трудно трансформируемых фиолетовых сорта – "Xuzishu8" и "Zishu01". Для оценки эффективности редактирования генов у трудно трансформируемых сортов "Xuzishu8" и "Jishu26" была разработана конструкция, нацеленная на ген *PDS*, с помощью системы cut-dip-butting (CDB). Система CDB основана на применении *Agrobacterium rhizogenes* для инокуляции эксплантов, что обеспечивает генерацию трансформированных корней, из которых развиваются трансформированные почки через процесс корневого отпрыска. Для подтверждения результатов были проведены три повторных эксперимента, в каждом из которых использовались по 20 срезанных верхушечных стеблей в качестве эксплантов и были получены растения-альбиносы. Из 60 эксплантов, задействованных в трех экспериментах, 25 показали наличие трансгенных обесцвеченных корней. Результаты эксперимента показали успешную трансформацию всех десяти сортов с использованием системы CDB, что свидетельствует о её независимости от генотипа.

В исследовании Awasthi et al. [2021] было проведено редактирование гена хмеля (*Humulus lupulus* L.) с использованием технологии CRISPR/Cas9. Для стабильной интеграции конструкций, кодирующих кодон-оптимизированный ген *Cas9* и гидовые РНК, была использована агробактериальная трансформация междоузловых эксплантов, полученных *in vitro*. Для оценки эффективности системы CRISPR/Cas9 у 15 трансформированных линий был проведён эндонуклеазный анализ, показавший успешное редактирование в 33,3% случаев. Гетерозиготные мутации были выявлены в линиях L8, L13, L14 и L30, а гомозиготная мутация в линии L29. Секвенирование пяти независимых трансгенных линий (двух альбиносов и трех мозаичных) показало, что у трансформантов с видимыми фенотипами мутации в гене *HIPDS* наблюдались только в области gRNA, управляемой промотором AtU6-29, тогда как мутации в области gRNA, управляемой промотором AtU6-626, не были обнаружены. Мутантная линия альбиносов L29 оказалась моноаллельной гомозиготой с делецией в 20 нуклеотидов. Это свидетельствует о том, что

гомозиготная мутация в гене *HIPDS* является летальной для хмеля и делает мутантные растения-альбиносы нежизнеспособными в почве.

Нокаут гена *PDS* у несельскохозяйственных растений

Резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*), являющаяся широко применяемым стандартным модельным объектом в области молекулярной биологии, предоставляет уникальные возможности для углубленного исследования влияния точечных генетических модификаций на развитие и метаболизм растений. Особое внимание заслуживает нокаут гена *PDS*, который приводит к значительным нарушениям в пигментации. В работе Qin et al. [2007] был использован *A. thaliana* экотипа Колумбия (*col-0*) для нокаута гена *PDS* методом floral-dip с использованием штамма *A. tumefaciens* GV3101. Из 2500 полученных линий были отобраны семена T2 для анализа фенотипа. Особое внимание было уделено линии ZHJ070204, которая проявила альбинизм. Гомозиготные мутанты полностью утратили способность к фотосинтезу и не могли расти в почве, однако их удалось вырастить на питательной среде 1/2 МС с добавлением 1% сахара. При прорастании у мутантов были фиолетовые семядоли, которые со временем утрачивали свою окраску, становясь полностью белыми. Рост был значительно замедленным, что проявлялось карликовостью и мелкими розеточными листьями. Кроме того, ни одно из гомозиготных растений не было способно к цветению.

В рамках исследования Henderson et al. [2020] была проанализирована результативность технологии CRISPR/Cas9 редактирования генома растения ястребиночки зонтиконосной (*Hieracium piloselloides*) с целью изучения апомиксиса. Редактирование гена *PDS* было проведено с использованием метода агробактериальной трансформации листовых дисков. В трех независимых экспериментах была выявлена летальность карликовых альбиносов, характерная для нокаута гена *PDS*, обнаруженного у 11% растений поколения T0. Химерными были 31,4% растений. Остальные растения имели нормальный зеленый фенотип. Среди семян поколения T1, полученных в результате апомиктического размножения двух химерных растений 86% проявили фенотип альбиносов с полным нокаутом по гену *PDS*.

Модифицированный и оптимизированный метод трансформации гибридной петунии (*Petunia × hybrida*) линии Mitchell Diploid (MD) технологией CRISPR/Cas9 разрабатывали Qin et al. [2007] с целью повышения эффективности и воспроизводимости при получении стабильных мутантных линий. В качестве целевого гена использовали *PDS*. Были подобраны две sgRNA в экзонных областях гена *PhPDS*,

фланкирующие интрон длиной 745 п.н. Белые каллусы начали появляться примерно через четыре недели после трансформации листовых дисков конструкциями CRISPR/Cas9, содержащими одну из sgRNA. Все зеленые и белые части каллуса отбирали для побегообразования. Проростки, полученные из одной и той же части каллуса, рассматривались как независимые трансгенные линии. Через три месяца после трансформации приблизительно из 300 листовых дисков (200 для sgRNA pGGE1c и 100 для sgRNA pGGE2c) было получено в общей сложности 214 линий трансгенных растений, включая альбиносные, мозаичные и зеленые линии. Доля альбиносных трансгенных линий составила 87,5% и 58,1% для pGGE1c и pGGE2c соответственно. Поскольку инбредная линия *P. hybrida* Mitchell Diploid (MD) является диплоидной с двумя копиями каждого гена, альбинизм указывал на то, что у этих трансгенных сеянцев были нарушены обе копии целевого гена *PDS*. Четыре случайно выбранные линии растений-альбиносов были биаллельными. Был проведен анализ линии ZHJ070204 с признаками альбинизма. Гомозиготный мутант проявил полный альбинизм и не рос в почве, однако мог расти на среде ½ MS с добавлением 1% сахара. В процессе роста семядоли и мелкие розеточные листья мутанта постепенно теряли цвет до полного обесцвечивания, что замедляло рост и вызывало карликовость.

Fan et al. [2015] отредактировали геном китайского тополя (*Populus tomentosa* Carr.) с целью нокаута гена *PDS* с помощью CRISPR/Cas9. Для проведения исследования были разработаны четыре специальные гидовые РНК, нацеленные на конкретные участки гена *PtoPDS*. Было секвенировано более 100 клонов из восьми независимых трансгенных растений T0. Большинство образцов (89%) сформировали по крайней мере один обесцвеченный побег. Среди трансгенных растений тополя T0 доля альбиносов превысила 50% (30 из 59), что значительно выше показателей, наблюдаемых у других видов растений при выключении гена *PDS*. Результаты показали, что все растения с альбинизмом содержали мутантные аллели в гене *PDS*.

Актуальность дальнейшего исследования гена *PDS* у различных видов растений

Ген *PDS* является одним из самых популярных целевых генов для тестирования и оптимизации систем CRISPR/Cas9 в растениях. Он был отредактирован в широком спектре видов, включая однодольные, двудольные, полиплоидные и древесные культуры, что демонстрирует его универсальность как модельного гена. Использование *PDS* в качестве мишени позволило достичь успеха в редактировании таких сложно поддающихся

трансформации культур как соя и пшеница. В таблице 1 продемонстрирован систематизированный перечень растений, где удалось успешно провести нокаут гена *PDS* методом CRISPR/Cas. Доступность данных об эффективных гидовых РНК позволяет экономить время при планировании экспериментов, направленных на разработку новых CRISPR/Cas систем или методов доставки.

Следует подчеркнуть, что, несмотря на широкий спектр применения гена *PDS* в качестве маркера в экспериментах с использованием системы CRISPR/Cas9, остаются многочисленные культурные и дикорастущие виды, для которых не проводились исследования по редактированию данного гена или результаты таких исследований не были опубликованы. К числу таких видов относятся огурец (*Cucumis sativus*), свёкла (*Beta vulgaris*), морковь (*Daucus carota*), подсолнечник (*Helianthus annuus*), репа (*Brassica rapa*), салат (*Lactuca sativa*) и ряд других культур.

Примером также могут служить растений многолетних и древесных форм, такие как кокосовая (*Cocos nucifera*) и финиковая (*Phoenix dactylifera*) пальмы, зародыши и каллусы которых характеризуются медленной регенерацией, что существенно затрудняет отбор отредактированных линий. Оливковые деревья (*Olea europaea*) также демонстрируют низкую скорость соматического эмбриогенеза, что делает стабильную трансформацию неэффективной. Дополнительным ограничивающим фактором выступают крупные и сложные геномы таких культур, часто содержащие многочисленные повторы и дубликации, что осложняет конструирование гидовых РНК и повышает риск неспецифичного редактирования.

Протоколы трансформации и регенерации для конкретных видов могут быть недостаточно разработаны или неэффективны. В некоторых культурах предпочтение может отдаваться целевым генам, непосредственно влияющим на урожайность, устойчивость к внешним факторам или качество продукции. В таких случаях *PDS* может рассматриваться как второстепенный маркер. Повреждение гена *PDS* в определённых видах также может приводить к значительным фенотипическим изменениям, таким как альбинизм и гибель растений, что делает проведение подобных экспериментов нецелесообразным или нежелательным. В высокопигментированных растениях альбинизм в результате нокаута гена *PDS* может быть менее заметным из-за высокого содержания антоцианов или беталаинов, которые маскируют потерю хлорофилла.

Таблица 1. Список растений, подвергнутых нокауту гена *PDS*
 Table 1. List of plant species subjected to the knockout of *PDS* gene

Вид растения / Plant species	Эффект редактирования / Editing effect	Ссылки / References
<i>Solanum lycopersicum</i>	альбинизм, пигментация	Naing et al. [2019]; Komatsu et al. [2020]
<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>N. benthamiana</i>	альбинизм, летальность	Wang et al. [2009]; Bos et al. [2006]; Donini и Marusic [2019]
<i>Solanum tuberosum</i>	альбинизм in vitro и в теплице	Siddappa et al. [2023]
<i>Solanum melongena</i>	альбинизм, карликовость	Phad et al. [2024]
<i>Capsicum annuum</i>	альбинизм, карликовость	Bulle et al. [2024]
<i>Musa acuminata</i> , <i>M. paradisiaca</i>	альбинизм	Ntui et al. [2019]
<i>Carica papaya</i>	альбинизм, карликовость	Brewer & Chambers [2022]
<i>Coffea canephora</i>	альбинизм, пигментация, карликовость	Casarin et al. [2022]
<i>Cicer arietinum</i>	альбинизм	Gupta et al. [2023]
<i>Allium cepa</i>	альбинизм	Mainkar et al. [2023]
<i>Cucurbita pepo</i>	альбинизм	Thakur и Meru [2023]
<i>Manihot esculenta</i>	альбинизм, карликовость	Odipto et al. [2017]
<i>Triticum aestivum</i>	альбинизм	Upadhyay et al. [2013]
<i>Citrullus lanatus</i>	альбинизм, летальность	Tian et al. [2016]
<i>Cucumis melo</i>	альбинизм, карликовость	Hooghvorst et al. [2019]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	альбинизм, карликовость	Qin et al. [2007]
<i>Hieracium piloselloides</i>	альбинизм,	Henderson et al. [2020]
<i>Malus prunifolia</i>	альбинизм, карликовость	Nishitani et al. [2016]
<i>Citrus sinensis</i>	альбинизм	Dutt et al. [2020]
<i>Pyrus communis</i>	альбинизм, карликовость	Malabarba et al. [2020]
<i>Castanea sativa</i>	альбинизм, карликовость	Pavese et al. [2021]
<i>Vaccinium corymbosum</i>	альбинизм, пигментация	Vaia et al. [2022]
<i>Fragaria vesca</i> / × <i>ananassa</i>	альбинизм	Wilson et al. [2019]
<i>Vitis vinifera</i>	альбинизм	Ren et al. [2021]
<i>Actinidia chinensis</i>	альбинизм, карликовость	Luo et al. [2025]
<i>Glycine max</i>	альбинизм, карликовость	Lu, Tian [2022]
<i>Medicago truncatula</i>	альбинизм	Wolabu et al. [2020]
<i>Oryza sativa</i>	альбинизм в каллусах	Banakar et al. [2020]
<i>Sorghum bicolor</i>	альбинизм	Zhang et al. [2025]
<i>Saccharum officinarum</i>	альбинизм	Kasirajan et al. [2025]
<i>Populus tomentosa</i>	альбинизм	Fan et al. [2015]
<i>Humulus lupulus</i>	альбинизм, летальность	Awasthi et al. [2021]
<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>	альбинизм, карликовость	Qin, Gu и Ma (2007)
<i>Brassica oleracea</i>	альбинизм	Wang et al. [2024]
<i>Apium graveolens</i>	альбинизм, карликовость	Liu et al. [2022]
<i>Ipomoea batatas</i>	альбинизм	Cao et al. [2022]

Отсутствие данных о редактировании *PDS* в отдельных видах не обязательно означает техническую невозможность такой работы, но скорее обусловлено сочетанием технических, биологических и экономических факторов. Продолжение таких исследований могло бы расширить разнообразие систем редактирования и упростить сравнительный анализ эффективности трансформации, выживаемости и фенотипической реакции между разными культурами, что важно для внедрения новых методов в растениеводстве.

Заключение

Ген *PDS* кодирует фермент фитоендесатуразу, который регулирует скорость синтеза каротиноидов, критически важных для фотосинтеза и защиты фотосистем. В мире применялись различные методы нокаута этого гена, включая CRISPR/Cas9 и VIGS, которые позволили глубже понять функции гена *PDS* и его влияние на синтез пигментов и процессы фотосинтеза.

Эксперименты по редактированию гена *PDS* были успешно проведены на широком спектре растений – от модельных видов до экономически значимых культур. При этом наблюдались характерные фенотипические проявления: обесцвечивание, альбинизм, снижение уровня хлорофилла и карликовость. Однако степень выраженности этих признаков и способность растений к дальнейшему росту и размножению значительно различались между видами.

У большинства исследованных видов растения с полным альбинизмом были нежизнеспособны и не плодоносили. Это характерно для томата (*Solanum lycopersicum*), табака (*Nicotiana tabacum*), картофеля (*Solanum tuberosum*), перца (*Capsicum annuum*), дыни (*Cucumis melo*), папайи (*Carica papaya*), банана (*Musa acuminata*), яблони (*Malus prunifolia*), апельсина (*Citrus sinensis*), груши (*Pyrus communis*), каштана (*Castanea sativa*) и других культур, где альбиносные линии демонстрировали либо полную летальность, либо утрату способности к регенерации.

В то же время мозаичные и химерные формы – например, у перца, дыни, табака и голубики – проявляли частичную жизнеспособность: растения могли продолжать вегетативный рост, иногда адаптировались к почвенным условиям и достигали стадии цветения, однако формирование плодов или семян у них, как правило, не наблюдалось.

Таким образом, можно заключить, что нокаут гена *PDS* во всех известных случаях либо препятствует плодообразованию из-за летальности альбинизма, либо существенно снижает репродуктивную способность растений, ограничивая

развитие до вегетативной фазы. Однако, несмотря на значительный потенциал технологий редактирования генома, для их успешного применения в сельском хозяйстве необходимо продолжать исследования в данной области.

Литература / References

1. Awasthi P, Kocabek T, Mishra AK et al. Establishment of CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in hop (*Humulus lupulus*). *Plant Physiol Biochem.* 2021. 160. 17. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.01.006
2. Awasthi P, Kocábek T, Mishra AK et al. Establishment of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in hop (*Humulus lupulus*). *Plant Physiol Biochem.* 2021. 160. 1-7. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.01.006
3. Banakar R, Schubert M, Collingwood M et al. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoene desaturase (*OsPDS*) gene. *Rice.* 2020. 13. 4. doi: 10.1186/s12284-019-0365-z
4. Bartley GE, Viitanen PV, Pecker I et al. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme involved in the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. 88(15). 6532-6536. doi: 10.1073/pnas.88.15.6532
5. Bartley GE, Scolnik PA. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell.* 1995. 7(7). 1027–1038. doi: 10.1105/tpc.7.7.1027
6. Bos JIB, Kanneganti TD, Young C et al. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 2006. 48. 165–176. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02866.x
7. Brewer SE, Chambers AH. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of phytoene desaturase in *Carica papaya* L. *J Horticult Sci Biotech.* 2022. 97(5). 580–592. doi: 10.1080/14620316.2022.2038699
8. Bulle M, Venkatapuram AK, Abbagani S et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of Phytoene desaturase (PDS) gene in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Genet Eng Biotechnol.* 2024. 22(2). 100380. doi: 10.1016/j.jgeb.2024.100380
9. Cao X, Zhang Y, Wu Y et al. Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *Innovation.* 2022. 4(1). 100345. doi: 10.1016/j.xinn.2022.100345
10. Casarin T, Freitas NC, Pinto RT et al. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of the phytoene

- desaturase gene in *Coffea canephora*. *Sci Rep*. 2022. 12(1). 17270. doi:10.1038/s41598-022-21566-w
11. Chung E, Seong E, Kim YC et al. Method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol Cells*. 2004. 17. 377–380. PMID: 15179058
 12. Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM et al. Chestnut, European (*Castanea sativa*). In: Methods in Molecular Biology: Agrobacterium Protocols, ed. K. Wang. Springer, 2015. 163–176. doi: 10.1007/978-1-4939-1658-0_14
 13. Donini M, Marusic C. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems. *Biotechnol Lett*. 2019. 41(3). 335–346. doi: 10.1007/s1052
 14. Dutt M, Mou Z, Zhang X et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with *Citrus* embryogenic cell cultures. *BMC Biotechnol*. 2020. 20. 58. doi: 10.1186/s12896-020-00652-9
 15. Efremov GI, Ashikhmin AA, Shchennikova AV et al. Comparative Characteristics of Genes 9-Cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase SINCED1 and SINCED2 during the Development. *Russ. J. Plant Physiol*. 2023. 70. 171-180. doi: 10.31857/S0015330322600504
 16. Fan D, Liu T, Li C et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep*. 2015. 5. 12217. doi: 10.1038/srep12217
 17. Guo HS, Fei JF, Xie Q et al. A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant J*. 2003. 34. 383–392. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01723.x
 18. Gupta SK, Vishwakarma NK, Malakar P et al. Development of an *Agrobacterium*-delivered codon-optimized CRISPR/Cas9 system for chickpea genome editing. *Protoplasma*. 2023. 260(5). 1437-1451. doi:10.1007/s00709-023-01856-4
 19. Henderson SW, Henderson ST, Goetz M et al. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of an Endogenous PHYTOENE DESATURASE Gene in T1 Progeny of Apomictic *Hieracium* Enables New Strategies for Apomixis Gene Identification. *Genes*. 2020. 11(9). 1064. doi: 10.3390/genes11091064
 20. Hooghvorst I, Lopez-Cristoffanini C, Nogues S. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon. *Sci Rep*. 2019. 9(1). 17077. doi: 10.1038/s41598-019-53710-4
 21. Kasirajan L, Vargheese RL, Sankararaj IY. CRISPR/Cas9 off-target effect induces albinism via phytoene desaturase (PDS) gene disruption in sugarcane. *Sugar Tech*. 2025. doi: 10.1007/s12355-025-01659-2
 22. Komatsu H, Abdellatif IMY, Yuan S et al. Genome editing in PDS genes of tomatoes by non-selection method and of *Nicotiana benthamiana* by one single guide RNA to edit two orthologs. *Plant Biotechnol (Tokyo)*. 2020. 37(2). 213–221. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0527b
 23. Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92(5). 1679–1683. doi: 10.1073/pnas.92.5.1679
 24. Li G, Liu R, Xu R et al. Development of an *Agrobacterium*-mediated CRISPR/Cas9 system in pea (*Pisum sativum* L.). *Crop J*. 2023. 11(1). 132–139. doi: 10.1016/j.cj.2022.04.011
 25. Liu HP, Fu DQ, Zhu BZ et al. Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*). *J Integr Plant Biol*. 2012. 54. 4229. doi:10.1111/j.1744-7909.2012.01102.x
 26. Liu J-X, Zhang Y, Chen X et al. CRISPR/Cas9-mediated precise targeted mutagenesis of phytoene desaturase in celery. *Horticult. Res*. 2022. 9. uhac162. doi: 10.1093/hr/uhac162
 27. Liu YL, Schif M, Dinesh-Kumar SP. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*. 2002. 31. 777–786. doi: 10.1111/j.17447909.2012.01102.x
 28. Lu QSM, Tian L. An efficient and specific CRISPR-Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes. *BMC Biotechnol*. 2022. 22. 7. doi: 10.1186/s12896-022-00737-7
 29. Luo X, Dou Y, Lang Y et al. CRISPR/Cas9-mediated editing of carotenoid biosynthesis genes alters carotenoid concentrations in kiwifruit. *BMC Plant Biol*. 2025. 25. 1056. doi: 10.1186/s12870-025-07112-6
 30. Mainkar P, Manape TK, Satheesh V et al. CRISPR/Cas9-mediated editing of PHYTOENE DESATURASE gene in onion (*Allium cepa* L.). *Front Plant Sci*. 2023. 14:1226911. doi:10.3389/fpls.2023.1226911
 31. Malabarba J, Chevreau E, Dousset N et al. New strategies to overcome present CRISPR/Cas9 limitations in apple and pear: efficient dechimerization and base editing. *Int J Mol Sci*. 2020. 22. 319. doi: 10.3390/ijms22010319
 32. Naing AH, Kyu SY, Pe PPW et al. Silencing of the phytoene desaturase (PDS) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes. *Plant Methods*. 2019. 15. 110. doi: 10.1186/s13007-019-0491-z
 33. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990. 2(4). 279-289. doi:10.1105/tpc.2.4.279
 34. Nezhdanova A, Sluginina M, Kulakova A et al. Effect of Mosaic Knockout of Phytoene Desaturase Gene NtPDS on Biosynthesis of Carotenoids in *Nicotiana tabacum* L. *Rus. J. Plant Physiol*. 2023. 70. 601–611. doi: 10.31857/S001533032360033X
 35. Nishitani C, Hirai N, Komori S. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016. 6. 31481. doi: 10.1038/srep31481

36. Ntui VO, Tripathi JN, Tripathi L. Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing tool for banana and plantain (*Musa* spp.). *Current Plant Biology*. 2020. 21. 100128. doi:10.1016/J.CPB.2019.100128
37. Odipio J, Alicai T, Ingelbrecht I et al. Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing of Phytoene desaturase in Cassava. *Front Plant Sci*. 2017. 8. 1780. doi: 10.3389/fpls.2017.01780
38. Pavese V, Moglia A, Corredoira E et al. First report of CRISPR/Cas9 gene editing in *Castanea sativa* Mill. *Front Plant Sci*. 2021. 12. 728516. doi: 10.3389/fpls.2021.728516
39. Phad AP, Takate UB, Rawal SK et al. Targeted gene knockout via CRISPR/Cas9: precise genome editing in eggplant (*Solanum melongena*) through phytoene desaturase gene disruption. *J. Crop Sci. Biotechnol*. 2024. 27. 249–259. doi: 10.1007/s12892-023-00227-y
40. Qin G, Gu H, Ma L et al. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res*. 2007. 17. 471–482. doi: 10.1038/cr.2007.40
41. Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*. 2001. 25(2). 237–245. doi:10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x
42. Ren C, Liu Y, Guo Y et al. Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters. *Hortic Res*. 2021. 8. 52. doi: 10.1038/s41438-021-00489-z
43. Siddappa S, Sharma N, Salaria N et al. CRISPR/Cas9-mediated editing of phytoene desaturase (PDS) gene in an important staple crop, potato. *3 Biotech*. 2023. 13(5). 129. doi:10.1007/s13205-023-03543-w
44. Thakur S, Meru G. CRISPR/Cas9 mediated editing of phytoene desaturase gene in squash. *J Plant Biochem Biotechnol*. 2023. 32. 862-869. DOI: 10.1007/s13562-023-00866-w
45. Tian S, Jiang L, Gao Q et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep*. 2017. 36(3). 399–406. doi: 10.1007/s00299-016-2089-5
46. Upadhyay SK, Kumar J, Alok A et al. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)*. 2013. 3(12). 2233–2238. doi: 10.1534/g3.113.008847
47. Vaia G, Pavese V, Moglia A et al. Knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in highbush blueberry. *Front Plant Sci*. 2022. 13. 1074541. doi: 10.3389/fpls.2022.1074541
48. Wang M, Wang G, Ji J et al. The effect of pds gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. *Plant Sci*. 2009. 177(3). 222–226. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.04.006
49. Wang Y, Sharif R, Li G et al. CRISPR/Cas9-mediated BocPDSs gene editing in Chinese kale using the endogenous tRNA-processing system. *Horticulturae*. 2024. 10. 1244. doi: 10.3390/horticulturae10121244
50. Wilson FM, Harrison K, Armitage AD et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods*. 2019. 15. 45. doi: 10.1186/s13007-019-0428-6
51. Wolabu TW, Park JJ, Chen M et al. Improving the genome editing efficiency of CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Planta*. 2020. 252(2). 15. doi: 10.1007/s00425-020-03415-0
52. Wu H, McCormac AC, Elliott MC et al. *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1998. 54. 161–171. doi: 10.1023/A:1006106916542
53. Zhang B, Yang X, Yang C et al. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in *Petunia*. *Sci Rep*. 2016. 6. 20315. doi: 10.1038/srep20315
54. Zhang Y, Cheng M, Massel K et al. An accelerated transgene-free genome editing system using microparticle bombardment of sorghum immature embryos. *aBIOTECH*. 2025. 6. 202-214. doi: 10.1007/s42994-025-00204-9