

УДК 581.1

ДОСТУПНЫЙ АРСЕНАЛ СИСТЕМ CRISPR/CAS ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

© 2022 г. Е. В. Михайлова^а, *, Э. А. Хуснутдинов^а, А. В. Чемерис^а, Б. Р. Кулуев^а

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: mikhele@list.ru

Поступила в редакцию 01.03.2021 г.

После доработки 06.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

В настоящее время наиболее быстрым и эффективным методом получения растений с желаемыми признаками является геномное редактирование CRISPR/Cas. Основное его отличие от традиционной геномной инженерии состоит в том, что редактирование производится в заранее известном месте генома. Поэтому помимо прикладного применения, геномное редактирование все чаще используется в фундаментальных исследованиях функций собственных генов растений. Однако технология CRISPR/Cas до сих пор изучается в большей степени не на растениях, а на бактериальных и животных объектах. Тем не менее, существуют простые в применении системы векторов, содержащие широкий ассортимент элементов для редактирования генома растений, а также регуляции экспрессии целевых генов. От исследователя требуется только выбрать подходящую ему систему и адаптировать ее под свой объект и цели эксперимента. В данной статье представлен подробный обзор возможностей, которые предоставляют доступные на сегодняшний день системы для геномного редактирования растений.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR, Cas9, Cas12a, Cas12b, Csy4, Ecl2, геминивирусы, нокаут, нокин

DOI: 10.31857/S0015330322010134

ВВЕДЕНИЕ

Редактирование генома заключается в использовании сайт-специфических эндонуклеаз, распознающих заданный исследователями участок ДНК. Природные нуклеазы осуществляют в этом месте разрыв (“молекулярные ножницы”). Хотя в широком смысле в геномном редактировании могут использоваться также мегануклеазы, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и нуклеазы типа “цинковых пальцев” (ZFN) [1–3], именно CRISPR/Cas является наиболее простой, стремительно развивающейся и широко применяемой технологией. И сейчас, говоря о геномном редактировании, чаще всего подразумевают систему CRISPR/Cas. Помимо этого, в CRISPR двуцепочечный разрыв способна осуществлять единственная нуклеаза, распознающая одну гидовую РНК, тогда как в методах ZFN и TALEN требуются две нуклеазы.

Хотя метод CRISPR/Cas и может приводить к нецелевым мутациям, для растений такая проблема не является критичной, и поэтому именно эта технология для растительных объектов обладает

наибольшим потенциалом практического применения. Соя, рыжик посевной, различные газонные травы с отредактированным геномом уже вышли на рынок [4]. Внедрение геномной терапии, а также сельскохозяйственных животных, полученных с помощью CRISPR/Cas, до сих пор не состоялось, несмотря на то, что исследования в этой области ведутся гораздо более интенсивно.

Первые статьи с упоминанием CRISPR датируются 2002 г. [5], и на данный момент их насчитывается более 22 тыс. Однако первые сообщения о геномном редактировании растений с использованием этой технологии появились только в 2013 г. [6–8]. На начало 2021 г. статей по растительной тематике в базе PubMed менее 3 тыс. (рис. 1).

В этой сфере работают некоторые научные коллективы, заинтересованные в большей степени в создании работоспособных геном-инженерных конструкций, которые можно адаптировать под разные задачи, нежели во всестороннем исследовании растений, геном которых удалось отредактировать. К сожалению, созданный ими обширный инструментальный для геномного редакти-

рования остается по большей части вне фокуса внимания физиологов растений, хотя он и имеется в открытом доступе в виде разнообразных систем так называемых “пустых” или “холостых” векторов. Для обмена молекулярно-биологическими разработками в научном сообществе существуют специальные репозитории. Крупнейшим из них является Addgene (<https://www.addgene.org/>). Известны также такие базы как Kerafast (<https://www.kerafast.com/>) и Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (<https://abrc.osu.edu/>).

De novo создание генно-инженерных конструкций требует времени, большого количества специфических реактивов и оборудования, а также проверки работоспособности на модельных объектах. Поэтому использование готовых, уже проверенных систем позволило бы интенсифицировать исследования растений с редактированным геномом и сократить время их получения. Методом CRISPR/Cas можно добиться как разрушения гена с полной потерей функций, так и точечных мутаций, а также изменения уровня экспрессии без внесения изменений в нуклеотидную последовательность гена. Это дает уникальные возможности по исследованию функций генов растений, геном которых был секвенирован, но не аннотирован полностью, и по выявлению генов, ответственных за хозяйственно-ценные признаки. И хотя в последние годы появилось множество обзоров, объясняющих суть методов геномного редактирования [1, 9–13], а также экспериментальных статей, где генетические конструкции создавались авторами *de novo* [6, 14–20], информация о наработанном за это время доступном инструментарии для геномного редактирования растений до сих пор не была обобщена. Также за последние годы было предложено множество новых способов повышения эффективности геномного редактирования растений.

Цель обзора – обобщение и анализ информации о доступном инструментарии для геномного редактирования растений и его основных элементах, а также об эффективности и перспективах использования каждого из этих элементов в растениях. Он может быть полезен для широкого круга биологов, занимающихся функциональной геномикой, молекулярной и классической физиологией растений.

1. ЭЛЕМЕНТЫ CRISPR/Cas СИСТЕМЫ

Минимальный арсенал для CRISPR-технологии геномного редактирования – это нуклеаза Cas, либо ее модификация, а также гидовая РНК, в составе которой находится невариабельная часть (каркас, scaffold) и спейсер, комплементарный целевому участку генома (протоспейсеру) [3, 13]. В зависимости от класса растений используются промоторы для однодольных либо двудоль-

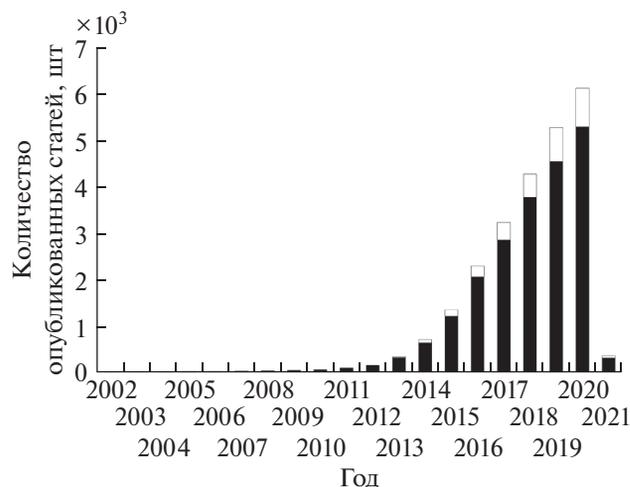


Рис. 1. Доля статей о растениях (выделена белым цветом) среди статей по тематике CRISPR/Cas в 2002–2021 гг., согласно статистическим данным PubMed.

ных, а последовательность гена нуклеазы может быть оптимизирована по кодонному составу в зависимости от объекта. Генно-инженерные конструкции могут включать и другие важные элементы – селективные гены, активаторы и репрессоры, усилители эффективности и специфичности, донорную ДНК. В частности, предложено множество вариантов решения вопроса доставки не одной, а множества гидовых РНК в растение. Во многих системах представлены деактивированные Cas9 (dCas9), соединенные с разнообразными эффекторами для активации либо репрессии транскрипции в заданном месте без образования разрывов. Об эффективности некоторых дополнительных элементов (таких как экзонуклеаза TREX2) при геномном редактировании растений пока мало информации, тогда как по другим (к примеру, активаторам экспрессии VP64 и VPR) накопилось достаточно много экспериментальных данных. Если для нокаута растительных генов в свободном доступе имеется несколько систем векторов, то осуществлять нокин (knock-in, вставку в геном растения донорной ДНК) позволяет пока что только одна (табл. 1). В целом, выбор конкретных векторов для решения собственных прикладных задач требует глубокого понимания назначения и эффективности каждого из их элементов.

Cas-нуклеазы

Показано, что геномное редактирование в растениях можно осуществлять различными типами Cas-нуклеаз. Одним из важнейших их различий, обуславливающих необходимость такого разнообразия, является распознаваемый ими участок PAM (Protospacer Adjacent Motif – мотив, смежный с протоспейсером). Если протоспейсер не

Таблица 1. Некоторые доступные системы для геномного редактирования растений и предоставляемые ими возможности

Авторы систем	Гидовая РНК				Cas										Класс		Промоторы		Дополнительные элементы			
	Pol III	Csy4	Рибозимы	tRNA-gRNA	Cas9	dCas	nCas	Cas12a (Cpf1)	Cas12b	Cms1	Репрессия	Активация	Прайм	Редактирование	Однодозные	Двудозные	Сильные	Тканеспецифичные	Вирусные	TREX	Нокин	
Xing et al., 2014 [81]	+				+						+				+	+	+					
Ma et al., 2015 [82]	+				+										+	+	+					
Lowder et al., 2015 [41]	+				+	+	+				+				+	+	+					
Xie et al., 2015 [58]				+	+										+							
Vazquez-Vilar et al., 2016 [42]	+			+	+	+					+				+	+	+					
Cermak et al., 2017 [46]	+	+	+	+	+	+	+								+	+	+	+		+		+
Chen et al., 2017 [49]					+											+	+	+				
Lowder et al., 2017 [43]	+				+	+						+			+	+	+					
Tang et al., 2017 [23]			+										+		+		+					
Ordon et al., 2017 [84]	+				+		+									+	+	+				
Ming et al., 2020 [22]			+		+										+		+					
Hahn et al., 2020 [21]	+				+										+	+	+					

соседствует с участком PAM, специфичным для данной нуклеазы, то она не работает.

Нуклеаза Cas9 – самая известная и распространенная в геномном редактировании, была впервые позаимствована у бактерии *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). У нуклеазы данной бактерии PAM представляет собой последовательность нуклеотидов 5'-NGG, тогда как у *Staphylococcus aureus* это 5'-NNGRRT, а у *Streptococcus thermophilus* – 5'-NRRGAA [21]. Для образования комплекса с Cas9 требуются крПНК (crispr RNA – около 30 нуклеотидов, 20 из которых представляют собой спейсер, определяющий таргетирование) и тракрПНК (trans-activated CRISPR RNA – около 70 консервативных нуклеотидов на 3'-конце), которые обычно объединены в одну sgRNA. Данная нуклеаза образует двуцепочечные разрывы с тупыми концами, а также может образовывать небольшие делеции (1–3 п. н.) [22].

Позже была открыта нуклеаза Cas12a (Cpf1), которая оказалась более подходящей для множественного таргетирования, а также для растений, богатых AT-участками. Она образует более длинные делеции размером 6–13 п. н. [23]. В отличие от Cas9, PAM для этой нуклеазы имеет последовательность 5'-TTTN и находится перед протоспейсером, а не после него. Нуклеаза *Francisella novicida* (FnCpf1) распознает еще более короткий PAM 5'-TTN [24]. Для формирования активного комплекса с Cas12a достаточно только крПНК [16, 23, 25]. Двуцепочечный разрыв же происходит дальше от протоспейсера (в 13–23 п. н.), и оставляет липкие концы, что позволяет более эффективно проводить нокин [26, 27]. Помимо этого, нуклеаза Cas12a допускает меньше нецелевых мутаций [24].

Cas12b (C2c1) – меньшая по размеру нуклеаза, чем предыдущие. Как и Cas12a, она предпочитает T-богатые PAM (5'-TTTN или 5'-TTN) и создает липкие концы в месте двуцепочечного разрыва и более крупные делеции, чем Cas9 (4–14 п. н.) в промежутке от 12 до 24 нуклеотидов после PAM. Cas12b обеспечивает высокую специфичность геномного редактирования, поскольку чувствительна к замене даже одного нуклеотида в последовательности протоспейсера. Как и для Cas9, для работы этой нуклеазы требуется как крПНК, так и тракрПНК. Cas12b *Alicyclobacillus acidiphilus* (AaCas12b) была наиболее эффективна для геномного редактирования риса по сравнению с аналогичными нуклеазами *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AacCas12b) и *Bacillus thermoamylovoran* (PAM 5'-ATTN) [22]. Также была показана возможность использования Cas12b на примере хлопчатника [28] и *Arabidopsis thaliana* [20].

Cms1 (Cas12e) – одна из самых маленьких среди изученных нуклеаз, которая, как и Cas12a, нуждается только в крПНК и не требует тракрПНК. Она обнаружена у *Smithella sp.*, *Microgeno-*

mates sp., *Omnitrophica sp.* и *Sulfuricurvum sp.* и распознает AT-богатые PAM (5'-TTN). В отличие от остальных нуклеаз, которые испытывались сначала на клетках животных, Cms1 впервые была опробована именно на растениях, путем биобаллистики каллусов риса [29]. Тем не менее, систем с этой нуклеазой в свободном доступе пока нет (табл. 1).

Оптимальной температурой для работы нуклеазы SpCas9 является 32°C, Cas12a – 28–32°C, Aac-Cas12b – 40°C, AaCas12b – 31°C, что снижает эффективность их применения в растениях [28, 30, 31]. Температурный оптимум для Cms1 пока не определен. В растениях активность Cas12a снижалась также в темноте, тогда как с Cas9 такой зависимости не наблюдалось [27].

Для преодоления ограничений, имеющихся у природных нуклеаз, успешно создаются их модифицированные варианты, в том числе с измененными PAM. Например, создана IspyMacCas9, распознающая последовательность 5'-NAAR; SpCas9-VQR, распознающая последовательности 5'-NGAN и 5'-NGNG; SpCas9-NG, для которой достаточно PAM 5'-NG [30–33]. Разнообразие Cas особенно важно для геномного редактирования растений. Геномы различных видов могут значительно различаться по кодонному составу: по некоторым оценкам, от 43.44% GC в кодирующих участках генома тополя до 55.37% у кукурузы [34]. Таким образом, в зависимости от объекта исследования могут быть использованы нуклеазы, распознающие AT- либо GC-богатые PAM. Кроме того, минимальная температура, обеспечивающая геномное редактирование с природными Cas составляет 28°C, тогда как комфортные условия для наиболее распространенного модельного растения *A. thaliana*, а также многих сельскохозяйственных культур – 20–22°C. Поскольку для животных организмов эта проблема не была актуальна, поиск ее решения начался лишь недавно. Пока что единственным способом повысить эффективность геномного редактирования *A. thaliana* был тепловой стресс при 37°C [35], тогда как низкотемпературные нуклеазы до сих пор не разработаны. Однако у агробактерий, которые чаще всего используются для трансформации растений, тоже есть свой температурный оптимум – около 27°C, поэтому тепловой стресс может негативно влиять на их жизнеспособность и снижать эффективность трансформации. В связи с этим, в экспериментах по геномному редактированию необходимо предусматривать обеспечение температурного режима, необходимого не только для работы Cas, но и для выживания и агробактерий, и самих растений.

Деактивированная Cas-нуклеаза (dCas)

Широко применяемой модификацией Cas, о которой необходимо упомянуть отдельно, явля-

ется ее деактивированная форма, не способная осуществлять двуцепочечный разрыв. Этого добиваются путем внесения точечных мутаций. Для Cas9 это обычно мутация D10A в каталитическом домене RuvC1 и мутация H840A в каталитическом домене HNH. Белок Cas, лишенный эндонуклеазной активности (dCas), остается способным связываться с ДНК. Это свойство позволяет использовать такие деактивированные нуклеазы для программирования транскрипции [36]. Будучи дополненными эффекторными доменами (активаторами либо репрессорами), dCas могут регулировать уровень экспрессии целевых генов. Эффекторы присоединяют к С-концу dCas9. Для этой цели может быть использован как единственный эффектор, так и несколько эффекторов в тандеме [15, 36]. Гидовые РНК при этом подбирают для промоторной области.

Одним из наиболее часто используемых в геномном редактировании растений активаторов транскрипции является VP64 (тетрамер активационного домена вируса герпеса VP16), EDLL (уникальный мотив транскрипционных факторов AP2/ERF *A. thaliana*, активирующих защитную реакцию на стресс), а также тандем активаторов VPR, состоящий из последовательностей VP64, р65 и Rta. Субъединица р65 (RELA, NFKB3) — одна из основных в универсальном факторе транскрипции NF-κB, необходимом для функционирования клетки [15]. RTA — активатор репликации и транскрипции (Replication and Transcription Activator) вируса Эпштейна — Барр [37–40]. Встречаются и другие активаторы, такие как активационный домен фактора теплового шока 1 (HSF). В тандеме с VP64 HSF в 2–3 раза увеличивал экспрессию гена *PAP1 A. thaliana*, и в 2–5 раз — гена *AVP1* вакуолярной пиррофосфатазы *A. thaliana* [15]. Однако если в клетках человека VPR активировал экспрессию в 320 раз лучше, чем VP64, то в растениях такого эффекта удалось достичь только с использованием модифицированных гидовых РНК. С помощью VP64 и EDLL удавалось повысить уровень экспрессии растительных генов в 2–7 раз [41–43], что, однако, не приводило к ожидаемым фенотипическим изменениям. По всей видимости, многое зависит и от выбранного целевого гена: так, с использованием VP64 уровень экспрессии гена *FIS2* (негативного регулятора развития семян до оплодотворения) увеличивался в 200 раз [41], чего не удавалось добиться ни с одним другим геном. При этом тандем VP64-EDLL оказался практически не эффективен в отношении того же гена.

Из репрессоров транскрипции в растениях используются KRAB (домен “цинковых пальцев” человека, от англ. *krüppel-associated box*), SRDX (модифицированный растительный репрессор EAR), BRD (домен репрессии B3 *A. thaliana*) [15]. С использованием SRDX уровень экспрессии ге-

на AtCSTF64 *A. thaliana* снижался на 60%, а дублирующих генов микроРНК miR159A и miR159B — на 60–80% [41]. Содержание транскриптов гена некодирующей микроРНК miR159b удалось снизить в 10 раз [23]. Деактивированная Cas может служить репрессором транскрипции и сама по себе [45].

Для усовершенствования метода использовали множественные гидовые РНК [44], а также присоединение эффекторов не только к dCas, но и к гидовой РНК [41], о чем речь пойдет в соответствующем разделе. Интересно отметить, что эффективность dCas при снижении температуры, по всей видимости, не падает, что было продемонстрировано на примере *A. thaliana* и репрессора dCas12a-SRDX [30].

Деактивированные Cas предоставляют широкие возможности для исследования последствий изменения уровня экспрессии собственных генов растений, а также работы генных сетей. Во многих рассмотренных работах изменение уровня транскриптов гена не оказывало ожидаемого влияния на фенотип растения. Таким образом, использование dCas позволяет выявить гены, вносящие действительно заметный вклад в проявление хозяйственно-ценных признаков у растений.

Никазы (*nCas*)

Cas-никазы разрезают только одну цепь двуцепочечной ДНК благодаря мутации, индуцированной только в одном из двух каталитических доменов белка Cas. Две никазы с парой гидовых РНК используют с целью повышения специфичности редактирования генома. Никазы способны снизить вероятность возникновения нецелевых мутаций в 1500 раз [39, 46]. Тем не менее, CRISPR с использованием никаз теряет одно из преимуществ перед TALEN и ZFN, заключающееся в использовании единственной нуклеазы. В целом, использование двух никаз для геномного редактирования растений встречается в литературе крайне редко [47].

Большее распространение получило другое применение никаз — редактирование оснований (base-editing) и праймированное редактирование (prime editing). Редактирование оснований — вариант системы CRISPR/Cas, в котором достигаются точечные однонуклеотидные замены без создания двуцепочечных разрывов [48]. Для этой цели к никазе присоединяется два фермента с N- и С-концов, соответственно. Первый — цитозиндезаминаза (например, gAPOBEC1), преобразующая цитозин в урацил, который в результате транскрипции и репликации превращается в тимин. Второй — ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы, который не позволяет ферментам репарации вырезать урацил из ДНК. При этом на второй цепи никаза делает одноцепочечный разрыв, и

путем репарации заменяет гуанин на аденин. Были созданы также искусственные редакторы аденинов, являющиеся производными аденозиндезаминаз [48]. Редактирование оснований происходит в пределах 3–8 нуклеотидов протоспейсера при использовании Cas9. В целом, сейчас имеются инструменты для редактирования любых оснований [21, 39, 49]. Интересной системой является также EvolvR, где для редактирования оснований к Cas присоединяют ник-транслирующую ДНК полимеразу, которая может производить рандомные точечные мутации в промежутке до 350 п. н. [21, 50].

Праймированное редактирование заключается во внесении направленных изменений в последовательность ДНК – в частности, небольших инсерций и делеций (18–80 п. н.) и точечных мутаций в районе последовательности PAM [51]. Для этого используется никаза, слитая с обратной транскриптазой (природной M-MLV либо ее мутантной формой). Также обязательно используется удлиненная гидовая РНК для праймированного редактирования (регRNA, пргРНК), содержащая в себе донорную последовательность. Спейсер для таргетирования целевой последовательности может находиться как в составе пргРНК, так и быть вынесенным в отдельную гидовую РНК. Несмотря на то, что технология была разработана совсем недавно [51], она сразу же начала интенсивно применяться на растениях, причем в основном однодольных. С использованием кодон-оптимизированных для растений никаз и обратной транскриптазы удалось провести праймированное редактирование клеток риса, пшеницы и томата, однако эффективность оказалась на порядок ниже, чем в клетках человека. В растениях эффективность трансформации и доля растений с ожидаемыми мутациями в геноме оказывалась выше, когда спейсер находился в составе пргРНК, а не отдельной гидовой РНК. В целом, ожидаемые мутации обнаруживались менее чем в 9% трансформантов. Важное значение также имел целевой участок генома. К сожалению, праймированное редактирование в растениях приводит в основном к появлению химер и гетерозигот, у которых изменения в фенотипе могут не наблюдаться, что является существенным препятствием для применения технологии на практике [19, 52–55].

Некоторые хозяйственно-ценные признаки растений ассоциированы с однонуклеотидными заменами: гены устойчивости к гербицидам (*C287*, *ACC-T1*, *ALS*), стрессам (*MPK6*, *RLCK185*, *CERK1*, *Pi-d2*), улучшения азотного питания (*NRT1.1B*, *SLR1*) и урожайности (*SPL14*, *GRF4*, *GRF3*) уже были использованы в качестве мишеней для внесения точечных мутаций [48]. Редактирование оснований и праймированное редактирование таких генов имеют высокий потенциал практического применения.

Гидовые РНК

Поскольку в растениях хозяйственно-ценные признаки могут зависеть от нескольких, часто дублирующих генов, именно для растительных объектов наиболее остро стоит вопрос о том, как одновременно редактировать множество генов. Наиболее сложно дела обстоят с полиплоидами – мягкой пшеницей, рапсом и др. С одной стороны, экспрессионные кассеты слишком большого размера снижают эффективность трансформации. С другой стороны, именно попытка решения этих проблем в значительной степени способствовала бурному развитию методов доставки в растительные клетки множественных гидовых РНК [39].

Если используется единственная гидовая РНК, то она обычно находится под контролем Pol III-промотора (рис. 2а), что накладывает некоторые ограничения. В частности, после Pol III промотора U6 обязательно должен следовать гуанин, тогда как после Pol III промотора U3 – аденин. При наличии только одной гидовой РНК удается получить только небольшие делеции до 14 п. н., тогда как при использовании нескольких гидовых РНК чаще всего возникают крупные делеции между сайтами редактирования, что позволяет более эффективно нокаутить целевой ген [46]. Конструкции, где каждая из нескольких гидовых РНК находится под контролем отдельного Pol III промотора, являются не только громоздкими, но и неудобными для клонирования в них спейсеров, поскольку это нельзя осуществить в одной пробирке. К тому же используемые Pol III промоторы не могут обеспечить тканеспецифичную экспрессию [16].

Более подходящим вариантом решения является полицистронная регуляция экспрессии гидовых РНК. В таком случае все они находятся под контролем одного Pol II (например, 35S CaMV) либо Pol III промотора, что позволяет сократить размер генно-инженерной конструкции [46]. Могут использоваться разные механизмы для дифференциации гидовых РНК (рис. 2б–г): Csy4, рибозимы и тРНК.

CRISPR-ассоциированная эндорибонуклеаза Csy4 из *Pseudomonas aeruginosa*, экспрессируемая вместе с Cas9, распознает и разрезает фрагменты размером 28 п. н. с двух сторон от каждой из гидовых РНК в полицистронной конструкции (рис. 2б). Рибозимы могут разрезать определенные последовательности РНК, в том числе саморасщепляться (рис. 2в). Их располагают с двух сторон от каждой гидовой РНК – например, растительный рибозим типа hammerhead с 5'-конца, а рибозим вирус гепатита типа HDV с 3'-конца [23, 56, 57]. Таким образом, при транскрипции рибозимы осуществляют саморазрезание, высвобождают индивидуальные гидовые РНК, и они попадают в клетку уже в виде отдельных молекул.

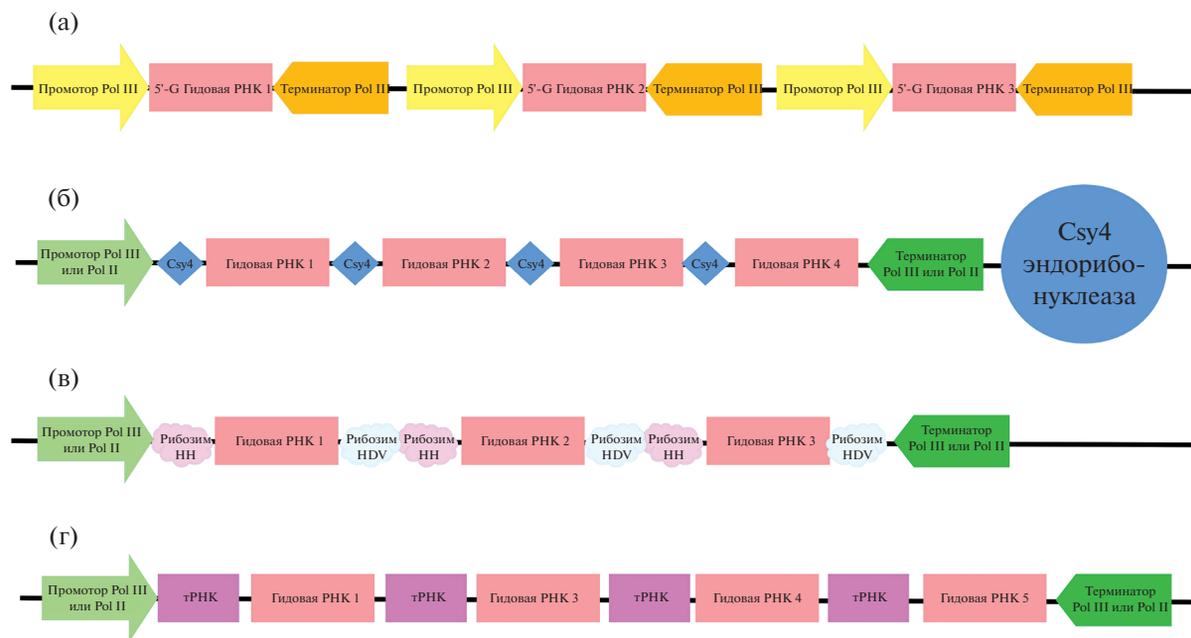


Рис 2. Схематическое изображение множественных гидовых РНК в составе генно-инженерных конструкций: (а) — моноцистронные, (б) — полицистронные, расщепляемые Csy4, (в) — полицистронные, расщепляемые рибозимами, (г) — полицистронные tRNA-gRNA, расщепляемые РНКазами.

Следующий из используемых методов множественного таргетирования — система tРНК-гидовая РНК (рис. 2г). В данном случае последовательности гидовых РНК перемежаются со структурами tРНК (polycistronic tRNA-gRNA — PTG), распознаваемыми РНКазами P и Z. РНКазы осуществляют разрез, высвобождая гидовые РНК. В отличие от Csy4, эти ферменты присутствуют в клетке, где катализируют процессинг tРНК [58, 59]. Используя Cas12a вместо Cas9, можно еще укоротить полицистронную кассету, поскольку для работы этой нуклеазы достаточно гидовых РНК меньшего размера.

В системах со множественными гидовыми РНК наличие лишних нуклеотидов и другие модификации приводят к снижению способности полицистронных гидовых РНК образовывать комплексы с Cas9 [39]. Тем не менее, показано, что Csy4 и tRNA-gRNA системы в растениях могут быть почти в два раза более эффективными, чем гидовые РНК, имеющие отдельные промоторы, чего нельзя сказать о рибозимных системах [46].

Модифицированные гидовые РНК используются для активации транскрипции наряду с модифицированными Cas. Такая система была названа CRISPR-Act2.0 [43, 44]. Деактивированная нуклеаза dCas9-VP64 повышала экспрессию целевых генов риса (Os03g01240 и Os04g39780) в 3–4 раза эффективнее при использовании гидовой РНК, совмещенной с активатором транскрипции VP64, нежели с обычной гидовой РНК. Для создания гидовой РНК 2.0 эффектор VP64 объединяли с белком

оболочки бактериофага MS2, а в каркас гидовой РНК встраивали шпильку, которая связывалась с этим белком. Такая система повышала экспрессию гена *PAP1A. thaliana* в 30–40 раз, а гена *FIS2* — в 1500 раз, тогда как dCas9-VP64 с обычной гидовой РНК — в 7 и 200 раз, соответственно. Как и в случае с различными модификациями Cas, уровень экспрессии в значительной степени зависел от выбранных гена и эффектора. Когда с dCas9-VP64 использовалась гидовая РНК 2.0 с эффектором EDLL вместо VP64, экспрессия каждого из генов увеличивалась в 30 раз. Для гена *FIS2* это более слабый результат, чем при использовании обычной гидовой РНК. Данная идея получила развитие, когда спонтанная мутация при клонировании привела к появлению гидовой РНК 2.1 [60]. Она была испытана на гомологе гена *DFR* (дигидрофлавонол-4-редуктазы) и транскрипционном факторе *AN2 (Anthocyanin2)* табака *Nicotiana benthamiana*. Авторам удалось достичь повышения активности гена *NbDFR* в 10 тысяч раз, а гена *NbAN2* — в 4 тыс. раз.

Промоторы

Повторение одного и того же промотора в генно-инженерной конструкции является нежелательным, поэтому важно иметь возможность комбинировать разные промоторы [46]. Поскольку генно-инженерные конструкции включают большое разнообразие элементов, становится актуальным вопрос возможности выбора промотора

для каждого из этих элементов, либо их полицистронной экспрессии. В геномном редактировании растений имеет значение еще и вид растения, поскольку для однодольных и двудольных используются специализированные конститутивные промоторы. Для двудольных эффективными считаются 35S CaMV промотор, *pos*-промотор гена нопалин-синтазы и убиквитиновые промоторы *A. thaliana* (AtUbi), сои (GmUbi) и др., а для однодольных – убиквитиновый промотор кукурузы (ZmUbi), промотор актина риса (OsAct) и др. [46, 61].

Однако конститутивные промоторы не подходят для решения некоторых задач, в частности, трансформации генеративных тканей и зародышей. Методы трансформации *in planta*, когда агробактериями обрабатываются соцветия, применяются во всем мире на *A. thaliana* и родственных ему растениях. При использовании конститутивных промоторов для трансформации *in planta* семенное потомство часто оказывается мозаичным, поскольку инфицирование агробактериями на стадии зиготы может приводить к появлению в тканях растения одновременно трансформированных и нетрансформированных клеток [62, 63]. Использование промотора 35S CaMV приводит в основном к соматическим мутациям и в сое [64]. Кроме того, известно, что промотор 35S CaMV демонстрирует слабую активность в яйцеклетках и не начавших делиться зиготах [65].

Использование тканеспецифичных промоторов, которые работают только в растительных яйцеклетках, позволяет значительно повысить эффективность получения гомозиготных трансформантов. Когда экспрессией Cas9 управлял специфичный для яйцеклеток Ec1.2 промотор *A. thaliana* и использовался терминатор *rbcS E9 Pisum sativum*, в результате трансформации методом погружения цветков удавалось получить 8.3% гомозигот с желаемыми мутациями и только одно мозаичное растение (менее 1%). Однако, когда использовался терминатор *nos*, геномное редактирование оказывалось неэффективным [63]. Специфичные для яйцеклеток промоторы были испытаны на *A. thaliana* (промотор AtP5p и синтетический промотор AtEC1.2e1.1p, состоящий из *cis*-регуляторных элементов промоторов AtEC1.1 и AtEC1.2) и сое (промоторы GmEC1.1p и GmEC1.2p). Лучше всего проявил себя синтетический промотор AtEC1.2e1.1p, примененный для геномного редактирования *A. thaliana* – до 42.9% растений второго поколения сохраняли мутацию, произведенную Cas9. Этот же промотор сработал в сое, тогда как остальные три были в ней неэффективны [64].

Для снижения доли химер использовали также специфичный для яйцеклеток промотор DD45 и специфичный для пыльцы промотор LAT52, однако эффективность редактирования оказалась

низкой [65]. Было получено лишь три мутанта с использованием промотора гена *DD45* и ни одного – с промотором гена *LAT52*. Это может быть связано с тем, что в обоих случаях использовался терминатор *nos*, который снижал эффективность редактирования [63]. Наследуемые мутации удавалось получить с использованием конститутивного промотора RPS5A, хорошо экспрессирующегося в яйцеклетках. В данной работе использовался терминатор 35S [66].

Использование промотора YAO, специфичного для пыльцы и зародышевого мешка, а также активно делящихся тканей, было еще более успешным. Тогда как только 4.3% трансгенных растений первого поколения приобретали желаемую мутацию при использовании промотора 35S CaMV, с промотором YAO эффективность геномного редактирования составила 88.5 и 90% в зависимости от нокаутированного гена (*PDS3* и *bri1*, соответственно). Тем не менее, мутация передавалась только 6.67% потомства [67]. Позже на *A. thaliana* были испытаны промоторы CLAVATA3, YAO и искусственный EC1.1/EC1.2 с терминатором *rbcS E9* [68]. Многие трансформанты, полученные с использованием промоторов CLAVATA3 и YAO, были нежизнеспособны или стерильны, тогда как при использовании EC1.1/EC1.2 мутации наследовались в 74% полученных линий.

В другом исследовании удалось произвести нокин гена флуоресцентного белка *GFP* в трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие Cas9 под контролем промотора DD45. С использованием других промоторов (Lat52, YAO и CDC45, специфичного для бутонов), а также при трансформации растений дикого типа единой конструкцией, содержащей нуклеазу, гидовую РНК и донорную последовательность, не удалось добиться наследуемых мутаций [69].

Таким образом, наиболее эффективным методом для создания наследуемых мутаций является использование специфичных для яйцеклеток промоторов EC1.1 и EC1.2. Хотя промотор YAO и не так хорошо подходит для целей получения чистых линий растений с отредактированным геномом, он может быть эффективно использован для оценки влияния изменения экспрессии гена на фенотип растения в первом поколении.

Интеграция донорной ДНК при помощи гомологичной репарации двухпочечных разрывов (нокин)

После возникновения двухпочечного разрыва, инициируемого Cas нуклеазой, восстановление цепи ДНК происходит в основном с помощью двух механизмов: негомологичной (non-homologous end joining, NHEJ, НГСК) и гомологичной (homology directed repair, HDR, ГР) репарации молекул ДНК

[3, 13, 70]. В первом случае концы соединяются напрямую, часто с образованием небольших инсерций и делеций. Когда в ядре клетки имеется молекула-донор, имеющая гомологию с участком произведенного разрыва, может происходить гомологичная репарация. За счет последнего механизма и осуществляется нокин – вставка донорной последовательности в месте образуемого Cas9 двуцепочечного разрыва. Эта целевая вставка должна быть окружена последовательностями, гомологичными растительной ДНК (“гомологичные плечи”, *homology arms*) с двух сторон от предполагаемого места двуцепочечного разрыва – по 500–1000 п. н. с каждой стороны [14, 47, 70]. Эффективность гомологичной репарации оказывалась выше при более длинных плечах, однако переставала возрастать при длине свыше 1000 п. н. Эта последовательность высвобождается при помощи нуклеазы – для этого она также с двух сторон должна быть окружена мишенями, распознаваемыми гидовой РНК (протоспейсерами) [46, 62, 71]. До сих пор в растениях гомологичная репарация была малоэффективна, что ограничивает возможности геномного редактирования [70, 72]. Несмотря на достаточно универсальный и понятный термин “нокин”, в литературе для обозначения этого процесса чаще используют термины “гомологичная репарация” (HDR), а также “таргетирование гена” (*gene targeting*), которые подразумевают не только вставку чужеродных элементов (промоторов, генов устойчивости и т.д.), но и внесение целенаправленных мутаций в существующий ген с использованием молекулы-донора.

Упоминания об успешном нокине в растениях встречаются намного реже, чем о нокауте. В первых экспериментах по трансформации методом погружения цветков удалось достигнуть только эффективности 0.14% из 1400 семян *A. thaliana*. Обнаружено только две стабильные линии, где произошла интеграция гена устойчивости к канамидину, использованного в качестве донорной ДНК [47]. Успешным оказался эксперимент по встраиванию последовательности CaMV 35S промотора перед геном *ANT1*, задействованным в биосинтезе антоцианов, что позволило значительно повысить уровень экспрессии данного гена [14]. Тем не менее, эффективность трансформации была достаточно низкой: из более чем 200 трансформированных семядолей удалось получить от 6 до 19 каллусов с антоциановой окраской, свидетельствующих о возрастании уровня экспрессии гена *ANT1*, в зависимости от использованной гидовой РНК. В 69% каллусов донорная ДНК встроилась правильно, однако среди 72 регенерированных из этих каллусов растений правильная вставка имелась только у трех, что говорит о генетической неоднородности каллуса. Эта же группа исследователей добилась гомологич-

ной репарации HDR в картофеле [73], осуществив направленную мутацию (замену определенных кодонов) в гене ацетолактат синтазы (*ALS1*), обеспечивающую устойчивость растения к гербицидам. Однако только в одной из восьми полученных линий произошли ожидаемые мутации.

Конститутивный промотор GOS2 методом нокина был поставлен перед геном *ARGOS8* кукурузы, что позволило увеличить продуктивность полученных растений [74]. В данной работе гомологичные плечи имели длину 400 п. н. При использовании единственной гидовой РНК только 1% полученных проростков имел целевую вставку, тогда как при использовании двух гидовых РНК замена нативного промотора на GOS2 наблюдалась у 1.7% проростков.

С использованием SaCas9 и специфичного для яйцеклеток промотора AtEC1.1/1.2 аналогичная мутация в гене *ALS1 A. thaliana* была успешно индуцирована в 6% семян после трансформации *in planta* [69]. Методом биобаллистики произведен нокин в клетках пшеницы с эффективностью от 0.5 до 6.4% в зависимости от использованной генно-инженерной конструкции и редактируемого гена [75]. Растения из трансформированных клеток исследователи не регенерировали. Наиболее эффективными показали себя плазмиды на основе репликонов геминивирусов, которые способны увеличивать эффективность нокина в 10–100 раз [70].

С появлением новых нуклеаз, которые оставляют “липкие” концы (такие как Cas12a), и с использованием не одного, а нескольких вирусных репликонов, а также при нагревании до 31°C, удалось повысить эффективность интеграции промотора CaMV 35S перед геном *ANT1* томата [14] до 4.51% [27]. Эффективность нокин-редактирования гена устойчивости к гигромицину в рисе с использованием Cas12a составила 8% [29], а внесение мутаций в ген *ALS* риса при помощи этой нуклеазы имело эффективность 1.8% [76].

Еще одним способом совершенствования технологии нокина является использование компонентов, повышающих вероятность гомологичной репарации. К таким компонентам относятся экзонуклеазы, которые способствуют отщеплению нуклеотидов на концах двуцепочечного разрыва и предотвращают самолигирование. На растениях были испытаны TREX2 (3 repair exonuclease 2 – 3' репарационная экзонуклеаза 2) и T5 экзонуклеаза (T5exo), объединенные с Cas. В протопластах томата и ячменя вероятность инделов возрастала в 1.5–2.5 раза при использовании TREX2, при этом наблюдались более длинные делеции и инсерции до 42 п. н. Без TREX2 у 77% протопластов томата и 100% протопластов ячменя делеции были меньше 10 п. н., а инсерций вообще не наблюдалось [46]. В протопластах щетинника зеленого

Setaria viridis эффективность CRISPR при использовании TREX2 увеличилась в 1.4 раза, при этом 94% делеций превышали 10 п. н., тогда как инсерций не наблюдалось [77]. При этом большинство делеций произошло благодаря механизму микргомологии репарации (microhomology-mediated end joining – MMEJ). TREX2 позволил достичь доли 73 и 100% регенерантов с желаемыми мутациями в генах *svDrm1a* и *svDrm1b*, соответственно. В полученных с использованием TREX2 волосовидных корнях (hairy roots) картофеля наблюдалась высокая частота мутаций в гене фитоендесатуразы StPDS (98%), в том числе небольшие инсерции, однако они не передавались регенерантам, а частота регенерации была крайне низкой [78]. Экзонуклеаза T5exo увеличивала частоту и размер делеций в протопластах и трансформантах риса, размер делеций достигал 446 п. н. [79]. Доля делеций среди общего числа мутаций выросла в 1.3–4.3 раза, тогда как доля инсерций снизилась.

Сверхэкспрессия факторов HDR, таких как CtIP, CDK1, RS-1, RAD51 и RAD54 (белков, катализирующих гомологичную рекомбинацию), и супрессия ингибиторов NHEJ, таких как SCR7, рассматривается в качестве еще одного механизма повышения эффективности нокин-редактирования растений [70], пока что неприменяемого на практике.

2. СИСТЕМЫ ВЕКТОРОВ

В единичных работах компоненты CRISPR/Cas системы (гидовая РНК и нуклеаза, а иногда и донорная ДНК) доставлялись в растения по отдельности, в том числе, в трансгенные растения, экспрессирующие Cas9 [8, 80]. Но в подавляющем большинстве случаев происходит доставка в растения всех компонентов в составе единой генно-инженерной конструкции [21, 44, 46, 81, 82]. Системы векторов представляют собой разнообразные плазмиды, из которых методами Gateway cloning или Golden Gate (и его производными – Golden Braid и MoClo) составляется единая бесшовная конструкция для геномного редактирования. Если MoClo позволяет с помощью серии реакций Golden Gate собрать единую конструкцию из четырех плазмид разного уровня (модуля) в одной пробирке, то методом Golden Braid плазмиды объединяются попарно. Реже предлагаются готовые единые конструкции, куда необходимо клонировать только ДНК-последовательность спейсера гидовой РНК [46], однако здесь выбор доступных элементов существенно ограничен.

В большинстве случаев элементы CRISPR/Cas системы находятся в составе Т-ДНК, и для успешного редактирования необходима их интеграция в геном растения, которая происходит в случайном месте, что может негативно отражаться на эффективности их экспрессии [83]. Суще-

ственным недостатком здесь является и то, что растения становятся по сути трансгенными, содержащими в своем геноме последовательности гена нуклеазы, гидовой РНК и селективного гена.

Альтернативным, но редко применяемым вариантом является использование модифицированных репликонов геминивирусов (BeYDV – вируса желтой карликовости бобов, ToLCV – вируса курчавости листьев томата, WDV – вируса карликовости пшеницы и др.), находящихся в составе Т-ДНК и содержащих точку начала репликации LIR по обе стороны от последовательности вирусного генома [14, 73, 75]. После попадания Т-ДНК в ядро, вирус реплицируется по типу катящегося кольца, высвобождая все элементы CRISPR/Cas системы [83]. Их количество в клетке может быть до 80 раз выше, чем без использования вирусного репликона, а продолжительность нахождения репликона в клетке достигает восьми недель после агробактериальной трансформации [27]. При этом встраивания в геном (если речь не идет о нокине, где репликоны геминивирусов тоже очень эффективны) не происходит [14], и полученные растения не считаются трансгенными.

Все описанные ниже системы, кроме одной [46], относятся к первому типу (элементы системы встраиваются в геном), а также не позволяют осуществлять нокин. Содержание каждой из них представлено в таблице 1. Некоторые плазмиды для геномного редактирования были заказаны из репозитория более 100 раз, что говорит о высокой потребности научного сообщества в готовых генно-инженерных конструкциях для редактирования растительных генов. Значительное количество цитирований ряда работ свидетельствует о том, что готовые системы векторов могут быть успешно использованы для получения научных результатов.

Одна из наиболее ранних систем Xing с соавт. [81] состоит из 19 плазмид, в которых используются Cas9, оптимизированные для кукурузы, а гидовые РНК находятся под контролем Pol III промоторов как однодольных, так и двудольных. Имеется также и два варианта деактивированной Cas9 – с репрессивным доменом KRAB (pHSN6I01, Addgene plasmid # 50587) и активатором VP64 (pHSN6A01, Addgene plasmid # 50586). На выбор доступен и один из трех маркеров для селекции в растениях – канамицин, гигромицин или фосфинотрицин. Позднее авторы создали маленькую, но достаточно популярную систему с полицистронными tRNA-gRNA под контролем промотора риса snoRNA U3 и Cas9 под контролем убиквитинового промотора риса. Плазмид в системе всего три, они были заказаны также более 100 раз. Выбор можно сделать только между транзиентной экспрессией в протопластах и агробактериальной трансформацией [58]. Затем авторы создали пять плазмид для редактирования

оснований у двудольных [49]. Все они содержат nCas9(D10A) под контролем промотора 35S CaMV, каркас gRNA для одного спейсера и один из селективных генов для растений.

Коллективом Ma с соавт. [82] было создано 17 плазмид. Часть из них кодирует кодон-оптимизированную для сем. Злаковых Cas9 (с долей GC 62,5%), промотор 35S CaMV либо убиквитинный промотор кукурузы Pubi, и один из трех селективных генов, часть – каркасы гидовых РНК под контролем Pol III промоторов как однодольных, так и двудольных. С помощью данной системы авторам удалось индуцировать наследуемые мутации в 46 различных участках генома риса, и шести участках генома *A. thaliana*.

Международным коллективом авторов [41] создана система, состоящая уже из 37 плазмид. В ней имеется три модуля Golden gate- и Gateway-совместимых векторов. Ранее описанные системы были не более чем двухмодульными. Первый модуль содержит нуклеазу, никазу либо dCas9, в том числе с активатором и репрессором транскрипции. Второй позволяет клонировать спейсеры гидовых РНК, находящихся под контролем Pol III промоторов. Третий позволяет выбрать промотор, под которым будет экспрессироваться Cas9. Существенным недостатком набора является то, что спейсеры гидовых РНК необходимо сначала клонировать каждый в отдельную плазмиду. В системе не предлагается выбор селективного агента. Также Cas9 оптимизирована по кодонному составу только под *A. thaliana* либо человека.

Коллектив Lowder с соавт. [41] продолжили свою работу, сместив акценты в сторону активации транскрипции – системы CRISPR-Act2.0 [43, 44], новых нуклеаз [22] и праймированного редактирования [23]. Еще одна созданная ими система базируется уже на нуклеазе Cas12b, клонировании Gateway и рибозимном процессинге гидовых РНК [23]. Она содержит 29 плазмид для геномного редактирования однодольных, где на выбор доступны только Cas12b различных бактерий, а также деактивированные нуклеазы с активаторами транскрипции. Созданные Tang с соавт. [55] векторы не могут в полной мере считаться системами. Для осуществления праймированного редактирования доступны только две плазмиды: модуль для клонирования спейсера гидовой РНК и модуль, содержащий никазу.

В системе, созданной Vazquez-Vilar с соавт. [42] методом GoldenBraid можно одновременно использовать до пяти полицистронных гидовых РНК-тРНК. К выбору доступны Cas9, кодон-оптимизированная для человека, а также деактивированная Cas9, активаторы VP64 и EDLL и репрессор BRD. Хотя в статье описываются несколько десятков плазмид, всего 14 из них доступны для заказа. Например, доступен только селективный маркер

устойчивости к канамицину и, что отличает систему от всех прочих, – репортерный ген люциферазы *Renilla reniformis*. Авторами собственная система была проверена только транзистентно.

Коллективом Ordon с соавт. [84] создана система “pDGE Dicot Genome Editing Kit” (Addgene kit # 1000000084) для редактирования генома двудольных, которая была испытана на видах *Nicotiana benthamiana* и *A. thaliana*. Набор содержит 41 плазмиду, поставляемую как в 96-луночном планшете, так и по отдельности. Ранее описанные наборы в планшете не поставлялись. Система позволяет использовать одновременно до восьми гидовых РНК, каждая из которых находится под контролем отдельного промотора AtU6. На выбор предлагаются три стандартных селективных маркера. Из нуклеаз доступна только Cas9, в том числе dCas9 с активатором экспрессии Hax3 и никаза (nCas D10A). В наборе плазмид представлен специфичный для яйцеклеток промотор DD45/EC1.2. Тем не менее, в публикации упор сделан на создании делеций, а возможности использования дополнительных элементов не обсуждаются.

Одной из наиболее масштабных систем, включающих 200 различных плазмид, которые могут быть скомбинированы в зависимости от цели исследования, является многофункциональный кит, созданный в Университете Миннесоты [46]. Эта работа рассчитана не только на систему CRISPR/Cas, но и TALEN, а также включает геминивиральные векторы. Доступны как готовые векторы, куда требуется клонировать только спейсер гидовой РНК (серия p_DIRECT), так и векторы, состоящие из трех приобретаемых отдельно модулей (A, B, C) и остова (p_TRANS – transformation backbone).

Плазмиды модуля A кодируют нуклеазу Cas9 дикого типа, либо никазу, либо dCas9, в том числе с активаторами экспрессии. При этом никазы (D10A и H840A) в системе предназначены не для редактирования оснований, а для создания двух одноцепочечных разрывов, что снижает вероятность нецелевых мутаций. В плазмиды модуля B необходимо клонировать один или несколько спейсеров гидовой РНК, которые могут находиться как под контролем индивидуальных Pol III промоторов, так и полицистронно (с помощью и Csy4, и рибозимов, и тРНК). В плазмиды модуля C можно клонировать донорную ДНК для осуществления нокина. Плазмиды p_TRANS кодируют различные селективные гены для трансформации растений. Одним из существенных преимуществ данной системы, отличающих ее от всех остальных, является возможность осуществления нокина, возможность выбора тканеспецифичных промоторов (EC1.2), а также наличие векторов на основе репликонов вирусов (BeYDV, ToLCV, WDV).

Коллективом Hahn с соавт. [21] был разработан инструментарий для геномного редактирования, состоящий из 95 модульных плазмид, которые можно приобрести комплектом в 96-луночном планшете, а также по отдельности. Набор содержит несколько вариантов нуклеаз из различных видов бактерий (Cas9, оптимизированные для однодольных и двудольных, и Cas12a, оптимизированные только для риса и человека) и редакторы оснований. Любопытно отметить, что плазмиды с нуклеазой Cms1 (pFH18–21), хотя и представлены в статье как часть системы, отсутствуют в репозитории и могут быть получены только по запросу. Для выбора доступны промоторные модули – Pol III (TaU3, OsU3, OsU6 и AtU6) и убиквитиновые и актиновые промоторы Pol II, а также вирусный промотор CmYLCV, изолированный из плазмид Segмак с соавт. [46]. Доступны модули с остовами для спейсеров как индивидуальных, так и полицистронных гидовых РНК (только gRNA-tRNA система). С одной плазмиды можно экспрессировать до 24 гидовых РНК. Хотя данная система содержит наиболее широкий ассортимент нуклеаз, она не позволяет сделать нокин и не содержит dCas с регуляторами экспрессии. Также система еще не успела получить признания – авторами она была протестирована только на протопластах пшеницы, и имеет всего пять цитирований и менее 50 заказов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномное редактирование – одна из самых стремительно развивающихся технологий нашего времени, которая позволяет достигнуть множества целей прикладной и фундаментальной науки. Однако практически все новые элементы CRISPR-систем тестируются на клетках животных, а их применение на растительных объектах запаздывает на несколько лет. К примеру, новая нуклеаза Cas12b была открыта в 2015 г., в 2018 г. ее форма, наиболее эффективная при температурах ниже 40°C, была обнаружена и применена на клетках млекопитающих [85], и только в 2020 г. – на растениях [20, 22, 28]. Тем не менее, для геномного редактирования растений разработано большое разнообразие кодон-оптимизированных Cas9, модифицированных Cas9, в том числе деактивированных, никаз, а также распознающих различные варианты PAM [21, 33, 41, 42, 81, 82]. Достаточно хорошо отработаны способы доставки множественных гидовых РНК, что особенно актуально именно для растений [23, 46, 56–59].

Если технология нокаута была успешно опробована уже на многих видах растений, в том числе хозяйственно ценных, то нокин остается сложным и малоэффективным. Тем не менее, возможности нокина шире: именно этот метод позволяет получить растения с принципиально новыми свойствами.

При этом, в отличие от традиционной геномной инженерии, появляется возможность интегрировать донорную ДНК именно в то место генома, где она будет наиболее эффективно работать. Поиск таких регионов проводится только у модельного растения *A. thaliana* [18], но не для сельскохозяйственных растений.

Из ценных хозяйственных растений самым распространенным объектом геномного редактирования является рис, поскольку его геном и методы трансформации хорошо изучены [86]. К популярным объектам относятся также *A. thaliana*, томат, кукуруза, картофель [14, 20, 22, 29, 46, 73], но в целом выбор объекта для геномного редактирования ограничен видами и сортами, геном которых полностью секвенирован. Если ранее гены в растения внедряли “вслепую”, получая обычные трансгенные растения, то для успешного геномного редактирования необходимо знать целевой участок с точностью до нуклеотида. Это существенно осложняет внедрение данной технологии в практику, учитывая сложность растительных геномов, в том числе полиплоидию. Тем не менее, имеются успешные примеры геномного редактирования гексаплоидной пшеницы, во всех трех субгеномах которой удалось нокаутировать шесть аллелей гена *MLO*, чтобы растения стали невосприимчивы к мучнистой росе [87], а также добиться снижения содержания глютена [88]. Высокую практическую значимость имеет также геномное редактирование рапса, который является тетраплоидом, и других хозяйственно ценных растений сем. Капустных. Несмотря на то, что полностью секвенирован геном видов *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *Camelina sativa* и других сельскохозяйственных растений этого семейства, они редко становятся объектами геномного редактирования. По рапсу пока имеется только девять примеров успешного нокаута методом CRISPR/Cas, в одном из которых нокаут всех четырех аллелей гена *BnaMAX1* позволил увеличить урожайность культуры [89].

Таким образом, в области геномного редактирования растений есть множество актуальных направлений исследования, связанных как с совершенствованием технологии CRISPR/Cas, так и с поиском новых генов-мишеней у новых видов растений. Наименее исследованы именно физиологические изменения у растений с отредактированным геномом, поскольку в большинстве рассмотренных работ авторами проводилась только оценка уровня экспрессии генов-мишеней и степень выраженности фенотипических признаков. Однако постоянно увеличивающийся доступный арсенал для геномного редактирования растений позволяет подключиться к работе все большому количеству научных групп, исследовать функции и роль множества растительных генов и создать сорта ценных сельскохозяйственных растений с новыми признаками.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-74-10053.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas инструменты открытий // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6. С. 20.
2. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т. 9. С. 245.
3. Gerasimova S.V., Khlestkina E.K., Kochetov A.V., Shumny V.K. Genome editing system CRISPR/Cas9 and peculiarities of its application in monocots // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010071>
4. Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 6. <https://doi.org/10.1038/nbt0118-6b>
5. Jansen R., Van Embden J.D.A., Gastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 43. P. 1565. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
6. Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41:e188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
7. Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kaminoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 691. <https://doi.org/10.1038/nbt.2655>
8. Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 686. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
9. Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
10. Ma X., Zhu Q., Chen Y., Liu Y.G. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications // *Mol. Plant.* 2016. V. 9. P. 961. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009>
11. Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: the CRISPR/Cas9 system for plant genome editing // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 52. P. 676. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070055>
12. Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. Т. 21. С. 104. <https://doi.org/10.18699/VJ17.228>
13. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев А.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // *Биомика*. 2017. Т. 9. С. 155.
14. Cermak T., Baltes N.J., Cegan R., Zhang Y., Voytas D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0796-9>
15. Park J.J., Dempewolf E., Zhang W., Wang Z.Y. RNA-guided transcriptional activation via CRISPR/dCas9 mimics overexpression phenotypes in *Arabidopsis* // *PLoS One*. 2017. V. 12: e0179410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179410>
16. Xu R., Qin R., Li H., Li D., Li L., Wei P., Yang J. Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system // *J. Plant Biotechnol.* 2017. V. 15. P. 713. <https://doi.org/10.1111/pbi.12669>
17. Герасимова С.В., Короткова А.М., Хертиг К., Хикель С., Хоффи Р., Будхагатапалли Н., Хлесткина Е.К. Применение РНК-направленной нуклеазы Cas9 для сайт-специфической модификации генома в протопластах сибирского сорта ячменя с высокой способностью к регенерации // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 22. С. 1033. <https://doi.org/10.18699/VJ18.44>
18. Belavin P.A., Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Marenkova T.V., Sidorchuk Y.V., Uvarova E.A., Rozov S.M., Deineko E.V. Peculiarities in creation of genetic engineering constructions for knock-in variant of genome editing of *Arabidopsis thaliana* cell culture // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 855. <https://doi.org/10.855.1134/S1021443720040032>
19. Lin Q., Zong Y., Xue C., Wang S., Jin S., Zhu Z., Gao C. Prime genome editing in rice and wheat // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. P. 582. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0455-x>
20. Wu F., Qiao X., Zhao Y., Zhang Z., Gao Y., Shi L., Kong D. Targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR-Cas12b/C2c1 // *J. Integr. Plant Biol.* 2020. V. 62. P. 16538. <https://doi.org/10.1111/jipb.12944>
21. Hahn F., Korolev A., Sanjurjo Loures L., Nekrasov V. A modular cloning toolkit for genome editing in plants // *BMC Plant Biol.* 2020. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02388-2>
22. Ming M., Ren Q., Pan C., He Y., Zhang Y., Liu S., Qi Y. CRISPR-Cas12b enables efficient plant genome engineering // *Nat. Plants*. 2020. V. 6. P. 202. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0614-6>
23. Tang X., Lowder L.G., Zhang T., Malzahn A.A., Zheng X., Voytas D.F., Qi Y. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants // *Nat. Plants*. 2017. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.18>
24. Zaidi S.S-E-A., Mahfouz M.M., Mansoor S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing // *Trends Plant Sci.* 2017. V. 22. P. 550.

25. Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Гумерова Г.Р., Вершинина З.Р., Чемерис А.В. Некоторые новшества в CRISPR/Cas геномном редактировании и в смежных областях // Биомика. 2019. Т. 11. С. 315.
https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27
26. Bandyopadhyay A., Kancharla N., Javalkote V.S., Dasgupta S., Brutnell T.P. CRISPR-Cas12a (Cpf1): a versatile tool in the plant genome editing tool box for agricultural advancement // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 584151.
https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584151
27. Vu T.V., Sivankalyani V., Kim E.J., Doan D.T.H., Tran M.T., Kim J., Kim J.Y. Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-geminiviral replicon in tomato // J. Plant Biotechnol. 2020. V. 18. P. 2133.
https://doi.org/10.1111/pbi.13373
28. Wang Q., Alarqi M., Wang F., Li B., Ding X., Rui H., Jin S. The application of a heat-inducible CRISPR/Cas12b (C2c1) genome editing system in tetraploid cotton (*G. hirsutum*) plants // J. Plant Biotechnol. 2020. V. 18. P. 2436.
https://doi.org/10.1111/pbi.13417
29. Begemann M.B., Gray B.N., January E., Singer A., Kessler D.C., He Y., Oufattole M. Characterization and validation of a novel group of type V, class 2 nucleases for in vivo genome editing // bioRxiv. 2017. P. 1.
https://doi.org/10.1101/192799
30. Malzahn A.A., Tang X., Lee K., Ren Q., Sretenovic S., Zhang Y., Qi Y. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis // BMC Biol. 2019. V. 17. P. 1.
https://doi.org/10.1186/s12915-019-0629-5
31. Schindele P., Puchta H. Engineering CRISPR/Lb-Cas12a for highly efficient, temperature-tolerant plant gene editing // J Plant Biotechnol. 2020. V. 18. P. 1118.
32. Gao L., Cox D.B., Yan W.X., Manteiga J.C., Schneider M.W., Yamano T., Zhang F. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. P. 789
https://doi.org/10.1038/nbt.3900
33. Sretenovic S., Yin D., Levav A., Selengut J.D., Mount S.M., Qi Y. Expanding plant genome-editing scope by an engineered iSpyMacCas9 system that targets a-rich PAM sequences // Plant Commun. 2020. V. 2. P. 100101.
https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100101
34. Singh R., Ming R., Yu Q. Comparative analysis of GC content variations in plant genomes // Trop. Plant Biol. 2016. V. 9. P. 136.
https://doi.org/10.1007/s12042-016-9165-4
35. LeBlanc C., Zhang F., Mendez J., Lozano Y., Chatpar K., Irish V.F., Jacob Y. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress // Plant J. 2018. V. 93. P. 377.
https://doi.org/10.1111/tpj.13782
36. Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., Iyer E.P., Church G.M. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 326.
https://doi.org/10.1038/nmeth.3312
37. Tiwari S.B., Belachew A., Ma S.F., Young M., Ade J., Shen Y., Repetti P.P. The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors // Plant J. 2012. V. 70. P. 855.
https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04935
38. Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture // Annu Rev Plant Biol. 2019. V. 70. P. 667.
https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049
39. Pandey P.K., Quilichini T.D., Vaid N., Gao P., Xiang D., Datla R. Versatile and multifaceted CRISPR/Cas gene editing tool for plant research // Semin. Cell Dev. Biol. 2019. V. 96. P. 107.
https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.04.012
40. Shakirova K.M., Ovchinnikova V.Y., Dashinimaev E.B. Cell reprogramming with CRISPR/Cas9 based transcriptional regulation systems // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 882.
https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00882
41. Lowder L.G., Zhang D., Balthes N.J., Paul J.W., Tang X., Zheng X., Qi Y. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation // Plant Physiol. 2015. V. 169. P. 971.
https://doi.org/10.1104/pp.15.00636
42. Vazquez-Vilar M., Bernabé-Orts J.M., Fernandez-Del-Carmen A., Ziarolo P., Blanca J., Granell A., Orzaez D. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard // Plant Methods. 2016. V. 12. P. 10.
https://doi.org/10.1186/s13007-016-0101-2
43. Lowder L.G., Paul J.W., Qi Y. Multiplexed transcriptional activation or repression in plants using CRISPR-dCas9 based systems // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1629. P. 167.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7125-1_12
44. Lowder L.G., Zhou J., Zhang Y., Malzahn A., Zhong Z., Hsieh T.F., Qi Y. Robust transcriptional activation in plants using multiplexed CRISPR-Act2.0 and mTALE-Act systems // Mol. Plant. 2018. V. 11. P. 245.
https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.010
45. Bikar D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L. A. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. P. 7429.
https://doi.org/10.1093/nar/gkt520
46. Cermak T., Curtin S.J., Gil-Humanes J., Čegan R., Kono T.J., Konecna E., Voytas D.F. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants // Plant Cell. 2017. V. 29. P. 196.
https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922
47. Schiml S., Fauser F., Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny // Plant J. 2014. V. 80. P. 1039.
https://doi.org/10.1111/tpj.12704
48. Mishra R., Joshi R.K., Zhao K. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications // Plant Biotechnol. J. 2020. V. 18. P. 20.
https://doi.org/10.1111/pbi.13225
49. Chen Y., Wang Z., Ni H., Xu Y., Chen Q., Jiang L. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system effi-

- ciently generates gain-of-function mutations in Arabidopsis // *Sci China Life Sci.* 2017. V. 60. P. 520. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9021-5>
50. Halperin S.O., Tou C.J., Wong E.B., Modavi C., Schaffer D.V., Dueber J.E. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window // *Nature.* 2018. V. 560. P. 248. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0384-8>
 51. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Liu D.R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA // *Nature.* 2019. V. 576. P. 149. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
 52. Hua K., Jiang Y., Tao X., Zhu J.K. Precision genome engineering in rice using prime editing system // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2167. <https://doi.org/10.1111/pbi.13395>
 53. Xu R., Li J., Liu X., Shan T., Qin R., Wei P. Development of a plant prime editing system for precise editing in the rice genome // *Plant Commun.* 2020. V. 1. P. 100043. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100043>
 54. Lu Y., Tian Y., Shen R., Yao Q., Zhong D., Zhang X., Zhu J.K. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 19. P. 415. <https://doi.org/10.1111/pbi.13497>
 55. Tang X., Sretenovic S., Ren Q., Jia X., Li M., Fan T., Yin D., Xiang S., Guo Y., Liu L., Zheng X., Qi Y., Zhang Y. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 667. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.03.010>
 56. Gao Y., Zhao Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing // *J. Integr. Plant Biol.* 2014. V. 56. P. 343. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
 57. He Y., Wang R., Dai X., Zhao Y. On improving CRISPR for editing plant genes: ribozyme-mediated guide RNA production and fluorescence-based technology for isolating transgene-free mutants generated by CRISPR // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 149. P. 151. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.012>
 58. Xie K., Minkenberg B., Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. V. 112. P. 3570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
 59. Hui L., Zhao M., He J., Hu Y., Huo Y., Hao H., Fu A. A simple and reliable method for creating PCR-detectable mutants in Arabidopsis with the polycistronic tRNA-gRNA CRISPR/Cas9 system // *Acta Physiol. Plant.* 2019. V. 41. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2961-3>
 60. Selma S., Bernabe-Orts J.M., Vazquez-Vilar M., Diego-Martin B., Ajenjo M., Garcia-Carpintero V., Orzaez D. Strong gene activation in plants with genome-wide specificity using a new orthogonal CRISPR/Cas9-based programmable transcriptional activator // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 1703. <https://doi.org/10.1111/pbi.13138>
 61. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Промоторы пшеницы для экспрессии трансгенов // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014. V. 16. С. 224.
 62. Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Zhu J.K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 797. <https://doi.org/10.1111/pbi.12200>
 63. Wang Z.P., Xing H.L., Dong L., Zhang H.Y., Han C.Y., Wang X.C., Chen Q.J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>
 64. Zheng N., Li T., Dittman J.D., Su J., Li R., Gassmann W., Yang B. CRISPR/Cas9-based gene editing using egg cell-specific promoters in Arabidopsis and soybean // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00800>
 65. Mao Y., Zhang Z., Feng Z., Wei P., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.K. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in Arabidopsis // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 519. <https://doi.org/10.1111/pbi.12468>
 66. Tsutsui H., Higashiyama T. pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2017. V. 58. P. 46. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw191>
 67. Yan L., Wei S., Wu Y., Hu R., Li H., Yang W., Xie Q. High-efficiency genome editing in Arabidopsis using YAO promoter-driven CRISPR. Cas9 system // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1820. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.10.004>
 68. Wolter F., Klemm J., Puchta H. Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus* // *Plant J.* 2018. V. 94. P. 735. <https://doi.org/10.1111/tpj.13893>
 69. Miki D., Zhang W., Zeng W., Feng Z., Zhu J.K. CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation // *Nature Commun.* 2018. V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04416-0>
 70. Rozov S.M., Permyakova N.V., Deineko E.V. The problem of the low rates of CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in plants: approaches and solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms20133371>
 71. Fauser F., Roth N., Pacher M., Ilg G., Sánchez-Fernández R., Biesgen C., Puchta H. In planta gene targeting // *PNAS.* 2012. V. 109. P. 7535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202191109>
 72. Butt H., Rao G.S., Sedeek K., Aman R., Kamel R., Mahfouz M. Engineering herbicide resistance via prime editing in rice // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2370. <https://doi.org/10.1111/pbi.13399>
 73. Butler N.M., Baltus N.J., Voytas D.F., Douches D.S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases //

- Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1045.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01045>
74. Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H.R., Archibald R.L., Yang M., Habben J.E. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 207.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
75. Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sánchez-León S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9 // *Plant J.* 2017. V. 89. P. 1251.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13446>
76. Li S., Zhang Y., Xia L., Qi Y. CRISPR-Cas12a enables efficient biallelic gene targeting in rice // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1351.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13295>
77. Weiss T., Wang C., Kang X., Zhao H., Elena Gamo M., Starker C.G., Zhang F. Optimization of multiplexed CRISPR/Cas9 system for highly efficient genome editing in *Setaria viridis* // *Plant J.* 2020. V. 104. P. 828.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14949>
78. Butler N.M., Jansky S.H., Jiang J. First generation genome editing in potato using hairy root transformation // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2201.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13376>
79. Zhang Q., Yin K., Liu G., Li S., Li M., Qiu J.L. Fusing T5 exonuclease with Cas9 and Cas12a increases the frequency and size of deletion at target sites // *Sci. China Life Sci.* 2020. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11427-020-1671-6>
80. Piatek A., Ali Z., Baazim H., Li L., Abulfaraj A., Al-Shareef S., Mahfouz M.M. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 578.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12284>
81. Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B., Wang X.C., Chen Q.J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants // *BMC Plant Biol.* 2014. V. 14. P. 327.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
82. 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. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1274.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
83. Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R., Khyazev A.V., Matniyazov R.T., Baymiev A.K., Chemeris A.V. Delivery of crispr/cas components into higher plant cells for genome editing // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 694.
<https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>
84. Ordon J., Gantner J., Kemna J., Schwalgun L., Reschke M., Streubel J., Stuttmann J. Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit // *Plant J.* 2017. V. 89. P. 155.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13319>
85. Teng F., Cui T., Feng G., Guo L., Xu K., Gao Q., Li W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering // *Cell Discov.* 2018. V. 4. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41421-018-0069-3>
86. Хлесткина Е.К. Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR // *Биотехнология и селекция растений.* 2019. Т. 2. С. 49.
<https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-1-49-54>
87. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. P. 947.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
88. Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. Low gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 902.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
89. Zheng M., Zhang L., Tang M., Liu J., Liu H., Yang H., Hua W. Knockout of two Bna MAX 1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 644.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13228>