

Обзорная статья
УДК 631.52:635.9
DOI: 10.30901/2658-6266-2022-3-01



Применение системы CRISPR/Cas для редактирования генов декоративных культур

Р. С. Рахмангулов

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Руслан Султанович Рахмангулов, r.rakhmangulov@vir.nw.ru

Декоративные растения широко распространены и пользуются популярностью во всем мире. Для некоторых стран цветоводство имеет весомое экономическое значение. В России также имеются благоприятные перспективы для развития промышленного цветоводства. Поспособствовать этому может прорывной метод редактирования генов хозяйственно-ценных признаков растений CRISPR/Cas, который, таким образом, позволяет вывести растения за пределы потенциальной внутривидовой изменчивости и решить вопрос получения нетрансгенных модифицированных растений. В данной статье проведен анализ современного состояния селекции декоративных культур с помощью метода генетического редактирования CRISPR/Cas. Статьи были отобраны из базы данных Scopus. В результате поиска публикаций, посвященных 50 наиболее распространенным декоративным культурам, найдено 26 статей, посвященных генетическому редактированию с помощью системы CRISPR/Cas. Восемь из них посвящены редактированию генома петунии, по три публикации выявлено для фаленопсиса и ипомеи, по две – для дендробиума, горечавки, лилии, торении, и по одной – для хризантемы, каланхое, пуансеттии, табака обыкновенного. Отобранные статьи были разделены на три группы. В первую группу вошли работы, в которых проведены исследования по изучению механизмов регуляции генов полезных признаков, а также оптимизации метода CRISPR/Cas применительно к конкретной культуре. Во вторую группу были отнесены работы, направленные на изменение окраски цветков и листьев. К третьей группе были отнесены работы по увеличению продолжительности жизни цветка и получению растений с махровыми цветками. В обзоре представлены работы по оптимизации генетического редактирования генов у представителей семейства орхидные Orchidaceae Juss. Также отмечена перспективность применения генетического редактирования с помощью системы CRISPR/Cas, что может ускорить качественные преобразования геномов и повысить эффективность селекции, что особенно важно в современных условиях.

Ключевые слова: декоративные культуры, генетическое редактирование, направленный мутагенез, CRISPR/Cas.

Благодарности: Статья подготовлена в рамках государственного задания ВПР согласно тематическому плану НИР по теме № 0481-2022-0007 «Выявление новых генетических маркеров селекционно значимых свойств и новых аллельных вариантов хозяйственно ценных генов в генофонде культурных растений и их диких родичей при помощи геномных и постгеномных технологий».

Для цитирования: Рахмангулов Р.С. Применение системы CRISPR/Cas для редактирования генов декоративных культур. Биотехнология и селекция растений. 2022;5(3):33-41. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-3-01

Прозрачность финансовой деятельности. Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Рахмангулов Р.С., 2022

Review article

DOI: 10.30901/2658-6266-2022-3-01

Application of the CRISPR/Cas system for gene editing in ornamental crops

Ruslan S. Rakhmangulov

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Ruslan S. Rakhmangulov, r.rakhmangulov@vir.nw.ru

Ornamental plants are widespread and popular all over the world. Floriculture industry is of significant economic importance for some countries. Favorable prospects for the development of industrial floriculture were also noted for Russia. This can be facilitated by CRISPR/Cas, a breakthrough method of editing genes responsible for economically valuable traits of plants, which allows bypassing the limitations of the potential intraspecific variability of plants and solving the problem of obtaining non-transgenic modified plants. This article analyzes the current status of ornamental crop breeding using the CRISPR/Cas genetic editing method. The articles were selected from the Scopus database. A search encompassing 50 most common ornamental crops yielded the total of 26 articles on genetic editing using the CRISPR/Cas system, in particular: 8 articles featuring petunia; 1 per each crop on chrysanthemum, kalanchoe, poinsettia and tobacco; 2 per each on dendrobium, gentian, lily and torenia, and 3 per each on phalaenopsis and ipomoea. The found articles were divided into three groups. The first group includes works devoted to studies of mechanisms of genes controlling useful traits, as well as the optimization of the CRISPR/Cas method for a particular crop. The second group unites works aimed at modifying color of flowers and leaves. The third group includes works on increasing the life span of a flower and obtaining double flowers. The review offers the works on the optimization of gene editing in representatives of the orchid family Orchidaceae Juss. Also, it notes the prospects of gene editing by the CRISPR/Cas system, which can accelerate qualitative improvements in breeding and raise its effectiveness, it being especially important in present conditions.

Key words: ornamental crops, genetic editing, site-directed mutagenesis, CRISPR/Cas.

Acknowledgements: The article was prepared as part of the VIR Government Assignment in accordance with the R&D Thematic Plan, Topic No. 0481-2022-0007 “Identification of new genetic markers of properties of importance for breeding and new allelic variants of economically valuable genes in the gene pool of cultivated plants and their wild relatives using genomic and post-genomic technologies”.

For citation: Rakhmangulov R.S. Application of the CRISPR/Cas system for gene editing in ornamental crops. *Biotechnology and Plant Breeding*. 2022;5(3):33-41. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-3-01

Financial transparency. The author has no financial interest in the presented materials or methods. The author thanks the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer.

© Rakhmangulov R.S., 2022

Введение

На сегодняшний день декоративные растения, выращиваемые на срезку, а также садовые и комнатные цветковые растения, широко распространены по всему миру. Промышленное цветоводство для некоторых стран имеет весомое экономическое значение. Для России перспективы развития данной отрасли растениеводства также весьма благоприятны. Для интенсивного качественного развития данной отрасли необходимо корректное сочетание современных биотехнологических инструментов селекции с опытом отечественных селекционеров в области цветоводства (Rakhmangulov, Tikhonova, 2021).

Новейшим методом улучшения хозяйственно-ценных признаков растений является редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas, где CRISPR (англ. Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) – это адаптивная иммунная система у ряда бактерий, которая использует белок Cas (англ. CRISPR associated protein, CRISPR-ассоциированный белок) для запоминания, последующей проверки и разрезания чужеродной ДНК (Jinek et al., 2012; Heler et al., 2015). Cas позволяет расщеплять практически любую нуклеотидную последовательность, комплементарную управляющей РНК (Jinek et al., 2012). Использование данной системы позволило раздвинуть границы потенциальной внутривидовой изменчивости растений, а также свести к минимуму противоречия, сопряженные с получением трансгенных модифицированных растений (Rakhmangulov, Tikhonova, 2021). С открытием данного метода появилась возможность эффективной модификации генов для улучшения свойств многих видов растений путем направленного мутагенеза. Активное развитие системы генетического редактирования CRISPR/Cas обусловлено простотой использования программируемых нуклеаз, что ускоряет получение новых сортов растений с заданными характеристиками. Развитию направления генетического редактирования посредством системы CRISPR/Cas посвящено множество обзоров и методических статей, где сообщается об успешном редактировании генов ряда злаковых, овощных, плодовых, ягодных, а также некоторых декоративных культур (Khlestkina, Shumny, 2016; Kishi-Kaboshi et al., 2018; Tikhonova, Khlestkina, 2019; Kuluev et al., 2019; Strygina, Khlestkina, 2020; Wang et al., 2021; Rakhmangulov, Tikhonova, 2021). В настоящей работе представлен обзор достижений в области редактирования генома декоративных культур.

Анализ современного состояния селекции декоративных культур с помощью метода генетического редактирования CRISPR/Cas выполнен с использованием базы данных международного научного цитирования Scopus (Scopus, 2022). Отбор статей осуществляли по наличию слова CRISPR и наименования культуры в названиях, аннотациях и ключевых словах публикаций. В результате поиска с использованием названий 50 наиболее рас-

пространенных декоративных культур найдено 57 статей, среди которых отмечены двадцать пять публикаций для петунии, шесть для дендробиума, по три – для ипомеи, фаленопсиса, горечавки, по две – для львиного зева, розы, лилии, торении, пиона, и по одной – для гвоздики, хризантемы, каланхое, пуансеттии, табака обыкновенного. Не найдена информация для таких культур как астра, эустома, гербера, тагетес, цинния, виола, дендрантема, кларкия, перилла, василек, табак душистый, губастик, целлозия, гибискус, примула, подсолнечник, лаванда, эшшольция, сальвия, бегония, османтус, антуриум, дельфиниум, пенстемон, сенполия, вербена, ирис, маттиола, цикламен, нимфея, лотос, персик, гардения, рододендрон.

В последующий анализ были отобраны публикации, в которых отражены оригинальные результаты исследований с применением системы CRISPR/Cas. В итоге количество таких статей составило 26. Восемь из них посвящены редактированию генома петунии, по три публикации найдено для фаленопсиса и ипомеи, по две – для дендробиума, горечавки, лилии, торении, и по одной – для хризантемы, каланхое, пуансеттии, табака обыкновенного (рисунок). Также сформирован список модифицированных генов (таблица), в котором отражены названия видов растений и соответствующих им генов-мишеней, тип модификации генов, характер изменения фенотипа после модификации.

Изучение механизмов регуляции генов и оптимизация метода

В большинстве случаев найденные статьи можно разделить на три группы. В первую группу входят работы по изучению механизмов регуляции генов полезных признаков, а также посвященные оптимизации метода CRISPR/Cas в отношении конкретной культуры. Так, например, у петунии гибридной с помощью РНК-управляемой эндонуклеазы (RGEN) и рибонуклеопротеинов (RNP) произведено редактирование гена *PhNR* нитратредуктазы, отвечающего за ассимиляцию азота. В результате выявлены сайт-специфические мутации, подтверждающие эффективность прямой доставки рибонуклеопротеинов (Subburaj et al., 2016). С целью изучения генетических механизмов самонесовместимости у петунии *Petunia inflata* (R.E.Fr.) Wijsman был произведен нокаут гена *PiSSK1*, входящего в комплекс убиквитинлигазы *E3 SCF (Skp1-Cullin1-F-box)*. Это привело к ингибированию роста пыльцевых трубок у мутантных линий, имеющих нокаутированный ген *PiSSK1* в пыльце (Sun, Kao, 2018). Важное значение имеют работы по совершенствованию трансформации у полиплоидных декоративных растений. Одним из таких растений является гексаплоидная хризантема *Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl. В ходе этих экспериментов было произведено редактирование гена желто-зеленого флуоресцентного белка *Chiridius poppei* Giesbrecht (*CpYGFP*) у двух трансгенных линий хризантемы

C. × morifolium ‘Sei-Marin’, содержащих последовательность *CpYGFP*. В итоге получены каллусы мутантных линий с пониженной флуоресценцией (Kishi-Kaboshi et al., 2017). В другом исследовании подтверждена регуляторная роль генов *LpABCB21* (ATP-binding cassette (ABC) transporter B family) и *LpPILS7* (PIN-LIKES) в транспорте ауксина в процессе соматического эмбриогенеза *Lilium pumilum* DC. Fisch. (Song et al., 2020). Для выяснения функций генов, вовлеченных в САМ-путь фотосинтеза (Crassulacean Acid Metabolism – кислотного метаболизма по типу толстянковых), у модельного растения

M₂ Kalanchoe fedtschenkoi (Raym. – Hamet & H. Perrier) Lauz.-March) был осуществлен нокаут гена *KfePHOT2*, контролирующего работу фототропина 2, рецептора синего света, что позволило выяснить его значение для регуляции водного обмена, опосредованного устьицами, и фиксации CO₂ в зависимости от времени суток (Liu et al., 2019). Таким образом генетическое редактирование с помощью CRISPR/Cas имеет значительный потенциал как в изучении функции генов, так и в разработке набора инструментов для редактирования генома декоративных культур.

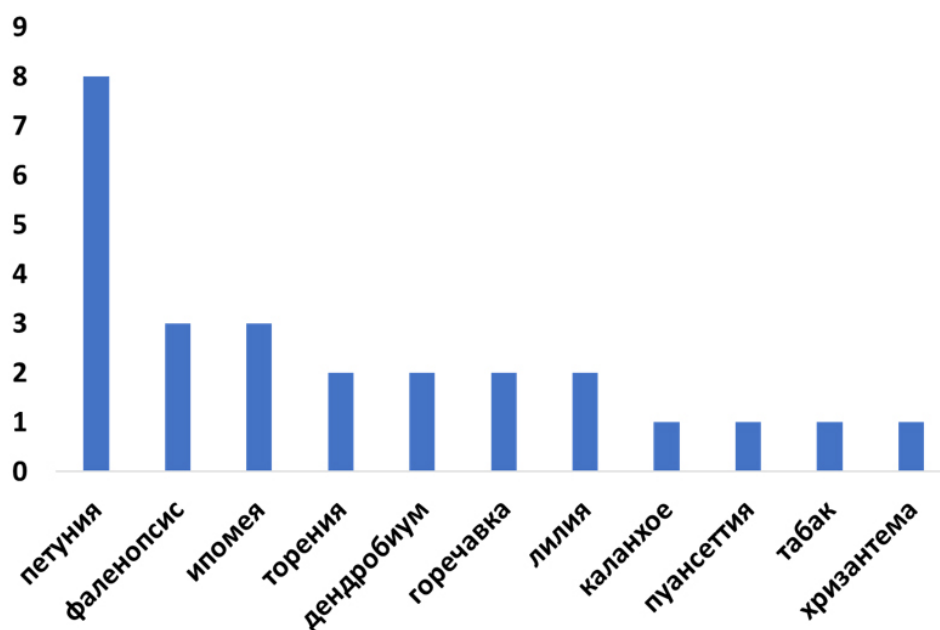


Рисунок. Число генов, модифицированных при помощи системы геномного редактирования CRISPR/Cas с целью улучшения полезных признаков декоративных культур.

Figure. The number of genes modified using the CRISPR/Cas genomic editing system to improve useful traits in ornamental crops.

Отдельно стоит отметить исследования по оптимизации генетического редактирования с помощью системы CRISPR/Cas среди представителей семейства орхидные (Orchidaceae Juss.), являющегося вторым по величине и лидирующим по популярности семейством цветковых растений. Так, метод CRISPR/Cas был нацелен на несколько генов *MADS*, ответственных за инициацию и развитие цветка фаленопсиса *Phalaenopsis* Blume (Tong et al., 2019), а также пяти генов-мишеней (*C3H*, *C4H*, *4CL*, *CCR* и *IRX*) в цепи биосинтеза лигноцеллюлозы у *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Kui et al., 2017). В другом исследовании с целью отработки метода CRISPR/Cas9 для последующего ускорения селекции был произведен нокаут модельного гена фитоендесатуразы *PDS3* у *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (Semiarti et al., 2020). С целью создания пестролистных

форм *P. amabilis* был осуществлен направленный мутагенез гена *VARIEGATA2* (*VAR2*). В результате была получена мутантная линия с бледно-желтоватой окраской листьев (Nopitasari et al., 2020). Подобным образом получены мутанты дендробиума крупнолистного *Dendrobium macrophyllum* A. Rich., однако мутации в виде замены в гене *VAR2* не привели к изменениям фенотипа (Setiawati et al., 2020).

Изменение окраски цветков и листьев

Во вторую группу включены работы, связанные с изучением возможности изменения различных типов окраски цветков и листьев. Для апробации метода CRISPR/Cas был впервые успешно отредактирован ген фитоендесатуразы *LpPDS* у двух видов лилий – *L. pumilum* DC

Таблица. Гены декоративных культур, модифицированные при помощи системы геномного редактирования CRISPR/Cas

Table. Ornamental crop genes modified using the CRISPR/Cas genomic editing system

Род/ Genus	Ген/ Gene	Характер изменения фенотипа/ Nature of phenotype change	Способ модификации гена/ Gene modification technique	Способ доставки/ Delivery mechanism	Эффективность/ Effectiveness, %	Ссылка/ Reference
Петунья <i>Petunia</i> Juss.	<i>ATG6</i>	преждевременное старение лепестков, снижение количества завязанных коробочек и семян	нокаут	Агробактериальная трансформация	57	Lin, Jones, 2022
	<i>AN4</i>	отсутствие жилкования в трубке венчика	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Zhang et al. 2021
	<i>F3H</i>	бледно-пурпурно-розовая окраска цветков	направленный мутагенез	ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов	9,99-26,27	Yu et al., 2021
	<i>ACO1, ACO3, ACO4</i>	снижение продукции этилена, увеличение продолжительности жизни цветка	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	8,96-14,92	Xu et al., 2021
	<i>NR</i>	дефицит усвоения нитратов	нокаут	ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов	2,2-21	Subburaj et al., 2016
	<i>SSK1</i>	совместимость мутантных линий	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Sun, Kao, 2018
	<i>PDS</i>	альбиносные линии	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	55,6–87,5	Zhang et al., 2016
Пуансеттия <i>Euphorbia</i> L.	<i>F3'H</i>	изменение окраски цветка	нокаут	Агробактериальная трансформация	5	Nitarska et al., 2021
Торения <i>Torenia</i> L.	<i>F3H</i>	бледно-голубая окраска цветка	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	80	Nishihara et al., 2018
	<i>PLE, FAR</i>	многолепестковость	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Sasaki, Ohtsubo, 2020.
Каланхое <i>Kalanchoe</i> Adans.	<i>PHOT2</i>	устычная проводимость, фиксация CO ₂	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Liu et al., 2019
Лилия <i>Lilium</i> L.	<i>PDS</i>	альбиносные линии	нокаут	Агробактериальная трансформация	4-29	Yan et al., 2019
	<i>ABCB2, 1PILS7</i>	транспорт ауксина	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	9,4-46,2	Song et al., 2020.
Горечавка <i>Gentiana</i> L.	<i>GST1</i>	белая и бледно-голубая окраска цветка	нокаут	Агробактериальная трансформация	13	Tasaki et al., 2020
	<i>5GT, 3'GT, 5/3'AT</i>	бледно-красные цветки фиолетовые тускло-розовые цветки бледно-лиловые цветки	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Tasaki et al., 2019
Табак <i>Nicotiana</i> L.	<i>PET</i>	махровые цветки	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Gattolin et al., 2020

Род/ Genus	Ген/ Gene	Характер изменения фенотипа/ Nature of phenotype change	Способ модификации гена/ Gene modification technique	Способ доставки/ Delivery mechanism	Эффективность/ Effectiveness, %	Ссылка/ Reference
Фаленопсис <i>Phalaenopsis</i> Blume	<i>PDS3</i>	альбиносные линии	нокаут	Агробактериальная трансформация	0,96	Semiarti et al., 2020
	<i>VAR2</i>	бледно-желтоватая окраска листьев	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	1,2-1,6	Nopitasari et al., 2020
	<i>MADS</i>	гетерозиготный геном, длительный ювенильный период	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	33,3-97,9	Tong et al., 2019
Дендробиум <i>Dendrobium</i> Sw.	<i>VAR2</i>	мутация в виде замены	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	0,66%	Setiawati et al., 2020
	<i>C3H</i> , <i>C4H</i> , <i>4CL</i> , <i>CCR</i> , <i>IRX</i>	сверхэкспрессия	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	6,7-33,3	Kui et al., 2017
Хризантема <i>Chrysanthemum</i> L.	<i>YGFP</i>	мутация в последовательности	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	4,2-33,3	Kishi-Kaboshi et al., 2018
Ипомея <i>Ipomoea</i> L.	<i>CCD</i>	бледно-желтые цветки	нокаут	Агробактериальная трансформация	-	Watanabe et al., 2018
	<i>EPH1</i>	задержка старения лепестков	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	100	Shibuya et al., 2018
	<i>DFR-B</i>	белый окраска цветка, зеленая окраска стебля	направленный мутагенез	Агробактериальная трансформация	75	Watanabe et al., 2017

и *L. longiflorum* Thunb. ‘White Heaven’ и в результате получены мутантные формы с измененным фенотипом (белой, бледно-желтой, бело-зеленой окраской листьев у трансформантов) (Yan et al., 2019). В результате редактирования гена *PDS* петунии ‘Mitchell Diploid’ (MD) получены мутантные линии с белой, мозаичной и зеленой окраской побегов (Zhang et al., 2016).

В стремлении получить оранжевую окраску прицветников у красноцветущей пуансеттии ‘Christmas Eve’ (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch), с применением CRISPR/Cas9 был произведен нокаут гена флавоноид-3'-гидроксилазы *F3'H* (Nitarska et al., 2021). В другом исследовании осуществлен направленный мутагенез гена дигидрофлавонолредуктазы *DFR-B* ипомеи *Ipomoea nil* (L.) Roth и получены мутантные линии с белыми и бледно-фиолетовыми цветками, с зелеными стеблями (у исходного растения были фиолетовые цветки и стебли) (Watanabe et al., 2017). Далее с целью получения истинно желтой окраски цветков произведено редактирование гена *InCCD* диоксигеназы, ответственной за расщепление каротиноидов у белоцветковой формы ипомеи. Это привело к 20-кратному увеличению содержания каротинои-

дов в лепестках растений, отредактированных с помощью CRISPR/Cas. В результате растения-регенеранты получили бледно-желтую окраску (Watanabe et al., 2018). За счет воздействия на ген *F3H* флаванон-3-гидроксилазы у *Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn. с высокой эффективностью были получены формы с бледно-голубой окраской цветков. Таким фенотипом характеризовалось порядка 80% линий, полученных из растений-регенерантов (Nishishara et al., 2018). Сообщается, что в результате сайт-специфического мутагенеза в последовательностях генов *F3HA* и *F3HB* сорта ‘Madness Midnight’ *Petunia* × *hybrida* получена мутантная линия с бледно-пурпурно-розовой окраской цветков – двойной мутант *f3ha f3hb* (Yu et al., 2021).

Влияние двух генов, а именно *DEEP PURPLE (DPL)* и *ANTHOCYANIN4 (AN4)*, ответственных за синтез антоциана, на характер жилкования трубки венчика петунии было изучено с использованием системы CRISPR/Cas9 и инбредных линий MD. Установлено, что этот признак определяется фактором транскрипции R2R3-MYB гена *AN4*, но не *DPL*, поскольку нокаут *AN4* у соответствующих линий приводил к отсутствию жилкования на трубке

венчика (Zhang et al., 2021). Нокаут генов антоцианового ряда привел к изменению синей окраски цветков у горечавки японской *Gentiana triflora* Pall. × *Gentiana scabra* Bunge (сорт 'Albireo'): гена *Gt5GT*, кодирующего антоцианин-5-О-гликозилтрансферазу, на бледно-красно-фиолетовую, *Gt3'GT* – гена антоцианин-3'-О-гликозилтрансферазы – на тускло-розовую, гена *Gt5/3'AT*, отвечающего за синтез антоцианин-5/3'-ароматической ацилтрансферазы, – на бледно-лиловую (Tasaki et al., 2019). В последующей работе нокаут гена глутатион S-трансферазы (*GST1*) привел к изменению окраски цветков горечавки до белой и бледно-голубой (Tasaki et al., 2020).

Увеличение продолжительности жизни цветка, изменение его структуры

К третьей группе исследований отнесены работы по увеличению продолжительности жизни цветка и направленные на получение форм с махровыми цветками. Так, для изучения роли аутофагии в увеличении продолжительности жизни цветков у инбредной линии петунии MD P. × *hybrida* был произведен нокаут ключевого гена *ATG6* (*Autophagy Gene 6*) – негативного регулятора увядания лепестков. У мутантных линий с нокаутированным геном *PhATG6* наблюдали нарушения в ремобилизации питательных веществ; более ранняя индукция генов биосинтеза этилена *PhACS* и *PhACO1* приводила к ранней экспрессии генов цистеиновой протеазы *PhCP10* и переносчика фосфата *PhPT1*. Мутанты по гену *PhATG6* характеризовались ускоренным старением лепестков, снижением числа завязавшихся семенных коробочек и семян (Lin, Jones, 2022). В изучении продолжительности жизни цветка в ряде работ продемонстрирована роль генов *PhACO1*, *PhACO3*, *PhACO4*, кодирующих фермент биосинтеза этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидазу. Редактирование генов *PhACO1*, *PhACO3*, *PhACO4* у петунии 'Mirage Rose' привело к снижению продукции этилена в 1,5 раза и 2,8-3 раза в пестиках и венчиках соответственно, а также к повышенной продолжительности жизни цветков мутантных линий до 8-9,5 дней по сравнению с 6 днями у исходной линии (Xu et al., 2021).

Интересными представляются работы, связанные с изучением признака махровости цветка. Одновременный нокаут двух генов *MADS*-box класса C: *PLENA* (*PLE*) и *FALINELLI* (*FAR*) у сортов торении *T. fournieri* 'Crown Violet' и 'Crown White' привел к получению регенерантов с многолепестковыми цветками (Sasaki, Ohtsubo, 2020). С этой же целью был произведен нокаут гена *PETALOSA* (*PET*) у *Nicotiana tabacum* L., в результате чего у мутантной линии развились дополнительные петаловидные структуры (Gattolin et al., 2020).

Заключение

Таким образом, продемонстрирована применимость метода генетического редактирования CRISPR/Cas к различным видам декоративных культур. С помощью данного метода возможно решить дискуссионную проблему безопасности генетически модифицированных организмов (Tong et al., 2020). Тем не менее, все еще необходимы обширные исследования для оценки данной методики на других видах растений для расширения области применения (Zhang et al., 2016). Среди сложностей, с которыми придется столкнуться при редактировании генов декоративных культур, следует отметить полиплоидию, отсутствие информации о геноме, затруднения при получении жизнеспособных протопластов, низкий регенерационный потенциал в культуре *in vitro*.

В целом применение генетического редактирования CRISPR/Cas становится экономически эффективным инструментом редактирования генома различных растений. Совершенствование метода представляет большие перспективы для появления новых сочетаний признаков, которые невозможно было бы достичь с помощью традиционных методов селекции. Также данный метод способен обеспечить необходимые качественные преобразования для ускорения селекционного процесса.

References / Литература

- Gattolin S., Cirilli M., Chessa S., Stella A., Bassi D., Rossini L. Mutations in orthologous *PETALOSA* *TOE*-type genes cause a dominant double-flower phenotype in phylogenetically distant eudicots. *Journal of Experimental Botany*. 2020;71(9):2585-2595. DOI: 10.1093/jxb/eraa032
- Heler R., Samai P., Modell J.W., Weiner C., Goldberg G.W., Bikard D., Marraffini L.A. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*. 2015;519(7542):199-202. DOI: 10.1038/nature14245
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.A. Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
- Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(7):774-787. [in Russian] (Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. *Генетика*. 2016;52(7):774-787). DOI: 10.7868/S0016675816070055
- Kishi-Kaboshi M., Aida R., Sasaki K. Generation of gene-edited chrysanthemum morifolium using multicopy transgenes as targets and markers. *Plant Cell Physiology*. 2017;58(2):216-226. DOI: 10.1093/pcp/pcw222
- Kui L., Chen H., Zhang W., He S., Xiong Z., Zhang Y., Yan L., Zhong C., He F., Chen J., Zeng P., Zhang G., Yang S., Dong Y., Wang W., Cai J. Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale*. *Frontiers in Plant Science*. 2017;7:2036. DOI: 10.3389/fpls.2016.02036
- Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Gumerova G.R., Vershinina Z.R., Matniyazov R.T., Akhmetzyanova L.U., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Gubaydullin I.M., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Some novelties in CRISPR/Cas

- genome editing and related areas. *Biomics*. 2019;11(3):315-343. [In Russian] (Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Гумерова Г.Р., Вершинина З.Р., Матниязов Р.Т., Ахметзянова Л.У., Князев А.В., Михайлова Е.В., Гарафутдинов Р.Р., Баймиев А.Н.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев А.Л.Х., Чемерис А.В. Некоторые новшества в CRISPR/Cas геномном редактировании и в смежных областях. *Биомика*. 2019;11(3):315-343). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27
- Lin Y., Jones M.L. CRISPR/ Cas9-mediated editing of autophagy gene 6 in *Petunia* decreases flower longevity, seed yield, and phosphorus remobilization by accelerating ethylene production and senescence-related gene expression. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:840218. DOI: 10.3389/fpls.2022.840218
- Liu D., Chen M., Mendoza B., Cheng H., Hu R., Li L., Trinh C.T., Tuskan G.A., Yang X. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis for functional genomics research of crassulacean acid metabolism plants. *Journal of Experimental Botany*. 2019;70(22):6621-6629. DOI: 10.1093/jxb/erz415
- Nishihara M., Higuchi A., Watanabe A., Tasaki K. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biology*. 2018;18:331. DOI 10.1186/s12870-018-1539-3
- Nitarska D., Boehm R., Debener T., Lucaciu R.C., Halbwirth H. First genome edited poinsettias: targeted mutagenesis of flavonoid 3'-hydroxylase using CRISPR/Cas9 results in a colour shift. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2021;147:49-60. DOI: 10.1007/s11240-021-02103-5
- Nopitasari S., Setiawati Y., Lawrie M.D., Purwantoro A., Widada J., Sasongko A.B., Yoshioka Y., Matsumoto S., Ninomiya K., Asano Y., Semiarti E. Development of an agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 for *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume genome editing system. *The 6th International Conference on Biological Science ICBS. AIP Publishing*. 2020;2260:060014-1-060014-10. DOI: 10.1063/5.0015868
- Rakhmangulov R.S., Tikhonova N.G. Breeding of ornamental plants in Russia. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(4):40-54. [In Russian] (Рахмангулов Р.С., Тихонова Н.Г. Селекция декоративных растений в России. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(4):40-54). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-04
- Sasaki K., Ohtsubo N. Production of multi-petaled *Torenia fournieri* flowers by functional disruption of two class-C MADS-box genes. *Planta*. 2020;251:101. DOI: 10.1007/s00425-020-03393-3
- Scopus, Elsevier's abstract and citation database. Available from: <https://www.scopus.com/search/form.uri?zone=TopNavBar&origin=sbrowse&display=basic#basic> [accessed July 05, 2022]
- Semiarti E., Nopitasari S., Setiawati Y., Lawrie M.D., Purwantoro A., Widada J., Ninomiya K., Asano Y., Matsumoto S., Yoshioka Y. Application of CRISPR/Cas9 genome editing system for molecular breeding of orchids. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 2020;25(1):61-68. DOI: 10.22146/ijbiotech.39485
- Setiawati Y., Nopitasari S., Lawrie M.D., Purwantoro A., Widada J., Sasongko A.B., Ninomiya K., Asano Y., Matsumoto S., Yoshioka Y., Semiarti E. Agrobacterium-mediated transformation facilitates the CRISPR/Cas9 genome editing system in *Dendrobium macrophyllum* A. Rich. Orchid. *The 6th International Conference on Biological Science ICBS. AIP Publishing*. 2020;2260:060016-1-060016-9. DOI: 10.1063/5.0016200
- Shibuya K., Watanabe K., Ono M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the EPHMERAL1 locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;131:53-57. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.036
- Song S., Yan R., Wang C., Wang J., Sun H. Improvement of a genetic transformation system and preliminary study on the function of *LpABCB21* and *LpPILS7* based on somatic embryogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6784. DOI: 10.3390/ijms21186784
- Strygina K.V., Khlestkina E.K. Wheat, barley and maize genes editing using the CRISPR/Cas system. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):46-56. [In Russian] (Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Редактирование генов пшеницы, ячменя и кукурузы с использованием системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):46-56). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-02
- Subburaj S., Chung S.J., Lee C., Ryu S.-M., Kim D.H., Kim J.-S., Bae S., Lee G.-J. Site-directed mutagenesis in *Petunia hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*. 2016;35:1535-1544. DOI: 10.1007/s00299-016-1937-7
- Sun L., Kao T.-H. CRISPR/Cas9-mediated knockout of PiSSK1 reveals essential role of S-locus F-box protein-containing SCF complexes in recognition of non-self S-RNases during cross-compatible pollination in self-incompatible *Petunia inflata*. *Plant Reproduction*. 2018;31:129-143. DOI: 10.1007/s00497-017-0314-1
- Tasaki K., Higuchi A., Watanabe A., Sasaki N., Nishihara M. Effects of knocking out three anthocyanin modification genes on the blue pigmentation of gentian flowers. *Scientific Reports*. 2019;9:15831. DOI: 10.1038/s41598-019-51808-3
- Tasaki K., Yoshida M., Nakajima M., Higuchi A., Watanabe A., Nishihara M. Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biology*. 2020;20:370. DOI: 10.1186/s12870-020-02565-3
- Tikhonova N.G., Khlestkina E.K. Genetic editing for improvement of fruit and small fruit crops. *Horticulture and viticulture*. 2019;(44):10-15. [In Russian] (Тихонова Н.Г., Хлесткина Е.К. Генетическое редактирование для улучшения плодовых и ягодных культур. *Садоводство и виноградарство*. 2019;(44):10-15). DOI: 10.31676/0235-2591-2019-4-10-15
- Tong C.-G., Wu F.-H., Yuan Y.-H., Chen Y.-R., Lin C.-S. High-efficiency CRISPR/Cas-based editing of *Phalaenopsis* orchid MADS genes. *Plant Biotechnology Journal*. 2020;18:889-891. DOI: 10.1111/pbi.13264
- Watanabe K., Kobayashi A., Endo M., Ono K.S., Toki S., Ono M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (*DFR-B*) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Scientific Reports*. 2017;7:10028. DOI: 10.1038/s41598-017-10715-1
- Watanabe K., Oda-Yamamizo C., Sage-Ono K., Ohmiya A., Ono M. Alteration of flower colour in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research*. 2018;27:25-38. DOI: 10.1007/s11248-017-0051-0
- Xu J., Naing A.H., Bunch H., Jeong J., Kim H., Kima C.K. Enhancement of the flower longevity of petunia by CRISPR/Cas9-mediated targeted editing of ethylene biosynthesis genes. *Postharvest Biology and Technology*. 2021;174:111460. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2020.111460
- Yan R., Wang Z., Ren Y., Li H., Liu N., Sun H. Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20:2920. DOI: 10.3390/ijms20122920
- Yu J., Tu L., Subburaj S., Bae S., Lee G.-J. Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*. 2021;40:1037-1045. DOI: 10.1007/s00299-020-02593-1
- Zhang B., Xu X., Huang R., Yang S., Li M., Guo Y. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutation reveals a role for *AN4* rather than *DPL* in regulating venation formation in the corolla tube of *Petunia hybrida*. *Horticulture Research*. 2021;8:116. DOI: 10.1038/s41438-021-00555-6
- Zhang B., Yang X., Yang C., Li M., Guo Y. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. *Scientific Reports*. 2016;6:1-8. DOI: 10.1038/s41598-016-0001-8

Информация об авторах

Рахмангулов Руслан Султанович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория постгеномных исследований, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, r.rakhmangulov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1200-3113>

Information about the authors

Ruslan S. Rakhmangulov, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Postgenomic Research, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, r.rakhmangulov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1200-3113>

Вклад авторов: автор сделал свой вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the author made his contribution to this article.

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the author declares no conflict of interests.

Статья поступила в редакцию 18.07.2022; одобрена после рецензирования 10.08.2022; принята к публикации 25.08.2022

The article was submitted 18.07.2022; approved after reviewing 10.08.2022; accepted for publication on 25.08.2022.