

УДК 581.1.577.21

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

© 2022 г. Б. Р. Кулueв^{a, b, *}, Е. В. Михайлова^{a, b}, А. Р. Кулueв^a,
А. А. Галимова^{a, b}, Е. А. Заикина^a, Е. К. Хлесткина^b

^aИнститут биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

^bВсероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,
Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 22.05.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

К трибе Triticeae (Пшеницевые) относятся такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как пшеница мягкая, пшеница твердая, ячмень, рожь и тритикале. Исследования в области обратной генетики и геномной инженерии Пшеницевых получили новый импульс, когда началось активное применение системы геномного редактирования CRISPR/Cas. В настоящем обзоре собраны и проанализированы данные о недавних успехах геномного редактирования культурных растений трибы Triticeae и используемом для этого инструментарии. Наиболее часто в геномном редактировании Пшеницевых используют оптимизированный по составу кодонов ген *Cas9* под контролем промотора гена убиквитина кукурузы и направляющие РНК под контролем промоторов U6 и U3 РНК-полимеразы III в составе одного или нескольких бинарных векторов. В качестве селективных генов используются гены устойчивости к фосфинотрицину и гигромицину. Редактированные растения получают с помощью методов агробактериальной трансформации и биобаллистики, в качестве эксплантов используют незрелые зародыши. Разрабатываются подходы, направленные на преодоление низкой регенеративной способности представителей трибы Пшеницевые: трансформация апикальных меристем побега *in planta*, микроспор и пыльцевых зерен, а также использование гаплоиндукторов. Большая часть опубликованных на сегодняшний день работ посвящена геномному редактированию пшеницы мягкой и ячменя, хотя описано проведение нокаута целевых генов пшеницы твердой и тритикале методом CRISPR/Cas. Дальнейший прогресс в развитии геномного редактирования культурных растений трибы Пшеницевые должен быть направлен на расширение спектра видов и сортов, а также преодоление проблем низкой способности к регенерации, что позволит проводить работы по генетической модификации элитных сортов, которые будут востребованы в сельскохозяйственном производстве.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Triticum durum*, × *Triticosecale*, пшеница мягкая, ячмень, промоторы, селективный ген, агробактериальная трансформация, незрелые зародыши, микроспоры, гаплоиндукторы

DOI: 10.31857/S0026898422060155

ВВЕДЕНИЕ

К трибе Пшеницевые (Triticeae Dumort.) относятся такие важнейшие для всего человечества злаковые культуры, как пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.), ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.), рожь (*Secale cereale* L.), пшеница твердая

(*Triticum durum* Desf.), тритикале (× *Triticosecale* Wittm. ex A.Camus) и некоторые другие виды. Пшеницу мягкую — основную сельскохозяйственную культуру, потребляют более 30% населения Земли [1]. Эта культура обеспечивает примерно 20% калорий суточного рациона человека [2]. Четвертой по значимости зерновой культурой после пшеницы мягкой, риса и кукурузы является ячмень [3]. К ключевым зерновым культурам в России и ряде других стран относятся также рожь, тритикале и пшеница твердая.

Многообразие экологических условий возделывания зерновых культур, в частности пшени-

Сокращения: DSB (Double-Strand Breaks) — двухцепочечные разрывы; HDR (Homology Directed Repair) — гомологичная репарация; NHEJ (Non-Homologous End Joining) — негомологичное соединение концов; гРНК (guide RNA) — направляющая, или гидовая РНК; PAM (Protospacer Adjacent Motif) — мотив, прилегающий к протоспейсеру.

цы, непредсказуемость погодных явлений, давление со стороны биотических стрессоров, антропогенных факторов и пестицидной нагрузки требуют большого разнообразия генофонда возделываемых сортов, в связи с чем актуальным становится ускорение темпов селекции. Так, в Национальном центре зерна имени П.П. Лукьяненко (Краснодар) за последние несколько лет (2014–2020) интенсивность создания сортов выросла почти в 10 раз в сравнении с периодом с 1913 по 1973 гг. [4]. Срок создания каждого сорта за это время также сократился, в том числе за счет отбора, контролируемого с помощью маркеров. Однако несмотря на развитие и разнообразие методов, применяемых в селекции, создание новых сортов происходит главным образом на основе комбинирования существующих в природе вариантов генов того же самого или близких видов растений [5]. Определенного прогресса в расширении аллельного разнообразия генов зерновых культур удалось добиться в результате внедрения методов химического и радиационного мутагенеза [6, 7]. Эффективным методом увеличения генетического разнообразия целого ряда культур стало применение генетической трансформации. Однако пшеница и родственные ей виды являются культурами, довольно сложными для генетической трансформации [8]. Основную проблему представляет то, что агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*, широко используемые для генетической трансформации двудольных растений, в природе не инфицируют однодольные. Поэтому для трансформации однодольных в первое время использовали исключительно метод биобаллистики, менее эффективный, чем агробактериальная трансформация. Однако уже в 1997 году впервые разработали высокоэффективную методику агробактериальной трансформации мягкой пшеницы [9], после чего эти методы совершенствовались, а для ячменя стали уже классическими. Вторую проблему при генетической трансформации представителей трибы Пшеницевые представляет их очень низкая способность к регенерации в культуре *in vitro*. Эта проблема решена лишь отчасти, в основном путем постоянного поиска наиболее эффективно регенерирующих сортов и выбором подходящих эксплантов и состава питательной среды. В качестве эксплантов, пригодных для трансформации представителей трибы Пшеницевые, чаще всего выбирают незрелые зародыши [8], но даже при работе с ними возникают проблемы с уровнем регенерации. Среди сортов ячменя эффективным оказался Golden Promise, ставший хорошим модельным сортом для фундаментальных исследований. Однако использование модельных сортов (в случае ячменя основными объектами генно-инженерных исследований до сих пор остаются Golden Promise и Igr1, несмотря на многократные попытки расширить круг исполь-

зуемых генотипов [10–12]), не снимает проблему практического применения методов генной инженерии, где в качестве объектов трансформации должны выступать разнообразные коммерческие сорта. Определенный выход из ситуации появился с открытием генов *TFA* (*transformation amenability*) ячменя. Предложено на ранних этапах селекции использовать Golden Promise в качестве донора генов *TFA1*, *TFA2* и *TFA3*, проводить маркер-контролируемый отбор потомства от скрещиваний с коммерческими сортами, чтобы перспективный селекционный материал обладал свойством *transformation amenability*, как и модельные сорта [13]. Таким образом, не прекращается поиск способов повышения эффективности трансформации и регенерации представителей трибы Пшеницевые.

На сегодняшний день создано, в том числе с использованием нуклеаз ZFN [14] и TALEN [2], немалое число трансгенных и отредактированных растений трибы Triticeae с хозяйственно-ценными признаками. Однако настоящей революцией стала разработка метода геномного редактирования CRISPR/Cas, где место действия редактирующей нуклеазы определяет короткая направляющая, или гидовая РНК (нРНК). Система CRISPR/Cas имеет ряд преимуществ перед методами ZFN/TALEN, включая больший ассортимент целевых сайтов, простоту создания генно-инженерных конструкций, возможность мультиплексного нокаута [15].

Системы CRISPR/Cas, состоящие из белка Cas и нРНК, вносят в мишени двухцепочечные разрывы (DSB), что приводит к индукции эндогенных механизмов репарации, которые могут зависеть от пути репарации и наличия или отсутствия донорной ДНК. Присутствие донорной ДНК, сходной с областью-мишенью, может способствовать направляемой гомологией репарации (HDR), тогда как отсутствие гомологичной донорной ДНК способствует репарации путем негомологичного соединения концов (NHEJ), которое подвержено ошибкам и приводит к случайным заменам нуклеотидов или же к коротким вставкам и делециям (инделям). нРНК можно подобрать практически к любому участку генома. При этом нужно учитывать, что для связывания нуклеазы критично присутствие мотива PAM с одной стороны выбранного участка редактирования (протоспейсера). Для SpCas9 последовательность PAM – это NGG с 5'-конца, для FnCas12a – TTN с 3'-конца, другие нуклеазы Cas также имеют свои особенности [16]. Cas9 обычно расщепляет ДНК на три нуклеотида выше PAM, тогда как Cas12b – в промежутке от 12 до 24 н. после PAM [5, 17].

Ввиду того, что с каждым годом появляется все больше экспериментальных работ, посвященных

геномному редактированию злаковых культур, возникает необходимость в обобщении и осмыслении полученных данных, а также в сравнении эффективности используемого инструментария. Большая часть экспериментальных работ, проведенных на культурных видах семейства Злаковые, выполнена на растениях риса и кукурузы – сельскохозяйственных культурах, ключевых для стран Азии и Центральной Америки соответственно. Но для многих стран, включая Россию, наибольшее значение имеют злаковые культуры трибы Пшеницевые. Геномное редактирование растений этой группы, например, редактирование ячменя и мягкой пшеницы с помощью системы CRISPR/Cas рассмотрено в нескольких обзорах [18–20]. В нашем обзоре проанализированы данные об успехах геномного редактирования культурных растений трибы Triticeae и используемом для этого инструментарии.

ПОДБОР НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

К важной составляющей технологии CRISPR/Cas относится выбор мишеней – конкретных нуклеотидных последовательностей (протоспейсеров) – в намеченных для редактирования генах, сопряженный с дизайном нРНК с использованием специализированных компьютерных программ. Правила подбора нРНК и используемые для этого компьютерные программы опубликованы ранее [21, 22]. Для подбора нРНК с целью редактирования геномов Пшеницевых можно использовать большинство существующих программ. Однако имеются и специализированные программы, например, программа WheatCrispr ориентирована на дизайн нРНК исключительно для редактирования генома пшеницы мягкой. В этой программе для поиска протоспейсеров необходимо выбрать конкретный редактируемый ген из созданной усилиями International Wheat Genome Sequencing Consortium базы данных IWGSC RefSeq assembly (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies>) или самостоятельно ввести последовательность. Результаты ранжируются по общей эффективности редактирования с учетом возможных нецелевых сайтов. Учитывая, что пшеница мягкая имеет аллогексаплоидный геном, можно искать протоспейсеры в гомологичных последовательностях всех трех субгеномов: В, А и D, выбрав соответствующую опцию. Еще одна опция этой программы позволяет выбрать участок редактирования – кодирующие области или промоторы.

Многие компьютерные программы позволяют проводить поиск нецелевых участков, если геном организма депонирован в базу данных, например, геномы пшеницы мягкой и ячменя доступны в таких программах, как E-CRISP ([\[org/E-CRISP/\]\(http://www.e-crisp.org/E-CRISP/\)\) \[23\], CRISPRdirect \(<http://crispr.dbcls.jp>\) \[24\], DESKGEN \(<https://www.deskgen.com/landing/cloud>\) \[25\]. Однако на сегодняшний день наиболее предпочтительно использовать компьютерные программы по подбору нРНК, имеющие доступ к базе данных Ensembl. К примеру, программы Breaking Cas \(<http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>\), CLD \(<https://github.com/boutros/cld>\), Synthego CRISPR Design Tool \(<https://design.synthego.com/#/>\) работают совместно с базой Ensembl. Большинство новых программ по подбору нРНК имеют доступ к Ensembl.](http://www.e-crisp-</p></div><div data-bbox=)

В последнее время серьезное внимание при подборе нРНК стали уделять локализации редактируемых мест генома в эу- или гетерохроматиновых участках, так как от этого зависит эффективность процесса редактирования [22]. Особенно это актуально для полиплоидных видов трибы Пшеницевые. Так, web-ресурс CROP-IT (CRISPR/Cas9 Off-target Prediction and Identification Tool) [26] (<http://www.adlilab.org/CROP-IT/cas9tool.html>) рассчитан на дизайн нРНК и выявление потенциальных нецелевых сайтов редактирования с учетом состояния хроматина в этих местах.

Необходимо также учитывать наличие функционально заменяемых гомеологичных генов у представителей трибы Пшеницевые, имеющих полиплоидный геном, поэтому для полного нокаута следует подбирать нРНК, нацеленные на консервативные участки целевых генов [1]. С целью повышения эффективности геномного редактирования для нокаута одного гена могут быть отобраны до пяти разных нРНК [27].

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ВИДОВ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Для трансформации клеток с целью получения трансгенных растений используют, как правило, векторы, содержащие область Т-ДНК, которая переносится в геном растений при агробактериальной трансформации. В пределах Т-области обычно располагаются минимум три последовательности с необходимыми регуляторными элементами, обеспечивающими их экспрессию: нРНК, ген *Cas9* и ген селективного маркера, позволяющего произвести отбор трансформантов [5]. При бомбардировке золотыми (вольфрамовыми) частицами можно использовать молекулярные векторы без Т-границ.

Ассортимент инструментов, используемых в работах по геномному редактированию Пшеницевых, остается относительно небольшим. В геномном редактировании растений применяют ген *Cas*, оптимизированный по составу кодонов для однодольных или двудольных растений. Эффективность редактирования с помощью опти-

мизированного таким образом гена *Cas* выше, чем при использовании гена *Cas*, оптимизированного для человека [28–30].

В подавляющем большинстве случаев ген *Cas9* находится под контролем промотора *ZmUbi* (ген убиквитина кукурузы) [2, 27, 31–33]. Крайне редко с этой целью используют другие промоторы, например промоторы *TaUbi* (ген убиквитина пшеницы) [34], *OsUbi* (ген убиквитина риса) [35] или *35S CaMV* (вирус мозаики цветной капусты) [30]. Промотор *35S CaMV* не получил распространения в геномном редактировании пшеницы, хотя довольно часто применяется в классической геномной инженерии [36].

Большее разнообразие характерно для применяемых в геномном редактировании Пшеницевых промоторов, контролирующих экспрессию нРНК. Так, сравнивают промоторы *U6* и *U3* РНК-полимеразы (*Pol*) III, в том числе из разных видов растений [37, 38]. Среди промоторов *TaU3* и *TaU6* пшеницы, а также *OsU3* и *OsU6* риса наиболее эффективным оказался *TaU3* [39]. Но наибольшую эффективность редактирования Пшеницевых, по всей видимости, обеспечивают промоторы *Pol* II. При использовании промотора вируса желтого скручивания листьев цеструма (*SmYLCV*) для полицистронной экспрессии нРНК, расщепляемых рибозимами, эффективность геномного редактирования пшеницы возросла более чем в 4 раза [40]. Промотор гена актина риса успешно применили для полицистронной экспрессии нРНК, расщепляемых РНКазами (система *tRNA-gRNA*), благодаря чему удалось создать единую мультиплексную конструкцию для 15 мишеней, причем эффективность редактирования достигала 75% [41].

В случае геномного редактирования *H. vulgare* нРНК экспрессировали с использованием промоторов *TaU6* пшеницы [42, 43], *OsU6* риса [27], а также *HvU3* ячменя [44, 45]. При этом ген *Cas9* во всех этих исследованиях находился под контролем промотора *ZmUbi* кукурузы.

В качестве селективного гена используют либо *bar* (ген устойчивости к фосфинотрицину/глюкофосинату) [2, 46], либо *hptII* (ген устойчивости к гигромицину) [27, 47, 48]. Другие селективные гены при геномном редактировании Пшеницевых не применяли. В ряде случаев применяют селективные гены, которые дополняют репортерными генами, кодирующими флуоресцентные белки, такие как GFP [49] и DsRed [47].

Таким образом, можно констатировать, что в геномном редактировании Пшеницевых используется весьма скромный набор промоторов, особенно в случае гена *Cas*. Более того, в классической геномной инженерии известно не так много растительных конститутивных промоторов, которые могли бы эффективно работать у Пшени-

цевых [50]. К наиболее хорошо изученным относятся промоторы генов актина (*Act1*) и алкогольдегидрогеназы (*Adh1*) [51]. Для трансформации пшеницы предлагались также промоторы палочковидного баднавируса сахарного тростника *Sc-BV* [52], вируса карликовости пшеницы (*WDV*) и LIR-промотор *WDV* [31], но они не получили широкого распространения.

Сравнительно небольшой набор инструментов, применяемых в геномном редактировании пшеницы, можно объяснить использованием традиционных “пустых” векторов и векторных систем с ограниченным набором промоторов [16, 53–70]. Поэтому актуальными остаются исследования, направленные на увеличение ассортимента доступных средств геномного редактирования Пшеницевых.

СПОСОБЫ ДОСТАВКИ КОМПОНЕНТОВ CRISPR/Cas И МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Процесс получения трансгенных однодольных растений достаточно длительный и трудоемкий, поэтому при планировании эксперимента по редактированию генома имеет смысл сначала протестировать редактирующую систему на популяции клеток (например, на протопластах или каллусах) при помощи транзientной экспрессии [5]. Это позволяет быстро оценить эффективность разных вариантов генетических конструкций и выбрать наиболее подходящие для продолжения эксперимента и получения трансгенных растений. Именно поэтому во многих исследованиях эффективность генно-инженерных конструкций проверяют на протопластах [38]. Более того, результаты многих работ по геномному редактированию представителей трибы Пшеницевые публикуются на стадии проточки эффективности конструкций в протопластах [32, 49, 58].

При получении стабильных трансформантов или “нокаутных” растений без трансгенов в качестве эксплантов для генетической трансформации Пшеницевых чаще всего используют незрелые зародыши (табл. 1). Компоненты CRISPR/Cas в геном мягкой пшеницы часто доставляют с помощью бомбардировки золотыми частицами [1, 56]. Однако достаточно часто применяют и агробактериальную трансформацию [38, 48, 63]. Более того, подавляющее большинство экспериментов по геномному редактированию ячменя связано с использованием агробактерий [35, 45, 69]. Не прекращаются работы по повышению эффективности методов генетической трансформации и регенеративной способности эксплантов Пшеницевых. Например, разработана надежная и воспроизводимая система трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, которая позволила добиться 33%-ной эффективности

трансформации пшеницы мягкой. В качестве исходного материала использовали незрелые зародыши, которые центрифугировали перед агробактериальной инокуляцией [71].

Широкое распространение получили также способы доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки растений с использованием вирусов растений, позволяющих существенно увеличить наработку нРНК и Cas-нуклеазы, а при необходимости и донорной ДНК, и повысить эффективность редактирования [72, 73]. Gil-Humanes и соавт. [31] разработали на основе репликаонов систему генетического редактирования зерновых культур с использованием WDV. Использованный в этой работе вектор pWDV2, содержащий как ген *Cas9*, так и нРНК, оказался в 12 раз эффективнее других векторов. Обычно компоненты CRISPR/Cas при использовании вирусных векторов в геном не встраиваются.

Чтобы избежать интеграции чужеродной ДНК в процессе редактирования генома, разработан также подход, в котором используется готовый РНП-комплекс из соответствующей Cas-нуклеазы и нРНК, сорбированных на золотых частицах, доставку которых осуществляли с помощью биобаллистики [72]. На примере пшеницы мягкой показано, что использование РНП снижает вероятность нецелевых мутаций, которые могут возникать при интеграции компонентов CRISPR/Cas в геном. Поскольку при редактировании генома, опосредованном РНП, чужеродная ДНК не используется, полученные мутанты не содержат трансгенов [74]. Разработан также подробный протокол геномного редактирования пшеницы мягкой с помощью биобаллистической рибонуклеопротеидной трансформации [75].

Одной из самых трудноразрешимых проблем при генетической трансформации Пшеницевых остается низкий уровень регенерации и невозможность геномного редактирования многих элитных сортов. Одним из подходов, направленных на решение этой проблемы, можно назвать бомбардировку золотыми частицами апикальных меристем побега *in planta* (метод iPB). Сообщалось о применении метода iPB к коммерчески значимым японским элитным сортам пшеницы; при этом проводили бомбардировку набухших зрелых семян с обнаженной апикальной меристемой побега [67]. В дальнейшем анализировали мутации в гене-мишени в ткани флагового листа. В результате мутантные аллели выявили в тканях 2.51% растений, подвергшихся бомбардировке, однако все мутантные растения были химерными, и в поколении T₂ обнаружен лишь один тройной рецессивный гомозиготный мутант.

На решение проблем, связанных с низким уровнем регенеративной способности Пшеницевых, направлены также подходы к использова-

нию гаплоиндукторов в геномном редактировании. Разработаны методы индукции гаплоидов *Arabidopsis thaliana in planta* путем элиминации генома одного родителя путем модификации гена *CENTROMERIC HISTONE 3 (CENH3)* [76] кукурузы и риса путем нокаута гена спермоспецифичной фосфолипазы [77, 78], а также пшеницы — посредством межродового скрещивания с кукурузой [79]. Ранее сообщалось о гаплоиндукции в сочетании с сайт-направленным мутагенезом у *A. thaliana*, кукурузы и пшеницы [80]. Накопленный опыт позволил развивать методы геномного редактирования Пшеницевых с использованием гаплоиндукторов. К примеру, в геном кукурузы внедрили последовательности *Cas9* и нРНК, подобранные для нокаута всех гомеологов генов *TaBR1* и *TaSD1* у мягкой и твердой пшеницы [81]. Эмбрионы, полученные в результате межродовых скрещиваний трансгенной кукурузы и мягкой пшеницы, регенерировали в условиях *in vitro* с образованием “нокаутных” растений пшеницы.

В целом, одним из популярных направлений геномного редактирования Пшеницевых является получение мутантных растений, не содержащих трансгенов. В результате обеспечивается более низкий уровень редактирования нецелевых участков, а растения, не содержащие трансгенов, могут быстрее получить разрешение на коммерческое возделывание [72, 73]. Одними из первых этот подход реализовали Zhang и соавт. [46], в работе которых компоненты CRISPR/Cas транзитивно экспрессировались в ткани каллуса, а побеги-регенеранты уже не содержали трансгенов. Трансгены обычно не интегрируются в геном растения и при использовании вирусных векторов [31]. Однако, несмотря на очевидные преимущества получения нетрансгенных растений, при этом возможны сложности с селективным отбором.

Отдельно необходимо отметить, что эффективность (полнота) геномного редактирования и его специфичность (воздействие преимущественно или исключительно на целевые сайты) фактически противостоят друг другу. Так, эффективность редактирования намеченных участков генома будет тем выше, чем дольше в клетке работают Cas-нуклеаза и нРНК, но при этом возрастает вероятность нецелевого редактирования [22].

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ КУЛЬТУР ПЫЛЬНИКОВ И МИКРОСПОР ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Микроспоры, или незрелые пыльцевые зерна, представляют собой гаплоидные клетки, обладающие способностью регенерировать *in vitro* в целые растения. Тотипотентность микроспор обычно используется для создания дигаплоидных растений в рамках ускоренной селекции сельскохозяйствен-

Таблица 1. Гены, фенотипические эффекты их нокаута, методы доставки компонентов системы CRISPR/Cas

Ген	GenBank/Ensembl	Вид растения	Метод доставки	Фенотип нокаута	Ссылка
<i>TaMLO</i>	KM017011	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Повышение устойчивости к мучнистой росе	[2]
<i>TdGASR7</i>	KJ000053	<i>T. durum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Увеличение массы зерна	[46]
<i>ENGase</i>	MLOC_10039.2	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация и бомбардировка незрелых зародышей	Нет отличий от дикого типа	[27]
<i>HvPAPhy_a</i>	FJ974003	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение фитазной активности зерна, замедление прорастания зерна	[43]
<i>TaGW2</i>	KY264770, KY264771, KY264772	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами с РНП	Повышение продуктивности	[74]
<i>TaEDR1</i>	AAU89661.2	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Повышение устойчивости к мучнистой росе	[57]
<i>TaGli-2</i>	AJ133612, JN831396, HM120222	<i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Снижение иммунореактивности	[56]
<i>TaMs45</i>	AY660990	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Мужская стерильность	[96]
<i>TaLpx-1</i>	KC679300	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Повышение устойчивости к фузариозу	[33]
<i>TaLox2</i>	GU167921	<i>T. aestivum</i>	Электропорация микроспор	Увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот	[47]
<i>TaDREB2</i>	DQ353852	<i>T. aestivum</i>	ПЭГ-трансформация протопластов	Увеличение чувствительности к засухе	[58]
<i>TaERF3</i>	EF570122	<i>T. aestivum</i>	ПЭГ-трансформация протопластов	Увеличение чувствительности к засухе	[58]
<i>HvCKX1</i> и <i>HvCKX3</i>	—	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	—	[94]
<i>HvNud</i>	KP245804	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Голозерность	[92, 94]
<i>TaGW2</i>	KY264770, KY264771, KY264772	<i>T. aestivum</i>	ПЭГ-трансформация протопластов	Повышение продуктивности зерна	[32]
<i>TaPinb</i>	AB262660	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Повышение твердости эндосперма	[38]
<i>TaWx</i>	AB737985, LC379886, KF007196	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение содержания амилозы в муке	[38]
<i>TaDA1</i>	KM005099	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Увеличение массы зерна	[38]
<i>TaQsd1</i>	HW250906, HW250899, HW250898	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение рисков прорастания на корню	[48]

Таблица 1. Продолжение

Ген	GenBank/Ensembl	Вид растения	Метод доставки	Фенотип нокаута	Ссылка
<i>TaGW7</i>	TraesCS2A01G176000, TraesCS2B01G202300, TraesCS2D01G183400	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Увеличение ширины и массы зерна	[60]
<i>HvCKX1</i> и <i>HvCKX3</i>	HORVU3Hr1G019850, HORVU1Hr1G042360	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Изменения по длине корней и количеству корневых волосков	[95]
<i>WDVsgRNA</i>	MK193742	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Повышение устойчивости к вирусу карликовости пшеницы (WDV)	[85]
<i>D-hordein</i>	JQ867076.1	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение размера зерна, уменьшение содержания проламинов, увеличение содержания глютеинов	[91]
<i>HvITPK1</i>	HORVU7Hr1G033170	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Снижение содержания фитиновой кислоты в зерне	[89]
<i>TaNFXL1</i>	HQ595068, HQ595069, HQ595070	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Устойчивость к фузариозу	[34]
<i>TaNPI</i>	TraesCS1A02G187500, TraesCS1B02G195300, TraesCS1D02G189200	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Мужская стерильность	[39]
<i>WTAI-CM3</i> , <i>WTAI-CM16</i>	Нет данных	<i>T. durum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Снижение содержания аллергенных белков	[64]
<i>BR11</i>	DQ655711	<i>T. durum</i>	С использованием трансгенной кукурузы в качестве гаплоиндуктора	Укорочение стебля	[81]
<i>SD1</i>	Нет данных	<i>T. durum</i>	С использованием трансгенной кукурузы в качестве гаплоиндуктора	Укорочение стебля	[81]
<i>HvHPT</i>	HORVU7Hr1G110990	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение размера и массы зерна, снижение содержания токоферолов и токотриенолов	[35]
<i>HvHGGT</i>	HORVU7Hr1G114330	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение размера и массы зерна, снижение содержания токотриенолов	[35]
<i>HvPDS</i>	HORVU3Hr1G090980	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация каллуса из микроспор	Альбинизм	[82]
β -1,3-глюканаза	X67099, AK248899	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Устойчивость к гле <i>Rhopalosiphum padi</i> не увеличилась	[86]
<i>HvCs1F3</i> , <i>HvCs1F6</i> , <i>HvCs1F9</i> , <i>HvCs1H1</i>	HORVU(2Hr1G04235 0.3, 0Hr1G027460.1, 4Hr1G067680.2, 2Hr1G074940.3)	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Уменьшение содержания (1,3;1,4)- β -глюкана в зерне	[90]
<i>TsABA8'OH1</i>	AB714574.1, AB714575.1	\times <i>Triticosecale</i>	ПЭГ-трансформация протопластов	Уменьшение рисков прораствания на корню	[49]

Таблица 1. Окончание

Ген	GenBank/Ensembl	Вид растения	Метод доставки	Фенотип нокаута	Ссылка
<i>TaMs2</i>	KX951468	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Восстановление мужской фертильности	[63]
<i>TaSBEIIa</i>	HE591389, FM865435, AF338431	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Увеличение содержания амилозы в муке	[1]
<i>TaARE1</i>	KAF7095826.1, KAF7101772.1 KAF7108895.1	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Повышение эффективности усвоения азота, замедление старения	[65]
<i>TaASN2</i>	TraesCAD_scaffold_023055_01G000100, TraesCAD_scaffold_036944_01G000100, TraesCAD_scaffold_017129_01G000200	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Уменьшение содержания акриламида в выпечке	[66]
<i>TaHAG1</i>	TraesCS1D02G134200	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Снижение солеустойчивости	[97]
<i>TaNPT1</i> , <i>TaSPDT</i> , <i>TaIPA1</i>	Нет данных	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	н.д.	[41]
<i>TaPDS</i>	FJ517553	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Альбинизм	[1]
<i>TaBAK1-2</i>	EU679373	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Регуляция иммунитета и развития растений	[67]
<i>Ta-eIF4E</i>	Z12616.2	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Устойчивость к вирусам WSSMV и WYMV	[67]
<i>Ta-eIF(iso)4E</i>	Z12616	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Устойчивость к вирусам WSSMV и WYMV	[67]
<i>TaQsd1</i>	HW250906, HW250899, HW250898	<i>T. aestivum</i>	<i>In planta</i> бомбардировка золотыми частицами апикальной меристемы побега	Уменьшение рисков прорастания на корню	[68]
<i>EGT2</i>	HORVU5Hr1G027890	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Улучшение роста корней	[3]
<i>HvMPK6</i>	BAK07440.1	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Снижение прорастания зерна, отсутствие побегов, короткие корни	[69]
<i>TaMBF1</i>	FJ800577	<i>T. aestivum</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Повышение чувствительности к жаре	[98]
<i>FT-D1</i>	EF428114	<i>T. aestivum</i>	Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей	Увеличение числа колосков и удлинение времени цветения	[99]
<i>MORC6a</i>	HORVU3Hr1G046280.3	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Повышение устойчивости к биотрофным и некротрофным грибам	[45]
<i>HvARE1</i>	AK375792.1	<i>H. vulgare</i>	Агробактериальная трансформация незрелых зародышей	Повышение эффективности использования азота	[88]

ных культур. Гаплоидная стратегия на основе микроспор также вдвое снижает количество редактируемых аллелей. Например, у гексаплоидной пшеницы количество редактируемых аллелей уменьшается с шести до трех. Таким образом, относительная простота выделения и возможность быстрого получения гомозиготных диплоидных трансгенных растений за одну стадию делают одноклеточные микроспоры привлекательной мишенью для редактирования генома, особенно у устойчивых к трансформации видов, к которым относятся все виды Пшеницевых. Исходя из этих соображений, Bhowmik и соавт. [47] исследовали ряд факторов, которые могут повлиять на доставку компонентов CRISPR/Cas9 в микроспоры, и обнаружили, что электропорация не менее 75000 клеток с использованием 10–20 мкг ДНК и импульсного напряжения 500 В оптимальна для трансфекции микроспор мягкой пшеницы. С использованием нескольких конструкций Cas9 и нРНК удалось внести целевые модификации и выполнить нокаут генов *TaLox2* и *TaUbiL1*, кодирующих липоксигеназу и убиквитин [47].

Еще одна работа по геномному редактированию культуры пыльников проведена на растениях ячменя. В каллусах нескольких сортов ячменя, полученных из микроспор, методом агробактериальной трансформации удалось отредактировать ген фитендесатуразы (*HvPDS*) [82]. Этот протокол оказался более эффективным, чем агробактериальная трансформация незрелых зародышей. Предложен также подробный протокол геномного редактирования культуры клеток пыльников ячменя, который позволяет с помощью метода удвоения гаплоидов сразу создавать линии, гомозиготные по отредактированному аллелю [83].

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ ПОСЛЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Существуют три основных метода выявления мутаций, индуцированных CRISPR/Cas: ПЦР/рестрикционный анализ (PCR/Re, CAPS), анализ с помощью нуклеазы T7E1 или ее аналогов, а также клонирование ампликонов с последующим секвенированием. Эти методы широко используются при геномном редактировании Пшеницевых. Обязательным условием первого метода является то, что локус-мишень должен включать сайт соответствующей рестриктазы, который нарушается мутациями, индуцированными CRISPR/Cas. В этом случае ампликоны с мутациями окажутся устойчивыми к расщеплению ферментами рестрикции и на электрофореграмме будут визуализироваться нерасщепленные ампликоны. Для этого проводят ПЦР-анализ целевых генов в предполагаемых трансформантах, после чего ампликоны расщепляют ферментом рестрикции, который распознает последовательности-мише-

ни дикого типа [15]. Мутантные аллели можно дополнительно анализировать путем клонирования в вектор и секвенирования нерасщепленных ампликонов [39]. ПЦР/рестрикционный анализ нельзя применять к локусу-мишени, в котором нет подходящих сайтов эндонуклеаз рестрикции. В качестве альтернативы можно использовать ферменты, расщепляющие неправильно спаренные участки ДНК. В геномном редактировании Пшеницевых широко используются нуклеазы T7E1 [65] и Cel I (SURVEYOR) [46]. Продукты ПЦР (смесь аллеля дикого типа и мутантного аллеля) сначала подвергают денатурации, а затем ренатурации для образования гетеродуплексов. Продукты реакции обрабатывают нуклеазами T7E1 или Cel I, а затем визуализируют при помощи электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Гетеродуплексы расщепляются T7E1/Cel I, тогда как гомодуплексы дикого типа и мутантные гомодуплексы остаются интактными [58]. Небольшие точечные мутации можно обнаружить с помощью ПЦР/рестрикционного анализа и подтвердить секвенированием. Поскольку сайты рестрикции часто нарушаются при мутациях, индуцированных при NHEJ и HDR, мутантные последовательности оказываются устойчивыми к расщеплению и предпочтительно амплифицируются в последующем цикле ПЦР. После этого отредактированный генотип можно подтвердить клонированием и секвенированием [15]. Можно использовать и полногеномное секвенирование отредактированных растений [48, 54], при котором выявляются также нецелевые участки геномного редактирования.

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ CRISPR/Cas ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Основные успехи были достигнуты при улучшении моно- или олигогенно контролируемых признаков, когда положительному проявлению признака препятствует ген – негативный регулятор. В этих случаях проблема решается нокаутом гена.

Одной из важнейших проблем при возделывании мягкой пшеницы является чувствительность этой культуры к мучнистой росе, вызываемой фитопатогенным грибом. Распространение мучнистой росы на посевах приводит к существенному снижению урожая. В пионерской работе по геномному редактированию мягкой пшеницы сделана попытка создания сортов, устойчивых к мучнистой росе, путем нокаута гена *TaMLO*, однако это привело к снижению урожайности у отредактированных растений [2]. Позднее проблему негативного плейотропного эффекта нокаута этого гена удалось решить с помощью небольшой

делении в локусе MLO-B1 [84]. Устойчивость пшеницы к мучнистой росе удалось повысить также путем внесения мутаций в ген *EDR1* [57]. Еще одно не менее опасное заболевание представителей трибы Пшеницевые – фузариоз, вызывается грибом *Fusarium graminearum*. Brauer и соавт. [34] идентифицировали ген *TaNFXL1*, кодирующий фактор транскрипции, индуцируемый микотоксином дезоксиниваленолом. С помощью CRISPR/Cas доказано, что продукт гена *TaNFXL1* подавляет устойчивость растений пшеницы к *F. graminearum*. Таким образом, нокаут гена *TaNFXL1* может повышать устойчивость мягкой пшеницы к фузариозу (табл. 1). Белки семейства Microchidia (MORC) играют важную роль в эпигенетическом сайленсинге генов и стабилизации генома в клетках растений и животных, а также действуют как медиаторы передачи сигналов защиты, запускаемой R-белками различных классов. Методом CRISPR/Cas получены двойные мутанты ячменя *hvmorc1/hvmorc6a* с высоким уровнем устойчивости к биотрофным (*Blumeria graminis*) и некротрофным (*F. graminearum*) фитопатогенным грибам [45].

Одну из серьезных проблем при возделывании Пшеницевых представляют многочисленные вирусные инфекции. С помощью технологии CRISPR/Cas можно воздействовать на гены самого растения, продукты которых важны для развития вирусной инфекции. К примеру, гены *Ta-eIF4E* и *Ta-eIF(iso)4E*, кодирующие высококонсервативные факторы инициации трансляции, одновременно служат факторами восприимчивости (S), необходимыми вирусам семейства *Potyviridae* для завершения жизненного цикла. Предполагается, что линии мягкой пшеницы с нокаутом генов *Ta-eIF4E* и *Ta-eIF(iso)4E* будут устойчивы к вирусу веретенообразной мозаики пшеницы (WSSMV) и вирусу желтой мозаики пшеницы (WYMV) [67]. Другой подход применили для борьбы против вируса WDV. Растения, постоянно экспрессирующие белок Cas и нРНК против WDV, характеризовались повышенной устойчивостью к данному вирусу [85].

Еще одну проблему при культивировании Пшеницевых представляют такие вредители, как тля. Растения защищаются от тли, закупоривая поврежденные ситовидные трубки отложениями каллозы. Однако эти вредители приобрели способность индуцировать растительные гены, кодирующие β -1,3-глюканазу, которая разлагает каллозу, что позволяет тле преодолевать защитные системы растения-хозяина. Чтобы повредить этот механизм, методом CRISPR/Cas получили нокаут двух генов β -1,3-глюканазы (1636 и 1639) в геноме ячменя [86]. В трех из четырех двойных мутантных линий выявили значительное снижение активности β -1,3-глюканазы, причем листья двойных мутантов содержали гораздо больше

каллозы, чем листья контрольных растений или одинарных мутантов. Однако при этом у мутантных растений не повышалась устойчивость к тле *Rhopalosiphum padi* L., что могло быть связано с более высоким уровнем экспрессии третьего гена β -1,3-глюканазы – 1637, который тоже активируется под влиянием патогена.

Дефицит влаги, вызванный засухой и гипотермией, остается наиболее значимым абиотическим стрессовым фактором при выращивании всех сельскохозяйственных культур. Для повышения стрессоустойчивости пшеницы использовали нокаут генов *TaDREB2* и *TaERF3*, кодирующих факторы транскрипции, которые регулируют чувствительность к обезвоживанию [58]. Эти эксперименты проведены только на протопластах, однако предполагается, что полноценные растения будут отличаться повышенной устойчивостью к дефициту влаги.

Одной из важных причин снижения урожайности Пшеницевых остается так называемое прорастание на корню (прорастание зерновок в колосе). Методом CRISPR/Cas Abe и соавт. [48] внесли мутации в три гомеолога гена *Qsd1*, участвующих в контроле покоя семян. Путем дальнейших скрещиваний удалось получить отредактированные растения, семена которых, как полагают, будут иметь более продолжительный период покоя и будут менее подвержены прорастанию на корню. Нокаут гена *Qsd1* использовали также в работе, направленной на отработку технологии геномного редактирования путем генетической трансформации апикальной меристемы побега *in planta* [68]. Проблема прорастания на корню особенно актуальна для тритикале. Однако, учитывая сложность генома, слабую изученность и очень низкие способности тритикале к регенерации, геномное редактирование этой культуры требует больших затрат и времени, его проводят лишь в нескольких лабораториях мира [87]. Одной из вероятных генетических детерминант прорастания на корню считается ген *ABA 8'-HYDROXYLASE 1*. Michalski и соавт. [49] создали конструкции для нокаута этого гена методом CRISPR/Cas и испытали их путем трансфекции в протопласты тритикале. Далее с помощью анализа T7E1 и секвенирования доказали возникновение мутаций в целевом гене. Это единственная на сегодняшний день работа по геномному редактированию тритикале, однако следует отметить, что полноценные растения получены не были [49].

Со времен первой зеленой революции одним из хозяйственно ценных признаков Пшеницевых остается короткостебельность. Поэтому не удивительно, что этот фенотипический признак становится целью геномного редактирования. Например, с использованием гаплоиндукторов получены

растения мягкой и твердой пшеницы с нокаутом генов *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BR1)* и *SEMI-DWARF 1 (SD1)* [81]. Предполагается, что отредактированные растения будут иметь более короткий стебель и увеличенную урожайность.

Важным направлением селекции культурных растений трибы Пшеницевые остается повышение эффективности азотного питания. Недавно Zhang и соавт. [65] идентифицировали и охарактеризовали три гомеолога гена *TaARE1*. Методом CRISPR/Cas они создали мутантные линии пшеницы с тройными нулевыми аллелями *taare*. Все мутантные линии имели повышенную устойчивость к азотному голоданию, замедленное старение и повышенную урожайность в полевых условиях. Похожие работы проведены также на ячмене. У мутантных линий ячменя *hvae1* наблюдалось увеличение высоты растений, числа побегов, содержания белка в зерне и урожайности. Кроме того, мутанты ячменя *hvae1* отличались повышенным содержанием хлорофилла, отсроченным старением, а также имели высокое содержание азота в побегах в условиях низкого содержания азота в почве [88].

К важнейшим характеристикам урожайности культурных растений трибы Пшеницевые относятся масса и размеры семян. Показано увеличение ширины и массы зерновок в растениях с нокаутом гомеологов гена *TaGW7* в геномах В и D, при этом наблюдалось уменьшение длины зерновок. Причем наиболее значительные эффекты получены при внесении изменений в оба гомеолога [60]. Нокаут гомологичного гена *TaGW2* во всех субгеномах мягкой пшеницы также способствовал увеличению признака “масса тысячи зерен” [32].

Некоторые работы по редактированию с помощью системы CRISPR/Cas направлены на улучшение качества зерна. Например, Li и соавт. [1] получили линии яровой и озимой пшеницы мягкой с высоким содержанием амилозы за счет внесения мутаций в ген *TaSBEIIa*, кодирующий ветвящийся фермент крахмала. Блокирование экспрессии этого гена привело к снижению содержания амилопектина в крахмале и увеличению содержания амилозы. Raffan и соавт. [66] удалось внести мутационные изменения во все шесть аллелей гена *TaASN2*, кодирующего аспарагинсинтетазу, что привело к существенному снижению содержания свободного аспарагина в зерне пшеницы мягкой. Свободный аспарагин является предшественником акриламида, который образуется во время высокотемпературной обработки продуктов, приготовленных из пшеницы, поэтому предполагается возможность снижения канцерогенности продуктов из растений с отредактированным геномом.

Инозитолтрифосфат-киназы 5/6 (ITPK) составляют небольшую группу ферментов, участву-

ющих в последовательном фосфорилировании инозитолфосфата в инозитолгексафосфат (IP6), который является основной формой хранения фосфата в зерне злаков. Создание линий Пшеницевых с пониженным содержанием IP6 может повысить биодоступность фосфатов в пище и кормах. С целью выяснения роли гена *HvITPK1* в биосинтезе IP6 созданы мутантные растения ячменя [89] с измененными уровнями фосфатов в зрелых зернах — от 65 до 174% относительно содержания в зерновках дикого типа. К тому же мутанты с инсерциями были более солеустойчивыми, чем растения дикого типа и делеционные мутанты. Результаты этого исследования доказывают участие генов *ITPK* не только в накоплении фосфатов, но и в передаче сигналов абиотического стресса.

Более 7% населения западных стран страдает повышенной чувствительностью к глютену, а наибольшей иммунореактивностью обладает 33-мерный пептид α -глиадина [56]. С целью создания растений мягкой и твердой пшеницы с пониженной иммунореактивностью сконструированы две нРНК для нацеливания на консервативную область, примыкающую к последовательности гена α -глиадина, кодирующей 33-мер. Мутантные линии характеризовались снижением содержания α -глиадинов и иммунореактивности [56]. С пшеницей связаны и такие заболевания человека, как астма пекарей и нецелиакийная чувствительность к пшенице (NCWS). Предполагается, что патогенез этих болезней связан с ингибиторами α -амилазы и трипсина (АТІ), кодируемыми субъединицами WTAI-СМ3 и WTAI-СМ16. С целью получения линий твердой пшеницы с уменьшенным количеством потенциальных аллергенов проведено редактирование этих двух субъединиц в зерне итальянского сорта Svevo с использованием стратегии мультиплексного CRISPR/Cas9 [64]. В итоге редактирование двух целевых генов подтверждено как на молекулярном (секвенирование и исследование экспрессии генов), так и на биохимическом (иммунологический тест) уровнях.

Для пивоварения предпочтительно использовать ячмень с низким содержанием (1,3;1,4)- β -глюкана. Так как гены (1,3;1,4)- β -глюкансинтаз ячменя изучены недостаточно, методом CRISPR/Cas выполнен нокаут четырех генов (*HvCslH1*, *HvCslF3*, *HvCslF6* и *HvCslF9*), предположительно кодирующих ферменты семейства гликозилтрансфераз GT2 [90]. Мутации в генах *HvCslH1*, *HvCslF3* и *HvCslF9* не влияли на содержание (1,3;1,4)- β -глюкана в зерне, тогда как нокаут гена *HvCslF6* приводил к существенному уменьшению содержания этого вещества.

Гордеины — запасные белки ячменя, одна из фракций которых, называемая D-гордеинами, ассоциирована с низким качеством солодового экстракта. При этом механизм отрицательного

влияния D-гордеина на качество солода не установлен. С целью функционального анализа гена D-гордеина проведен его нокаут и получены три гетерозиготных мутантных растения [91]. Гомозиготные мутанты второго поколения имели более мелкие зерновки, содержание проламинов в них было снижено, а глютелинов увеличено.

Голозерность ячменя связывают с делецией гена *NUD*, кодирующего транскрипционный фактор AP2/ERF, контролирующей образование цементирующего слоя между околоплодником, нижней и верхней цветковой чешуями. Правильность этих данных подтверждает конверсия фенотипа ячменя из пленчатого в голозерный при направленном нокауте гена *NUD* с использованием РНК-управляемой эндонуклеазы Cas9 [92]. Отмечается, что из-за высокого содержания β -глюкана голозерный ячмень может считаться диетическим продуктом.

В ряде работ проведено одновременное мультиплексное геномное редактирование нескольких генов. Множественные спейсеры в одной нРНК получали, используя классическую мультиплексную систему, где каждая нРНК находится под контролем собственного промотора U3 или U6 (система TRSP), а также ряд систем процессинга тРНК [53], рибозимов [93] и Csy4 [54], экспрессирующихся полицистронно. Для проверки эффективности этих систем Li и соавт. [1] проводили одновременное геномное редактирование генов *TaDA1*, *TaPDS* и *TaNCED1* с использованием первых трех подходов. В итоге системы процессинга тРНК и рибозимов оказались более эффективными и надежными, чем система TRSP. Luo и соавт. [41] разработали эффективную стратегию мультиплексного редактирования генома пшеницы мягкой с использованием промотора Pol II риса для управления экспрессией tandemных повторов единиц тРНК-нРНК, добавив полиА-сигнал и pos-терминатор для повышения уровня экспрессии транскриптов, что увеличивало частоту редактирования множественных генов в нескольких локусах пшеницы. Показана возможность одновременного редактирования 2, 3, 4 и 5 генов в 15 геномных локусах в одном поколении. Одновременно проведено редактирование генов *Pinb*, *Waxy* и *DA1*, мутации в которых могут способствовать повышению твердозерности, увеличению содержания амилопектина и увеличению показателя “масса тысячи зерен” соответственно [38]. Wang и соавт. [33] применили мультиплексную конструкцию, созданную путем объединения tandemно расположенных единиц тРНК-нРНК, для создания наследуемых мутаций в генах *TaGW2*, *TaLpx-1* и *TaMLO* гексаплоидной пшеницы. Образовавшиеся во всех трех гомеологичных копиях гена *TaGW2* мутации привели к значительному увеличению размера зерновок и показателя “масса тысячи зерен”.

Системы мультиплексного геномного редактирования также были апробированы на ячмене. Сконструировали две разные нРНК для обычного редактирования и одну полицистронную конструкцию тРНК-нРНК для мультиплексного редактирования с использованием эндогенной системы процессинга тРНК для нокаута генов цитоксинаоксидазы/дегидрогеназы: одного — *HvCKX1*, и двух — *HvCKX1* и *HvCKX3* соответственно [94]. Сообщается также, что высокая частота индуцированных мутаций была достигнута за счет использования оптимизированного синтетического гена *Cas9* и усиленного интроном UBQ10-i1 из *A. thaliana* в сочетании с эффективным методом агробактериальной трансформации. В дальнейшем Gasparis и соавт. [95] продолжили исследование растений ячменя с нокаутом и выявили значительное снижение активности фермента СКХ в колосьях линий *ckx1*, в то время как у линий *ckx3* активность оставалась на том же уровне, что и в контрольных растениях. Несмотря на эти различия, урожайность мутантных линий не изменилась. В свою очередь, различия в активности СКХ в корнях мутантов *ckx1* и *ckx3* отражались на морфологии корней. Снижение активности СКХ в линии *ckx1* приводило к увеличению длины корней, площади поверхности и количества корневых волосков и к противоположным результатам у мутантов *ckx3*.

Очень удобным инструментом, используемым в селекционных работах, являются системы индукции мужской стерильности. С целью индукции мужской стерильности отредактировали все три гомеолога гена *TaNPI*, кодирующего предполагаемую глюкозаметанол-холинксидоредуктазу, необходимую для поддержания мужской фертильности (табл. 1). Тройные гомозиготные мутации в генах *TaNPI* приводили к полной мужской стерильности [39]. Редактированные линии пшениц с мужской стерильностью предлагают использовать в селекции пшеницы. В другом исследовании путем направленного мутагенеза с использованием системы CRISPR/Cas мутации внесли во все три гомеолога гена *Ms45* (ген мужской стерильности) и получили стерильные растения пшеницы мягкой [96]. Однако после получения гибридных линий возникает необходимость восстановления мужской фертильности, что можно сделать путем нокаута генов мужской стерильности. К примеру, Tang и соавт. [63] внесли мутации в ген *Ms2*, контролирующей цитоплазматическую мужскую стерильность, что привело к восстановлению фертильности у отредактированных растений. В табл. 1 представлена информация о целевых генах, методах доставки компонентов CRISPR/Cas и фенотипических проявлениях нокаута этих генов в растениях мягкой и твердой пшеницы, ячменя и тритикале. Результа-

ты геномного редактирования других представителей трибы Пшеницевые пока не опубликованы.

МЕТОД CRISPR/Cas В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Пшеница мягкая имеет большой (17 Гб) и сложный полиплоидный геном с высокой долей повторяющихся последовательностей (>80%). Эти особенности создают проблемы для генетического и функционального анализа генома пшеницы [2, 38]. Однако с появлением системы CRISPR/Cas гораздо быстрее начали развиваться фундаментальные исследования пшеницы мягкой и других Пшеницевых методами обратной генетики. На сегодняшний день опубликовано уже более 10 работ, в которых представлены результаты изучения Пшеницевых с использованием мутантов с нокаутом определенных генов, полученных методом CRISPR/Cas. К примеру, Wang и соавт. [100] получили мутанты пшеницы по гену *TaPHT1;9-4B*, которые при достаточном количестве фосфатов в почве содержат меньше фосфатов в корнях и побегах, чем растения дикого типа. В то же время при дефиците фосфора эти мутанты накапливали фосфаты в корнях, но не в побегах. Таким образом доказано, что продукт гена *TaPHT1;9-4B* участвует в переносе фосфатов от корней к побегу. Путем нокаута гена гистон-ацетилтрансферазы *TaHAG1* методом CRISPR/Cas доказана его важная роль в регуляции солеустойчивости посредством ацетилирования гистонов H3 различных генов, участвующих в модуляции выработки активных форм кислорода [97].

Для изучения роли гена *TaMBF1* в регуляции и обеспечении жароустойчивости методом CRISPR/Cas созданы растения с нокаутом всех трех гомеологичных генов [98]. Мутантные растения, в отличие от растений дикого типа, характеризовались пониженной устойчивостью к действию высоких температур — в условиях теплового стресса они имели более короткий стебель и меньшую сырую массу. Однако нокаут только одного гомеолога *TaMBF1* не привел к существенному изменению жароустойчивости, что свидетельствует о функциональной избыточности гомеологов этого гена в ответе на тепловой стресс. Ген *TaBAK1-2* мягкой пшеницы является гомологом гена *BAK1 A. thaliana*, кодирующего BRI1-ассоциированную рецепторную киназу 1, важный регулятор иммунитета и развития растений. Для выяснения функций гена *TaBAK1-2* использовали нокаут всех трех его гомеологов; эта мутация успешно наследовалась в последующих поколениях [67].

Продукт гена *FLOWERING LOCUS T (FT)* способен перемещаться из флоэмы листа в апикальную меристему побега, где инициирует переход к

цветению. Предполагается, что данный ген также может участвовать в регуляции числа колосков у Пшеницевых. Путем редактирования гена *FT-D1* с использованием системы CRISPR/Cas доказано участие этого гена в определении числа колосков и времени колошения [99].

Угол роста корней определяет их направление к вектору силы тяжести и является одним из наиболее важных факторов, устанавливающих архитектуру корневой системы. Путем нокаута гомеологов гена *EGT2* в субгеномах А и В твердой пшеницы показана эволюционно консервативная роль этого гена в контроле угла роста корней [3]. Применение микродиссекции с лазерным захватом и секвенирования РНК позволило обнаружить, что в растениях с нокаутом этого гена подавлена экспрессия семи генов экспансинов в зоне растяжения. Эти данные свидетельствуют о том, что *EGT2* кодирует регулятор угла роста корней, который может быть ценной мишенью для улучшения роста корней у Пшеницевых.

Среди культурных видов трибы Пшеницевые наиболее удобным для проведения фундаментальных исследований оказался ячмень, имеющий диплоидный геном. На модельных сортах этого вида хорошо отработана методика генетической трансформации. Чтобы изучить механизм модификации и удаления N-гликанов из белков, Karusi и соавт. [27] выбрали в качестве мишени для редактирования генома предполагаемый эндогенный ген эндо-N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (ENGase) ячменя. В зерновках ячменя при прорастании активируется ENGase, которая способствует удалению N-гликанов из молекул белка, что приводит к мобилизации запасных гликопротеинов. Редактированные растения ячменя с биаллельными или гомозиготными мутациями в предполагаемом гене ENGase не имели фенотипических отличий от растений дикого типа. Планируется провести биохимический анализ полученных растений, чтобы выявить возможные изменения в составе N-гликанов эндогенных и рекомбинантных белков, а также воздействие этих мутаций на физиологию эндосперма. Другой пример — особенности биосинтеза витамина Е у однодольных растений. С целью изучения биосинтеза этого витамина созданы мутантные растения ячменя с нокаутом генов *HvHPT* и *HvHGGT*, кодирующих ферменты, вовлеченные в биосинтез витамина Е [35]. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показано, что целенаправленная мутация гена *HvHPT* значительно снижает содержание как токоферолов, так и токотриенолов, тогда как мутация гена *HvHGGT* полностью блокирует биосинтез токотриенолов в зернах ячменя. Это означает, что продукт гена *HvHGGT* является ключевым ферментом биосинтеза токотриенолов.

Гены *MPK*, роль которых в развитии растений хорошо изучена у *A. thaliana* и риса, кодируют митоген-активируемые протеинкиназы. При этом функции ортологов гена *MPK6* у Пшеницевых оставались неизученными. Kgenek и соавт. [69] методом CRISPR/Cas создали растения ячменя с нокаутом гена *HvMPK6*, однако фенотипически они не отличались от растений дикого типа. Показано, что все эти мутанты гетерозиготные, а второй аллель всегда содержит нативный ген *HvMPK6*. Полученные результаты говорят о летальности биаллельных мутантов. В дальнейшем удалось получить семена этих мутантов, однако проростки оказались аномальными, без побегов и с редуцированной корневой системой. Исходя из полученных результатов, а также результатов изучения ортологов гена *MPK6* в *A. thaliana* и риса, сделан вывод о важной роли *HvMPK6* в эмбриональном и раннем развитии проростков ячменя.

Геномное редактирование CRISPR/Cas может оказаться весьма полезным при функциональном анализе промоторов различных генов растений. К примеру, с помощью этого подхода анализировали промотор гена фитазы ячменя *HvPAPhy_a*. Белковый продукт этого гена, как предполагалось, является основной фитазой, присутствующей в зрелых зерновках ячменя и определяющей их фитазную активность (MGPA) [43]. Результаты этой работы подтвердили, что фермент *PAPhy_a* ячменя вносит основной вклад в MGPA. Кроме того, анализ промоторной области гена *HvPAPhy_a*, содержащей мотив GCN4/Skn1/Ry, показал его важность для экспрессии *HvPAPhy_a*, поскольку MGPA в зерновках линий растений с мутациями в этом мотиве значительно снижена. Интересно, что в линиях ячменя с делециями нуклеотидов в промоторе, расположенными ниже этого мотива, уровни MGPA еще более снижены, указывая на то, что мотив GCN4/Skn1/Ry не является единственным элементом промотора, ответственным за уровень экспрессии *PAPhy_a* во время созревания зерна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение системы CRISPR/Cas9 имеет широкие перспективы как в фундаментальных исследованиях, так и для решения прикладных задач. Одна из таких перспектив – возможность значительного ускорения многих исследований, связанных с выяснением функций генов и генетического контроля признаков. С помощью метода CRISPR/Cas получено большое количество растений пшеницы мягкой и ячменя, в том числе, с улучшенными хозяйственно ценными признаками. Опубликованы результаты геномного редактирования пшеницы твердой и тритикале [46, 49, 56, 64, 81]. Однако целый ряд культурных растений трибы Пшеницевые, таких как рожь, пше-

ницы-однозернянки и пшеницы-двузернянки, остаются неисследованными в контексте геномного редактирования. Тем не менее, недавние успехи в генной инженерии и генетической трансформации этих видов [101–103] позволяют надеяться на скорое вовлечение новых представителей трибы Пшеницевые в исследования, предполагающие изменение генома с помощью систем CRISPR/Cas. Одним из существенных препятствий к широкому применению методов CRISPR/Cas остается крайне низкая способность представителей трибы Пшеницевые к регенерации. Поэтому возрастает актуальность разработки новых способов доставки компонентов системы CRISPR/Cas, в том числе, в апикальную меристему или в пыльцевые зерна, чтобы получить полноценные растения с отредактированными геномами без этапа культивирования *in vitro*. Разработка таких методов позволит проводить геномное редактирование не только на модельных, но и на коммерчески значимых сортах.

В России систему CRISPR/Cas9 успешно применяют для редактирования генома ячменя в Институте цитологии и генетики СО РАН [92, 104]. Геном мягкой пшеницы редактируют сотрудники Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии [105]. Однако отредактированные растения в сельскохозяйственном производстве нашей страны пока не применяются. Одну из проблем представляет присутствие в геномах трансгенных растений “служебной” чужеродной ДНК. Система CRISPR/Cas позволяет удалять нежелательные последовательности из генома, поэтому отредактированные растения не могут относиться к ГМО, так как не содержат трансгенов, что позволяет в случае диверсифицированного подхода в сфере правового регулирования допускать к использованию сорта, в ходе получения которых применялось геномное редактирование.

Обзорное исследование Кулуева Б.Р., Михайловой Е.В., Галимовой А.А. и Хлесткиной Е.К. поддержано грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.), работы Кулуева А.Р. и Заикиной Е.А. выполнены в рамках государственного задания № 122030200143-8.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li J., Jiao G., Sun Y., Chen J., Zhong Y., Yan L., Jiang D., Ma Y., Xia L. (2021) Modification of starch composition, structure and properties through editing of *TaSBEIIa* in both winter and spring wheat varieties

- by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 937–951. <https://doi.org/10.1111/pbi.13519>
2. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* **32**, 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
 3. Kirschner G.K., Rosignoli S., Guo L., Vardanega I., Imani J., Altmuller J., Milner S.G., Balzano R., Nagel K.A., Pflugfelder D., Forestan C., Bovina R., Koller R., Stocker T.G., Mascher M., Simmonds J., Uauy C., Schoof H., Tuberosa R., Salvi S., Hochholdinger F. (2021) *ENHANCED GRAVITROPISM 2* encodes a *STERILE ALPHA MOTIF*-containing protein that controls root growth angle in barley and wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **31**, e2101526118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101526118>
 4. Хлесткина Е.К. (2022) Стратегия новой “зеленой революции” в селекции пшеницы: к юбилею академика РАН Людмилы Андреевны Беспаловой. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции.* **183**, 254–258. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1->
 5. Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. (2017) Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях. *Физиол. растений.* **64**, 92–108. <https://doi.org/10.7868/S0015330317010079>
 6. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Ясыбаева Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2017) Эволюция методов редактирования геномов. *Биомика.* **9**, 243–250.
 7. Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Салина Е.А., Першина Л.А., Хлесткина Е.К., Шумный В.К. (2017) Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений. *Вест. Рос. Акад. Наук.* **87**, 348–354. <https://doi.org/10.7868/S0869587317040107>
 8. Hensel G. (2020) Genetic transformation of Triticeae cereals – summary of almost three-decade’s development. *Biotechnol. Adv.* **40**, 107484. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107484>
 9. Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* **115**, 971–980. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.971>
 10. Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., Loerz H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* **4**, 251–261. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x>
 11. Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J., Kumlehn J. (2008) Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *J. Plant Physiol.* **165**, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.015>
 12. Harwood W.A. (2012) Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *J. Exp. Bot.* **63**, 1791–1798. <https://doi.org/10.1093/jxb/err380>
 13. Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. (2017) Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant Cell Rep.* **36**, 611–620. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2107-2>
 14. Ran Y., Patron N., Kay P., Wong D., Buchanan M., Cao Y.Y., Sawbridge T., Davies J.P., Mason J., Webb S.R., Spangenberg G., Ainley W.M., Walsh T.A., Hayden M.J. (2018) Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 2088–2101. <https://doi.org/10.1111/pbi.12941>
 15. Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. (2014) Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.* **9**, 2395–2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
 16. Михайлова Е.В., Хуснутдинов Э.А., Чемерис А.В., Кулуев Б.Р. (2022) Доступный арсенал систем CRISPR/Cas для геномного редактирования растений. *Физиол. растений.* **69**, 38–53. <https://doi.org/10.31857/S0015330322010134>
 17. Ming M., Ren Q., Pan C., He Y., Zhang Y., Liu S., Qi Y. (2020) CRISPR-Cas12b enables efficient plant genome engineering. *Nat. Plants.* **6**, 202. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0614-6>
 18. Lawrenson T., Harwood W.A. (2019) Creating targeted gene knockouts in barley using CRISPR/Cas9. *Meth. Mol. Biol.* **1900**, 217–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_14
 19. Kumar R., Kaur A., Pandey A., Mamrutha H.M., Singh G.P. (2019) CRISPR-based genome editing in wheat: a comprehensive review and future prospects. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 3557–3569. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04761-3>
 20. Li S., Zhang C., Li J., Yan L., Wang N., Xia L. (2021) Present and future prospects for wheat improvement through genome editing and advanced technologies. *Plant Commun.* **2**. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100211>
 21. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матнязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. (2017) Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов. *Биомика.* **9**, 202–226.
 22. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матнязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2020) Дизайн РНК-гидов для CRISPR/CAS редактирования геномов растений. *Молекуляр. биология.* **54**, 29–50. <https://doi.org/10.1134/S0026898420010061>

23. Heigwer F., Kerr G., Boutros M. (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods*. **11**, 122–123.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2812>
24. Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*. **31**, 1120–1123.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>
25. Hough S.H., Kancleris K., Brody L., Humphryes-Kirilov N., Wolanski J., Dunaway K., Ajetunmobi A., Dillard V. (2017) Guide Picker is a comprehensive design tool for visualizing and selecting guides for CRISPR experiments. *BMC Bioinformatics*. **18**, 167.
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-1581-4>
26. Singh R., Kuscu C., Quinlan A., Qi Y., Adli M. (2015) Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. *Nucl. Acids Res.* **43**, e118.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv575>
27. Kapusi E., Corcuera-Gomez M., Melnik S., Stoger E. (2017) Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Front. Plant Sci.* **8**, 540.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00540>
28. Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B., Wang X.C., Chen Q.J. (2014) A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* **14**, 327.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
29. Mikami M., Toki S., Endo M. (2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol. Biol.* **88**, 561–572.
<https://doi.org/10.1007/s11103-015-0342-x>
30. Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. (2013) RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)*. **3**, 2233–2238.
<https://doi.org/10.1534/g3.113.008847>
31. Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sanchez-Leon S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. (2017) High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J.* **89**, 1251–1262.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13446>
32. Wang W., Simmonds J., Pan Q., Davidson D., He F., Battal A., Akhunova A., Trick H.N., Uauy C., Akhunov E. (2018) Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **131**, 2463–2475.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3166-7>
33. Wang W., Pan Q., He F., Akhunova A., Chao S., Trick H., Akhunov E. (2018) Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *CRISPR J.* **1**, 65–74.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>
34. Brauer E.K., Balcerzak M., Rocheleau H., Leung W., Scherthner J., Subramaniam R., Ouellet T. (2020) Genome editing of a deoxynivalenol-induced transcription factor confers resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **33**, 553–560.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0332-R>
35. Zeng Z., Han N., Liu C., Buerte B., Zhou C., Chen J., Wang M., Zhang Y., Tang Y., Zhu M., Wang J., Yang Y., Bian H. (2020) Functional dissection of *HGGT* and *HPT* in barley vitamin E biosynthesis via CRISPR/Cas9-enabled genome editing. *Ann. Bot.* **126**, 929–942.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcaa115>
36. Dayani S., Sabzalian M.R., Mazaheri-Tirani M. (2019) CRISPR/Cas9 genome editing in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic improvement. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals*. Eds Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. Cham. Springer, pp. 453–469.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-23108-8_12
37. Liu H., Wang K., Jia Z., Gong Q., Lin Z., Du L., Pei X., Ye X. (2020) Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system. *J. Exp. Botany*. **71**, 1337–1349.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz529>
38. Zhang S., Zhang R., Song G., Gao J., Li W., Han X., Chen M., Li Y., Li G. (2018) Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biol.* **18**, 302.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1496-x>
39. Li J., Wang Z., He G., Ma L., Deng X.W. (2020) CRISPR/Cas9-mediated disruption of *TaNPI* genes results in complete male sterility in bread wheat. *J. Genet. Genomics*. **47**, 263–272.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.05.004>
40. Li J., Zhang S., Zhang R., Gao J., Qi Y., Song G., Li W., Li Y., Li G. (2021) Efficient multiplex genome editing by CRISPR/Cas9 in common wheat. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 427–429.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13508>
41. Luo J., Li S., Xu J., Yan L., Ma Y., Xia L. (2021) Pyramiding favorable alleles in an elite wheat variety in one generation by CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing. *Mol. Plant*. **14**, 847–850.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.03.024>
42. Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Ostergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* **16**, 258.
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0826-7>
43. Holme I.B., Wendt T., Gil-Humanes J., Deleuran L.C., Starker C.G., Voytas D.F., Brinch-Pedersen H. (2017) Evaluation of the mature grain phytase candidate *HvPAPhy_a* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol. Biol.* **95**, 111–121.
<https://doi.org/10.1007/s11103-017-0640-6>
44. Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. (2018) Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9

- gene-editing system. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 1892–1903. <https://doi.org/10.1111/pbi.12924>
45. Galli M., Martiny E., Imani J., Kumar N., Koch A., Steinbrenner J., Kogel K.H. (2022) CRISPR/SpCas9-mediated double knockout of barley *Microrchidia MORC1* and *MORC6a* reveals their strong involvement in plant immunity, transcriptional gene silencing and plant growth. *Plant Biotechnol. J.* **20**, 89–102. <https://doi.org/10.1111/pbi.13697>
 46. Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J.L., Gao C. (2016) Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* **7**, 12617. <https://doi.org/10.1038/ncomms12617>
 47. Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Song H., Gao C., Voytas D.F., Kagale S. (2018) Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Sci. Rept.* **8**, 6502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24690-8>
 48. Abe F., Haque E., Hisano H., Tanaka T., Kamiya Y., Mikami M., Kawaura K., Endo M., Onishi K., Hayashi T., Sato K. (2019) Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. *Cell Rep.* **28**, 1362–1369.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.090>
 49. Michalski K., Hertig C., Mankowski D.R., Kumlehn J., Zimny J., Linkiewicz A.M. (2021) Functional validation of Cas9/guideRNA constructs for site-directed mutagenesis of triticale *ABA8'OH1* loci. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7038. <https://doi.org/10.3390/ijms22137038>
 50. Furtado A., Henry R.J., Pellegrineschi A. (2009) Analysis of promoters in transgenic barley and wheat. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 240–253. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00394.x>
 51. Hill-Ambroz K.L., Troy Weeks J., Baenziger P.S., Graybosch R.A. (2001) Constitutive promoter expression of transgenes in wheat (*Triticum aestivum*). *Cereal Res. Commun.* **29**, 9–16. <https://doi.org/10.1007/BF03543636>
 52. Al-Saady N.A., Torbert K.A., Smith L., Makarevitch I., Baldridge G., Zeyen R.G., Muehlbauer G.J., Olszewski N.E., Somers D.A. (2004) Tissue specificity of the *Sugarcane Bacilliform Virus* promoter in oat, barley and wheat. *Mol. Breed.* **14**, 331–338. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000049214.82160.9d>
 53. Xie K., Minkenberg B., Yang Y. (2015) Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 3570–3575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
 54. Cermak T., Curtin S.J., Gil-Humanes J., Čegan R., Kono T.J.Y., Konecna E., Belanto J.J., Starker C.G., Mathre J.W., Greenstein R.L., Voytas D.F. (2017) A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell.* **29**, 1196–1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
 55. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. (2015) A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant.* **8**, 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
 56. Sanchez-Leon S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Gimenez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 902–910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
 57. Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. (2017) Simultaneous modification of three homologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* **91**, 714–724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
 58. Kim D., Alptekin B., Budak H. (2018) CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Funct. Integr. Genomics.* **18**, 31–41. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0572-x>
 59. Hamada H., Liu Y., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rept.* **8**, 14422. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32714-6>
 60. Wang W., Pan Q., Tian B., He F., Chen Y., Bai G., Akhunova A., Trick H.N., Akhunov E. (2019) Gene editing of the wheat homologs of *TONNEAU1*-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *Plant J.* **100**, 251–264. <https://doi.org/10.1111/tpj.14440>
 61. Zhang Z., Hua L., Gupta A., Tricoli D., Edwards K.J., Yang B., Li W. (2019) Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 1623–1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>
 62. Liu H., Wang K., Tang H., Gong Q., Du L., Pei X., Ye X. (2020) CRISPR/Cas9 editing of wheat *TaQ* genes alters spike morphogenesis and grain threshability. *J. Genetics Genomics.* **47**, 563–575. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.08.004>
 63. Tang H., Liu H., Zhou Y., Liu H., Du L., Wang K., Ye X. (2021) Fertility recovery of wheat male sterility controlled by Ms2 using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 224–226. <https://doi.org/10.1111/pbi.13482>
 64. Camerlengo F., Frittelli A., Sparks C., Doherty A., Martignago D., Larre C., Lupi R., Sestili F., Masci S. (2020) CRISPR-Cas9 multiplex editing of the α -amylase/trypsin inhibitor genes to reduce allergen proteins in durum wheat. *Front. Sustain. Food Syst.* **4**, 104. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00104>
 65. Zhang J., Zhang H., Li S., Li J., Yan L., Xia L. (2021) Increasing yield potential through manipulating of an *ARE1* ortholog related to nitrogen use efficiency in wheat by CRISPR/Cas9. *J. Integr. Plant Biol.* **63**, 1649–1663. <https://doi.org/10.1111/jipb.13151>
 66. Raffan S., Sparks C., Huttly A., Hyde L., Martignago D., Mead A., Hanley S.J., Wilkinson P.A., Barker G., Ed-

- wards K.J., Curtis T.Y., Usher S., Kosik O., Halford N.G. (2021) Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene *TaASN2*. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 1602–1613. <https://doi.org/10.1111/pbi.13573>
67. Hahn F., Sanjurjo Loures L., Sparks C.A., Kanyuka K., Nekrasov V. (2021) Efficient CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in spring and winter wheat varieties. *Plants* (Basel). **10**, 1481. <https://doi.org/10.3390/plants10071481>
68. Liu Y., Luo W., Linghu Q., Abe F., Hisano H., Sato K., Kamiya Y., Kawaura K., Onishi K., Endo M., Toki S., Hamada H., Nagira Y., Taoka N., Imai R. (2021) *In planta* genome editing in commercial wheat varieties. *Front. Plant Sci.* **12**, 648841. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.648841>
69. Krenek P., Chubar E., Vadovic P., Ohnoutkova L., Vlcko T., Bergougnoux V., Capal P., Ovecka M., Samaj J. (2021) CRISPR/Cas9-induced loss-of-function mutation in the barley *Mitogen-Activated Protein Kinase 6* gene causes abnormal embryo development leading to severely reduced grain germination and seedling shootless phenotype. *Front. Plant Sci.* **12**, 670302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670302>
70. Kim D., Hager M., Brant E., Budak H. (2021) Efficient genome editing in wheat using Cas9 and Cpf1 (AsCpf1 and LbCpf1) nucleases. *Funct. Integr. Genomics.* **21**, 355–366. <https://doi.org/10.1007/s10142-021-00782-z>
71. Hayta S., Smedley M.A., Clarke M., Forner M., Harwood W.A. (2021) An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for hexaploid and tetraploid wheat. *Curr. Protoc.* **1**, e58. <https://doi.org/10.1002/cpz1.58>
72. Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Герашенков Г.А., Рожнова Н.А., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матнязов Р.Т., Баймиев А.Х., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. (2019) Доставка CRISPR/Cas-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов. *Физиол. растений.* **66**, 339–353. <https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>
73. Ellison E.E., Chamness J.C., Voytas D.F. (2021) Viruses as vectors for the delivery of gene-editing reagents. *Genome Editing Precision Crop Breed.* **97–122**. <https://doi.org/10.1201/9781003048237>
74. Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y., Gao C. (2017) Efficient DNAfree genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complex. *Nat. Commun.* **8**, e14261. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
75. Liang Z., Chen K., Zhang Y., Liu J., Yin K., Qiu J.L., Gao C. (2018) Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins. *Nat. Protoc.* **13**, 413–430. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.145>
76. Ravi M., Chan S.W. (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature.* **464**, 615–618. <https://doi.org/10.1038/nature08842>
77. Kelliher T., Starr D., Richbourg L., Chintamanani S., Delzer B., Nuccio L.M., Green J., Chen Z., McCuis-ton J., Wang W., Liebler T., Bullock P., Martin B. (2017) MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature.* **543**, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature20827>
78. Yao L., Zhang Y., Liu C., Liu Y., Wang Y., Liang D., Liu J., Sahoo G., Kelliher T. (2018) OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat. Plants.* **4**, 530–533. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0193-y>
79. Laurie D.A., Bennett M.D. (1988) The production of haploid wheat plants from wheat maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* **76**, 393–397.
80. Kelliher T., Starr D., Su X., Tang G., Chen Z., Carter J., Wittich P.E., Dong S., Green J., Burch E., McCuis-ton J., Gu W., Sun Y., Strebe T., Roberts J., Bate N.J., Que Q. (2019) One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat. Biotechnol.* **37**, 287–292. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0038-x>
81. Budhagatapalli N., Halbach T., Hiekel S., Büchner H., Müller A.E., Kumlehn J. (2020) Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer. *Plant Biotechnol. J.* **18**, 2376–2378. <https://doi.org/10.1111/pbi.13415>
82. Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X.Q., Zeng J., He X., Li C. (2020) Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture. *Plant Commun.* **2**, 100082. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100082>
83. Kapusi E., Stoger E. (2018) Detection of CRISPR/Cas9-induced genomic fragment deletions in barley and generation of homozygous edited lines via embryogenic pollen culture. *Methods Mol. Biol.* **1789**, 9–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7856-4_2
84. Li S., Lin D., Zhang Y., Deng M., Chen Y., Lv B., Li B., Lei Y., Wang Y., Zhao L., Liang Y., Liu J., Chen K., Liu Z., Xiao J., Qiu J.L., Gao C. (2022) Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature.* **602**, 455–460. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04395-9>
85. Kis A., Hamar E., Tholt G., Ban R., Havelda Z. (2019) Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 1004–1006. <https://doi.org/10.1111/pbi.13077>
86. Kim S.Y., Bengtsson T., Olsson N., Hot V., Zhu L.H., Ahman I. (2020) Mutations in two aphid-regulated β -1,3-glucanase genes by CRISPR/Cas9 do not increase barley resistance to *Rhopalosiphum padi* L. *Front Plant Sci.* **11**, 1043. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01043>
87. Debernardi J.M., Tricoli D.M., Ercoli M.F., Hayta S., Ronald P., Palatnik J.F., Dubcovsky J. (2020) A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration effi-

- ciency of transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1274–1279.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0703-0>
88. Karunarathne S.D., Han Y., Zhang X.Q., Li C. (2022) CRISPR/Cas9 gene editing and natural variation analysis demonstrate the potential for *HvARE1* in improvement of nitrogen use efficiency in barley. *J. Integr. Plant Biol.* **64**, 756–770.
<https://doi.org/10.1111/jipb.13214>
89. Vlcko T., Ohnoutkova L. (2020) Allelic variants of CRISPR/Cas9 induced mutation in an inositol triphosphate 5/6 kinase gene manifest different phenotypes in barley. *Plants* (Basel). **9**, 195.
<https://doi.org/10.3390/plants9020195>
90. Garcia-Gimenez G., Barakate A., Smith P., Stephens J., Khor S.F., Doblin M.S., Hao P., Bacic A., Fincher G.B., Burton R.A., Waugh R., Tucker M.R., Houston K. (2020) Targeted mutation of barley (1,3;1,4)- β -glucan synthases reveals complex relationships between the storage and cell wall polysaccharide content. *Plant J.* **104**, 1009–1022.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14977>
91. Yang Q., Zhong X., Li Q., Lan J., Tang H., Qi P., Ma J., Wang J., Chen G., Pu Z., Li W., Lan X., Deng M., Harwood W., Li Z., Wei Y., Zheng Y., Jiang Q. (2020) Mutation of the D-hordein gene by RNA-guided Cas9 targeted editing reducing the grain size and changing grain compositions in barley. *Food Chem.* **311**, 125892.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125892>
92. Gerasimova S.V., Hertig C., Korotkova A.M., Kolosovskaya E.V., Otto I., Hiekel S., Kochetov A.V., Khlestkina E.K., Kumlehn J. (2020) Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the *NUD* gene. *BMC Plant Biol.* **20**, 255.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02454-9>
93. Gao Y., Zhao Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 343–349.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
94. Gasparis S., Kała M., Przyborowski M., Łyżnik L.A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2018) A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Methods.* **14**, 111.
<https://doi.org/10.1186/s13007-018-0382-8>
95. Gasparis S., Przyborowski M., Kała M., Nadolska-Orczyk A. (2019) Knockout of the *HvCKX1* or *HvCKX3* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) by RNA-guided Cas9 nuclease affects the regulation of cytokinin metabolism and root morphology. *Cells.* **8**, 782.
<https://doi.org/10.3390/cells8080782>
96. Singh M., Kumar M., Albertsen M.C., Young J.K., Cigan A.M. (2018) Concurrent modifications in the three homeologs of *Ms45* gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol.* **97**, 371–383.
<https://doi.org/10.1007/s11103-018-0749-2>
97. Zheng M., Lin J., Liu X., Chu W., Li J., Gao Y., An K., Song W., Xin M., Yao Y., Peng H., Ni Z., Sun Q., Hu Z. (2021) Histone acetyltransferase TaHAG1 acts as a crucial regulator to strengthen salt tolerance of hexaploid wheat. *Plant Physiology.* **186**, 1951–1969,
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab187>
98. Tian X., Qin Z., Zhao Y., Wen J., Lan T., Zhang L., Wang F., Qin D., Yu K., Zhao A., Hu Z., Yao Y., Ni Z., Sun Q., De Smet I., Peng H., Xin M. (2022) Stress granule-associated *TaMBF1c* confers thermo-tolerance through regulating specific mRNA translation in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* **233**, 1719–1731.
<https://doi.org/10.1111/nph.17865>
99. Chen Z., Ke W., He F., Chai L., Cheng X., Xu H., Wang X., Du D., Zhao Y., Chen X., Xing J., Xin M., Guo W., Hu Z., Su Z., Liu J., Peng H., Yao Y., Sun Q., Ni Z. (2022) A single nucleotide deletion in the third exon of *FT-D1* increases the spikelet number and delays heading date in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.*
<https://doi.org/10.1111/pbi.13773>
100. Wang P., Li G., Li G., Yuan S., Wang C., Xie Y., Guo T., Kang G., Wang D. (2021) TaPHT1;9-4B and its transcriptional regulator TaMYB4-7D contribute to phosphate uptake and plant growth in bread wheat. *New Phytol.* **231**, 1968–1983.
<https://doi.org/10.1111/nph.17534>
101. Miroshnichenko D., Ashin D., Pushin A., Dolgov S. (2018) Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum* L.), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnol.* **18**(1), 68.
<https://doi.org/10.1186/s12896-018-0477-3>
102. Miroshnichenko D., Klementyeva A., Pushin A., Dolgov S. (2020) A competence of embryo-derived tissues of tetraploid cultivated wheat species *Triticum dicoccum* and *Triticum timopheevii* for efficient and stable transgenesis mediated by particle inflow gun. *BMC Plant Biol.* **20**(Suppl. 1), 442.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02580-4>
103. Wang K., Shi L., Liang X., Zhao P., Wang W., Liu J., Chang Y., Hiei Y., Yanagihara C., Du L., Ishida Y., Ye X. (2022) The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nat. Plants.* **8**, 110–117.
<https://doi.org/10.1038/s41477-021-01085-8>
104. Gerasimova S.V., Korotkova A.M., Hertig C., Hiekel S., Hoffie R., Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. (2018) Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable siberian barley cultivar using RNA-guided CAS9 endonuclease. *Vavilov J. Genet. Breed.* **22**(8), 1033–1039.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.447>
105. Тимербаев В.Р., Мирошниченко Д.Н., Клементьева А.А., Шульга О.А., Салина Е.А., Долгов С.В. (2021) Молекула РНК-проводника для геномного редактирования промоторной области гена *VRN-A1* однодольных зерновых с применением системы CRISPR/Cas9. Патент на изобретение 2762831 С1, 23.12.2021. Заявка №2020134985 от 26.10.2020.

Genome Editing of Representatives of the Triticeae Tribe Using the CRISPR/Cas System

B. R. Kuluev^{1, 2 *}, E. V. Mikhailova^{1, 2}, A. R. Kuluev¹, A. A. Galimova^{1, 2},
E. A. Zaikina¹, and E. K. Khlestkina²

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

²*Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint Petersburg, 190000 Russia*

*e-mail: kuluev@bk.ru

The tribe Triticeae includes such important agricultural crops as bread wheat, durum wheat, barley, rye and triticale. Research in the field of reverse genetics and genetic engineering of the Triticeae received a new impetus after the active use of the CRISPR/Cas genome editing system. This review collects and analyzes data on recent successes in genomic editing of cultivated plants of the Triticeae tribe and the tools used. The most commonly used arsenal for genome editing of Triticeae includes the codon-optimized *Cas9* gene under the control of the maize ubiquitin gene promoter and guide RNAs under the control of Pol III promoters U6 and U3 in one or more binary vectors. The genes for resistance to phosphinothricin and hygromycin are used as selective genes. To obtain edited plants, the methods of agrobacterium-mediated transformation and biolistics are used, while immature embryos are used as explants. Approaches are being developed to overcome the problem of low regenerative capacity of representatives of the Triticeae tribe: *in planta* transformation of shoot apical meristems, transformation of microspores and pollen grains, and the use of haploinductors. Much of the work published to date has been devoted to the genomic editing of bread wheat and barley, although recent years have seen the emergence of CRISPR/Cas knockout studies of target genes in durum wheat and triticale. Further progress in the development of genome editing of cultivated plants of the Triticeae tribe should be aimed at expanding the range of species and varieties involved, as well as overcoming the problems of low regenerative capacity, which will allow genetic modification work to be carried out in elite varieties that will be in demand in agricultural production.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Triticum durum*, ×*Triticosecale*, bread wheat, barley, promoters, selectable gene, agrobacterium-mediated transformation, immature embryos, microspores, haploinductors