

УДК 577.21:631.52

УЛУЧШЕНИЕ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas: НОВЫЕ ГЕНЫ-МИШЕНИ

© 2023 г. Ю. В. Ухатова^а*, М. В. Ерастенкова^а, Е. С. Коршикова^а, Е. А. Крылова^а, А. С. Михайлова^а, Т. В. Семилет^а, Н. Г. Тихонова^а, Н. А. Швачко^а, Е. К. Хлесткина^а

^аФедеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: sci_secretary@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 04.05.2022 г.

После доработки 23.09.2022 г.

Принята к публикации 07.10.2022 г.

Успехи геномного редактирования сельскохозяйственных культур с использованием системы CRISPR/Cas в большой степени зависят от правильного выбора генов-мишеней, направленные изменения в которых позволят повысить урожайность, улучшить качество растительного сырья и устойчивость к биотическим и абиотическим стрессирующим факторам. В настоящей работе систематизированы и каталогизированы сведения о генах-мишенях, использованных для улучшения культурных растений. В последнем систематическом обзоре рассмотрены статьи, индексируемые в базе данных Scopus, опубликованные на 17.08.2019 г. В нашей работе охвачен период с 18.08.2019 по 15.03.2022 гг. Поиск по заданному алгоритму позволил выявить 2090 статей, среди которых только 685 содержат результаты редактирования генов 28 видов культурных растений (поиск проведен по 56 культурам). В значительной части этих публикаций рассмотрено либо редактирование генов-мишеней, проведенное ранее в аналогичных работах, либо исследования относились к сфере обратной генетики, и только 136 статей содержат данные о редактировании новых генов-мишеней, модификация которых направлена на улучшение селекционно значимых признаков растений. Всего за весь период применения системы CRISPR/Cas с целью улучшения селекционно значимых свойств редактированию были подвергнуты 287 генов-мишеней культурных растений. В настоящем обзоре представлен подробный анализ редактирования новых генов-мишеней. Чаще всего целью этих работ было повышение урожайности и устойчивости растений к болезням, а также улучшение свойств растительного сырья. Отмечено, удалось ли на момент публикации получить стабильные трансформанты, применялось ли редактирование к немодельным сортам. Существенно расширен спектр модифицированных сортов ряда культур, в частности, пшеницы, риса, сои, томата, картофеля, рапса, винограда, кукурузы. В подавляющем большинстве случаев редактирующие конструкции доставляли с использованием агробактериальной трансформации, реже – биобаллистики, трансфекции протопластов и гаплоиндукторов. Желаемого изменения признаков чаще всего удавалось достичь при помощи нокаута генов. В отдельных случаях осуществляли нокаун и замены нуклеотидов в гене-мишени. Для получения нуклеотидных замен в генах культурных растений все чаще используют редактирование отдельных оснований (base-editing) и технологию поиска и замены (prime-editing). Появление удобной системы редактирования CRISPR/Cas способствовало развитию молекулярной частной генетики многих культурных видов растений.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, биотехнология, гены-мишени, геномное редактирование, культурные растения, направленный мутагенез

DOI: 10.31857/S0026898423030151, **EDN:** CHWGLZ

ВВЕДЕНИЕ

Развитие методов генетического редактирования культурных растений способствует ускорению селекционного процесса и, как следствие, повышению его экономической эффективности. Однако спектр культур, на которых отработаны методики редактирования, остается достаточно ограниченным. Число генов-мишеней, контролируемых проявление хозяйственно ценных признаков, продолжает расширяться, хотя и не быст-

рыми темпами. Часто практически одновременно публикуются результаты редактирования одних и тех же генов-мишеней в растениях с одним и тем же генотипом, что увеличивает число публикаций, но фактически не приводит к получению новых научных результатов. В 2017 г. [1] была начата аналитическая работа по систематизации и каталогизации сведений о подтвержденных генах-мишенях, используемых для улучшения культурных растений, которая получила развитие в 2019 г. [2].

В настоящем обзоре систематизированы и каталогизированы сведения о подтвержденных генах-мишенях, опубликованные за период с 18.08.2019 по 15.03.2022 гг.

По данным поиска в базе данных Scopus (15 марта 2022 г.) количество статей с ключевыми словами “CRISPR” в сочетании с названиями 56 сельскохозяйственных культур составило 2090 (377 в 2019 и 206 в 2017). Однако большинство публикаций не связано напрямую с применением редактирования новых генотипов и новых генов-мишеней. Чаще всего статьи содержали информацию о новых данных для обратной генетики, а не об улучшении свойств растений. Количество статей, описывающих результаты изменения растений с использованием метода редактирования CRISPR/Cas9, составило 685 (131 в 2019 г. и 88 – в 2017 г.). Суммарно число генов-мишеней, редактирование которых проведено с целью улучшения сельскохозяйственных культур, к настоящему моменту составляет 287 (рис. 1). Анализ, проведенный в настоящей работе, добавил в этот каталог еще 206 генов (табл. 1). Число культур, свойства которых были улучшены при помощи редактирования, составило 28, т.е. за 2.5 года увеличилось на 11.

Новые отредактированные культуры – это земляника [71, 72], актинидия [67], помело [70], банан [65, 66], голубика [69], нут [93], брокколи [129], пекинская капуста [130], перец острый [133], люцерна посевная [72], рыжик [134]. Этот перечень показывает возросший интерес к плодовым и ягодным культурам, к развитию селекции на качество плодов.

Всего в программы по улучшению генотипов культурных растений при помощи геномного редактирования вовлечено 186 генотипов (рис. 2).

Разным видам культурных растений свойственна разная степень генотип-специфической эффективности культивирования *in vitro*, трансформации и регенерации. Именно от этого зависит потенциал вовлечения методов геномного редактирования в исследования, ориентированные на практическое применение. Однако следует отметить, что получить новые линии ячменя с помощью редактирования генов удастся, как и прежде, только с использованием модельного сорта Golden Promise [22–25]. Впервые показана возможность редактирования немодельного сорта этой культуры (отечественный сорт Алей [26]) на уровне клетки, но о получении стабильных трансформантов данного сорта пока не сообщалось. За последние годы, только у 23 культур увеличилось число отредактированных образцов.

Расширилось число отредактированных генотипов пшеницы (в 3.4 раза), томатов (в 2 раза), риса (в 1.4 раза), сои (в 6 раз), рапса (в 3 раза), винограда (в 3 раза), картофеля (в 2 раза).

ГЕНЫ-МИШЕНИ И ОСНОВНЫЕ ПРИЗНАКИ, ПОДВЕРГШИЕСЯ МОДИФИКАЦИИ

Геномное редактирование применимо к моно- и олигогенно контролируемым признакам. Часто в качестве мишеней используют гены, регулирующие переход от вегетативной стадии развития растений к генеративной, что позволяет ускорять сроки цветения/созревания. У риса отредактировано три новых гена-мишени, у кукурузы – два, у сои – пять, у рапса, актинидии, голубики и пекинской капусты – по одному (табл. 1). К признакам с олигогенным контролем относятся признаки устойчивости к болезням. В качестве новых мишеней у томата и винограда отредактировано по 10 таких генов, у риса – шесть, у пшеницы – три, у сои и картофеля – по три, у яблони – два, у ячменя, перца, банана и помело – по одному (табл. 1).

В отличие от факторов биотического стресса, устойчивость к абиотическому стрессу чаще всего имеет полигенный характер, при этом среди новых генов-мишеней встречаются гены, редактирование которых повышает устойчивость растений к засухе, холоду и другим неблагоприятным условиям окружающей среды (у томата – пять, у риса – два, у сои и рапса – по одному; табл. 1).

К признакам с полигенным контролем традиционно относится продуктивность, однако, поиск и нокаут генов негативных регуляторов роста и развития позволяет улучшать продуктивность культур. По восемь таких новых мишеней отредактировано у риса и пшеницы, у кукурузы – пять, у земляники, сои и винограда – по три, у ячменя и рапса – по два, у капусты и банана – по одному (табл. 1). Кроме того, на устойчивость к полеганию, а, следовательно, и на повышение урожайности влияют гены короткостебельности. Так, к укорочению стебля у пшеницы (мягкой и твердой) и у риса привело редактирование двух генов.

Среди новых мишеней часто встречаются гены, редактирование которых позволяет улучшить биохимический состав растительного сырья. В число этих генов входят гены, связанные с улучшением свойств крахмала, изменением состава жирных кислот, снижением аллергенности, улучшением ароматических свойств, увеличением сахаристости или содержания белка (табл. 1). Редактированию подвергнуты 13 новых генов-мишеней сои, восемь генов пшеницы, девять томата, пять картофеля, три гена кукурузы, по два у ячменя и хлопчатника, а у риса, ячменя, капусты, винограда, рыжика и брокколи – по одному.

Появление методов геномного редактирования, особенно системы CRISPR/Cas, способствовало развитию частной молекулярной генетики многих культурных видов растений. В первую

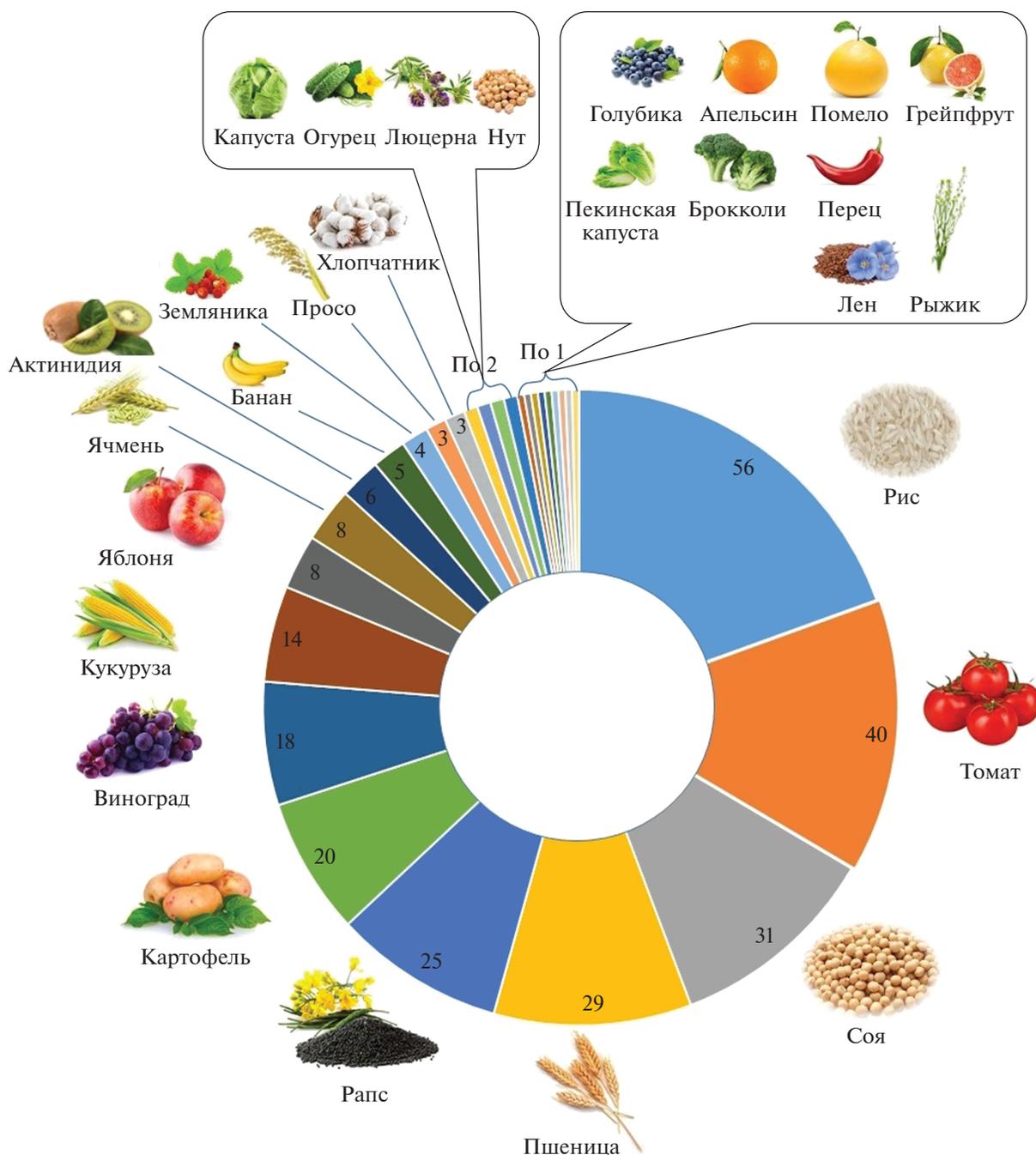


Рис. 1. Число генов-мишеней, модифицированных с использованием системы CRISPR/Cas, с целью изменения хозяйственно ценных признаков (суммарно из обзора [2] и табл. 1 за период с августа 2018 по март 2022 г.).

очередь, это связано с возможностью быстрого внедрения результатов фундаментальных исследований в селекционную практику. А во-вторых, возможности редактирования существенно облегчили проведение исследований в области обратной генетики, проверку генов-кандидатов.

Быстрое расширение списка генов-мишеней, основанное на использовании их ортологов, отражает закономерность, обнаруженную более 100 лет назад Николаем Ивановичем Вавиловым, кото-

рую он назвал Законом гомологических рядов в наследственной изменчивости [137].

Так, сходные нуклеотидные замены в генах *ALS* (кодирующих ацетолактатсинтазу, ключевой фермент биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью – мишеней гербицидов) использовали для повышения гербицидоустойчивости сои [138], риса [139–143], картофеля [144], кукурузы [48, 49], [145] и рапса [146].

Таблица 1. Гены сельскохозяйственных культур, модификация которых с помощью системы CRISPR/Cas привела к улучшению их хозяйственно ценных признаков (по материалам статей в журналах, индексируемых в Scopus, с сентября 2018 по март 2022 г.)

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение негратгенных модифицированных растений	Ссылка
РИС								
<i>OxFBK4</i>	Регулятор роста растений (неучаствительный к гиббереллину)	Нокаут	Укорочение стебля	RE9586 – мутант сорта Zhonghui8015 (ZH8015)	АТ	Не указано	Да	[3]
<i>OxPUB43</i>	Негативный регулятор массы и размера зерна	Нокаут	Увеличение массы и размера зерна	Nipponbare (Nip), Zhonghua 11 (ZH11)	АТ	Не указано	Да	[4]
<i>OxMORE1a*</i>	Негативный регулятор устойчивости к гемиотрофным патогенам	Нокаут	Устойчивость к пирикулярнозу, бактериальному фитотрофу листьев, восприимчивость к коричневой пятнистости риса	Dongjin	АТ	Не указано	Да	[5]
<i>PHUS*</i>	Фитохром С, один из ключевых компонентов геновой сети, обеспечивающей переход растений от вегетативной к генеративной фазе	Нокаут	Ускорение перехода к колошению	Nanjing46	АТ	10%	Да	[6]
<i>OxSPL4</i>	Транскрипционный фактор, один из регуляторов роста и развития растений	Делеция в первом экзоне, не приводящие к сдвигу рамки считывания	Увеличение размера и числа зерен в метелке (повышение продуктивности)	Nipponbare	АТ	Не указано	Да	[7]
<i>OxSWEET14</i>	Негативный регулятор устойчивости к бактериальному увяданию	Нокаун (делеция в промоторе 6 п.н.)	Устойчивость к бактериальному увяданию	TBR225	АТ	19–22%	Да	[8]
<i>OxPDCC5</i>	Один из компонентов регуляторной сети, контролирующей процессы программируемой гибели клеток	Нокаут	Увеличение урожайности за счет плеiotропного эффекта (изменение архитектуры растений, повышение скорости фотосинтеза, увеличение массы и числа зерен в метелке)	Bing1B	АТ	Не указано	Да	[9]
<i>GA20ox-2 (SD1)</i>	20-оксидаза гиббереллина (один из генов “зеленой революции”)	Нокаут	Укорочение стебля, устойчивость к полеганию (как плеiotропный эффект)	IPB3S	АТ	19.3%	Да	[10]
<i>Pt21, Bsr-d1, Xa5</i>	Негативные регуляторы устойчивости к фитопатогенам	Тройной нокаут	Устойчивость к пирикулярнозу и бактериальному увяданию	Nipponbare	Не указано	7.7%	Да	[11]
<i>Pt21</i>	Негативный регулятор устойчивости к пирикулярнозу	Нокаут	Устойчивость к пирикулярнозу	VP 1636	АТ	66%	Да	[12]
<i>OxHXK1</i>	Один из компонентов сигнальной трансдукции и фосфорилирования глюкозы	Нокаут	Повышение урожайности и эффективности фотосинтеза	Huanghuazhan, Meixiangzhan, Wushansimiao	АТ	Не указано	Да	[13]
<i>OxPIN5b, GS3**, OxMYB30</i>	Негативные регуляторы длины метелки (<i>OxPIN5b</i>), размера зерна (<i>GS3</i>) и холодоустойчивости (<i>OxMYB30</i>)	Тройной нокаут	Повышение урожайности и холодоустойчивости	Nipponbare	АТ	21–66%	Да	[14]
<i>Ehd1*</i>	Один из компонентов геновой сети, обеспечивающей переход растений от вегетативной к генеративной фазе	Делеция со сдвигом и без сдвига рамки считывания	Более раннее цветение, увеличение урожайности (как плеiotропный эффект)	Nipponbare, Longdao 16, Longdao24, Xiushui134	АТ	46.6–55%	Да	[15]
<i>GCS1*</i>	Регулятор фертильности	Нокаут	Повышение содержания сахарозы в зерне, отсутствие оплодотворения	Tos17_NC0320, Nipponbare	АТ	Не указано	Да	[16]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>O3g0603100</i> , <i>O3g0568400</i> , <i>GL3.2</i>	Цитохром P-450	Множественный нокаут	Увеличение длины и ширины зерна, массы 1000 зерен (повышение продуктивности)	IR-96	АТ	44.4%	Да	[17]
<i>OxGhd7</i>	Один из компонентов геновой сети, обеспечивающей переход растений от вегетативной к генеративной фазе	Нокаут	Более раннее цветение	Daohuaxiang (DHX), DF24	АТ	Не указано	Да	[18]
<i>OxRR2</i>	Регулятор передачи цитокининового сигнала	Нокаут	Повышение солеустойчивости	WPB106	АТ	15.2%	Да	[19]
<i>Ox8N3</i>	Негативный регулятор устойчивости к бактериальному увяданию	Нокаут	Устойчивость к бактериальному увяданию	Kitaake	АТ	25%	Да	[20]
<i>SD1 (GA20ox2)</i>	20-оксидолаза гиббереллина (один из генов "зеленой революции")	Нокаут	Укорочение стебля, устойчиво к полетанию (как плеiotропный эффект)	Kasalath, TeTePu	АТ	21–68%	Да	[21]
ЯЧМЕНЬ								
<i>SSIa</i>	Крахмалсинтаза	Нокаут	Повышение содержания амилозы	Golden Promise	АТ	18–21%	Да	[22]
<i>MORC1**</i> , <i>MORC6a</i>	Негативные регуляторы устойчивости к патогенам	Нокаут/двойной нокаут	Устойчивость к мучнистой росе и фузариозу	Golden Promise	АТ	58%	Да	[23]
<i>HvCOMT1</i>	Регулятор биосинтеза лигнина	делеция, инсерция	Уменьшение содержания лигнина (повышение эффективности для получения биоэтаноло)	Golden Promise	АТ	42%	Да	[24]
<i>NUD</i>	Фактор транскрипции AP2/ERF, регулирующий биосинтез липидов и образование дополнительного слоя клеток между перикарпом и цветковой чешуей	Нокаут	Полозерность	Golden Promise	Биобаллистика листьев/АТ	57%	Да	[25]
<i>NUD</i>	Фактор транскрипции AP2/ERF, регулирующий биосинтез липидов и образование дополнительного слоя клеток между перикарпом и цветковой чешуей	Нокаут	Полозерность	Алей	Транфекция протопластов	6–20%	Нет	[26]
<i>HvCKX1***</i>	Цитоксинидегидрогеназа	Нокаут	Повышение продуктивности	Golden Promise	АТ	81.8%	Да	[27]
<i>HvCKX1</i> , <i>HvCKX3***</i>	Цитоксинидегидрогеназа	Нокаут	Повышение продуктивности	Golden Promise	АТ	до 70%	Да	[28]
ПШЕНИЦА								
<i>TaIPK1</i>	Инозитол-пентакисфосфат 2-киназа	Нокаут	Улучшение накопления железа и цинка	Borlaug-2016	АТ	12.7 и 10.8%	Да	[29]
<i>TaARE1</i>	Негативный регулятор усвоения азота	Нокаут	Повышение эффективности усвоения азота, замедление старения, повышение урожайности	Kepong199 (KN199)	Биобаллистика эмбриоидов	Не указано	Да	[30]
<i>TaPinb</i> , <i>TaWaxy (GBSS)</i> , <i>TaDA1</i>	Регуляция размера частиц муки (<i>Pinb</i>), гранул-связанная крахмалсинтаза (<i>GBSS</i>), Негативный регулятор массы зерна	Множественный нокаут	Мутации, которые могут способствовать повышению твердозерности, увеличению содержания амлопектина в зерне и увеличению показателя "масса тысячи зерен"	Fielder	АТ	54.2%	Да	[31]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>TaASN2</i>	Аспарагинсинтаза	Нокаут	Уменьшение содержания свободного аспарагина в зерне и уменьшение содержания акриламида в выечке	Sadenza	Биобаллистика эмбриоидов	84%	Да	[32]
<i>Ta-eIF4E</i> , <i>Ta-eIF(iso)4E</i>	Негативный регулятор вирусостойчивости	Нокаут	Устойчивость к вирусу желтой мозаики и к вирусу полосатой мозаики	Cezanne, Gonsoout, Prevent	Биобаллистика эмбриоидов	3–20%	Да	[33]
<i>TaSBE1a</i>	Фермент, разветвляющий крахмальные цепи	Нокаут	Повышение содержания амилозы	Zhengmai 7698 (ZM), Bobwhite	Биобаллистика эмбриоидов	38,4%	Да	[34]
<i>TaMs2</i>	Мужская стерильность	Нокаут	Восстановление фертильности	DMSW	АТ	9%	Да	[35]
<i>TaSD1</i> (<i>GA20ox2</i>), <i>TaSD1</i> (<i>GA20ox2</i>), <i>TaBRI1</i> , <i>TaBRI1</i>	20-оксидла гиббереллина (фермент биосинтеза гиббереллинов) и регулятор биосинтеза брассиностероидов	Нокаут всех гомеологичных вариантов	Ускорение стебля, устойчиво к полеганию (как плейотропный эффект)	Пшеница мягкая яровая BW, W5 и K15, озимая S96 и пшеница твердая D6 и D7	Гаплоиндукция cas9/guide RNA (gRNA)-транскрипционной кукурузой	3,6–50%	Да	[36]
<i>TaGW7</i>	Регулятор клеточного деления	Нокаут гомеологичных копий	Увеличение ширины и массы зерна с одновременным укорачиванием его длины	Bobwhite Chinese Spring	Биобаллистика эмбриоидов	1,1–8,3%	Да	[37]
<i>TaOsd2</i>	Аланинаминотрансфераза	Нокаут	Уменьшение рисков прорастания на корню	Fielder	АТ	2,3%	Да	[38]
<i>TaCKX2-1</i> , <i>TaGLW7</i> , <i>TaGW2**</i> , <i>TaGW8</i>	Негативные регуляторы массы зерна и озерненности колоса	Нокауты	Увеличение массы зерна и озерненности колоса (повышение продуктивности)	Fielder	АТ	10%	Да	[39]
<i>TaNFL1</i>	Негативный регулятор устойчивости к фузариозу	Нокаут	Устойчивость к фузариозу	Roblin	Биобаллистика эмбриоидов	Не указано	Да	[40]
<i>TaWTA1-CM3</i> , <i>TaWTA1-CM16</i>	Ингибиторы альфа-амилазы и трипсина	Множественный нокаут	Снижение содержания аллергенных белков	Svevo	Биобаллистика эмбриоидов	14,4%	Да	[41]
КУКУРУЗА								
<i>ZmPAT7</i>	Негативный регулятор ветвистости метелки	Нокаут	Повышение ветвистости метелки	B73 × CML247	АТ	1%	Да	[42]
<i>ZmPLD3</i>	Фосфолипаза	Нокаут	Повышение эффективности гаплоиндукции	LN244	АТ	до 5%	Да	[43]
<i>BADH2a</i> <i>BADH2b</i>	Бетаинаальдегиддегидрогеназа	Двойной нокаут	Улучшение ароматических качеств	N355, LN005M, XCW175	АТ	Не указано	Да	[44]
<i>ZmNL4</i>	Регулятор клеточного деления	Нокаут	Более узкие листовые пластинки (оптимизация архитектоники растений для более плотных посевов и повышения урожайности с единицы площади)	B73-329	АТ	Не указано	Нет	[45]
<i>ZmCLE1E5</i> , <i>ZmCLE7</i> , <i>ZmFCP1</i>	Регуляторы развития соцветия	Нокауты, множественные нокауты	Повышение озерненности початка (повышение продуктивности)	A188 × B73	АТ	Не указано	Да	[46]
<i>ZmPHYC1</i> , <i>ZmPHYC2</i>	Фитохром С, один из ключевых компонентов генной сети, обеспечивающей переход растений от вегетативной к генеративной фазе	Двойной нокаут	Более раннее цветение	ZC01	АТ	Не указано	Да	[47]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>ZmALS1</i> , <i>ZmALS2</i> **	Ключевой фермент биосинтеза ветвящихся аминокислот – мишеней гербицидов	Нуклеотидные замены (методом prime-editing)	Устойчивость к гербициду хлорсульфурону	W542L, S621I	AT	до 53.2%	Да	[48]
<i>ZmALS1</i> , <i>ZmALS2</i> **	Ключевой фермент биосинтеза ветвящихся аминокислот – мишеней гербицидов	Нуклеотидные замены (методом base-editing), двойные мутанты	Устойчивость к гербициду хлорсульфурону	ZC01	AT	13.8%	Да	[49]
<i>Их (GBSS)</i>	Грануле связанная крахмалсинтаза	Нокаут	Увеличение содержания амилопектина в зрелые	ZC01-DTMwx × 35Fu, 35M	Не указан	более 20%	Да	[50]
КАРТОФЕЛЬ								
<i>SBE1</i> , <i>SBE2</i>	Ферменты, разветвляющие крахмальные цепи	Нокауты, множественные нокауты	Повышение содержания амилозы	Desiree	AT/ Трансфекция протопластов	52–72%	Да	[51]
<i>SBE1</i> , <i>SBE2</i>	Ферменты, разветвляющие крахмальные цепи	Нокауты, множественные нокауты	Повышение содержания амилозы	<i>S. phureja</i> , Desiree	AT Трансфекция протопластов	1.5%	Да	[52]
<i>SBE3</i>	Фермент, разветвляющий крахмальные цепи	Нокаут четырех аллелей	Снижение содержания амилозы	Sayaka	AT	8%	Да	[53]
<i>SISSR2</i>	Биосинтез стероидных гликокалоидов	Нокаут	Снижение концентрации стероидных гликокалоидов	Atlantic	AT	46%	Да	[54]
<i>SIPPO2</i>	Полифенолоксидаза	Нокаут	Снижение степени потемнения мякоти клубня	Desiree	Трансфекция протопластов	24–68%	Да	[55]
<i>SDND1*</i> , <i>SICHL1</i> , <i>SIDMRG-1</i>	Негативные регуляторы устойчивости к фитофторозу	Нокауты, множественные нокауты	Устойчивость к фитофторозу	Desiree, King Edward	AT	0–18%	Да	[56]
ВИНОГРАД								
<i>IdmDH</i>	L-цлонатлетгидрогеназа	Вставка	Изменение вкусовых характеристик, подавление биосинтеза винной кислоты	Chardonnay	AT	Не указано	Нет, получены трансгенные растения	[57]
<i>VvDMR6-2</i>	Негативный регулятор устойчивости к мучнистой росе	Гомозиготная делеция 1 или 2 п.н. и гомозиготная вставку 1 п.н.	Повышение устойчивости к мучнистой росе	Crimson seedless	Трансфекция протопластов с последующей ретенацией растений	87.5%	Да	[58]
<i>VvAIR12</i> <i>VvSWEE4</i> <i>VvILIN2</i> <i>VvIDEL1</i>	Негативные регуляторы устойчивости к грибным болезням	Делеция генов-мишеней	Повышение устойчивости к патогенам	Thompson Seedless	AT	0–31.6%	Да	[59]
<i>VvMLO3</i> <i>VvMLO4</i> **	Негативный регулятор устойчивости к мучнистой росе	Одно-нуклеотидные вставки и делеции различной длины	Повышение устойчивости к мучнистой росе	Thompson Seedless	AT	0–38.5%	Нет, получены трансгенные растения	[60]
<i>VvEDR2</i>	Негативный регулятор устойчивости к мучнистой росе	Биаллельные мутации	Повышение устойчивости к мучнистой росе	Thompson Seedless	AT	до 32%	Нет, получены трансгенные растения	[61]
<i>VvPR4b</i>	Негативный регулятор устойчивости к мучнистой росе	Бинуклеотидная делеция (CGCSA>CSA), приводящая к сдвигу рамки считывания	Снижение устойчивости к мучнистой росе	Thompson Seedless	AT	20.2%	Нет, получены трансгенные растения	[62]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>TAS4 MYB47</i>	Регулятор устойчивости к болезни Парса (Parsa disease), к вирусу красной пятнистости виноградной лозы (GRBV)	Вставка 1–2 п.н., делеция 5–6 п.н.	Повышение устойчивости к патогенам	Полвой 101–14	АТ	до 80%	Нет, получены трансгенные растения	[63]
<i>YsCCD8</i> <i>YsCCD7</i>	Регулятор ветвления побегов	Нокаут	Увеличение степени ветвления побегов, ведущее к повышению продуктивности	Полвой 41В	АТ	8.2%	Нет, получены трансгенные растения	[64]
БАНАН								
<i>MusaDMR6</i>	Регулятор устойчивости к бактериальному увяданию	Делеции, вставки, замены или делеции, сопровождающиеся вставками	Повышение устойчивости к патогенам	<i>Musa bahisiana</i> Сорт Sukai Ndizi	АТ	100%	Да	[65]
<i>MaACO1</i>	Путь синтеза этилена, контроль созревания	Вставки	Повышение продуктивности	<i>Musa acuminata</i> сорт Brazilian	АТ	98,4–98,6%	Да	[66]
АКТИВИДИЯ								
<i>CEN</i> <i>CEN4</i> <i>SyG1</i>	Синтез цитокининов	Нокаут	Повышение продуктивности, получение более компактных растений, более раннее цветение	<i>Actinidia chinensis</i> Ranch. var. <i>chinensis</i> сорт Bruce	АТ	40.7%	Да	[67]
ЯБЛОНЯ								
<i>MaDPRM4**</i>	Устойчивость к бактериальному ожогу	Несколько типов мутаций: небольшая вставка (+1 н.), небольшая замена (R1 н.), маленькие и большие делеции	Повышение устойчивости к бактериальному ожогу	Gala, Golden Delicious	АТ	75%	Да	[68]
ГОЛУБИКА								
<i>CEN</i>	Регулятор роста и развития растения	Вставка/делеция длиной от 1 до 2 п.н.	Повышение продуктивности, получение более компактных растений, более раннее цветение	Blue Muffin, O'Neal.	АТ	17–37.5%	Да	[69]
ПОМЕЛО								
<i>LOB1</i>	Устойчивость к раку цитрусовых, вызванному <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Делеции и вставки	Повышение устойчивости к раку цитрусовых	<i>Citrus maxima</i>	АТ****	87.5%	Да	[70]
ЗЕМЛЯНИКА								
<i>TAA1</i> <i>ARF8</i>	Биосинтез ауксинов TAA1 и фактора ответа на ауксин 8 (ARF8)	Делеции и замены	Повышение продуктивности	<i>Fragaria vesca</i>	АТ	49–75%	Да	[71]
<i>FveYUC10</i>	Регулятор развития листьев, корней, цветов и плодов	Нокаут	Повышение продуктивности	Хавай 4	АТ	Около 5%	Да	[72]
ЛЮЦЕРНА ПОСЕВНАЯ								
<i>ALS1</i> и <i>ALS2</i>	Ацетолактатсинтаза	Замена одного нуклеотида (С на Т) для изменения одной аминокислоты (Pro → Leu)	Устойчивость к гербицидам сульфонилмочевинного и имидазопиридина ряда	Клон C23	АТ	6–11%	Да	[73]
СОЯ								
<i>Pod dehiscence 1</i> (<i>PDH1</i>) gene	Контроль раскрываемости бобов	Нокаут	Уменьшение раскрываемости бобов	Huachun6 (НС6)	АТ	48%		[74]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>GmAMS1</i> , <i>GmAMS2</i>	Развитие микроспор и клеток тапетума	Нокаут одного или двух генов	Получение стерильных линий на разнообразной генетической основе (контроль опыления в гибридной селекции)	Williams 82	АТ	14–25%	Да	[75]
<i>GmAITrks</i>	Транскрипционный фактор, принимающий участие в регуляции сигнала абсцизовой кислоты	Нокаут шести копий гена	Повышение засухо- и солеустойчивости	Williams 82	АТ	Не указано	Нет	[76]
<i>GmAGGE1</i> (<i>GmIAG</i>)	Регулятор числа семян на боб, а также формы листьев	Замена нуклеотида С на G приводит к замене аминокислоты в консервативном домене EAR GmIAG1, что ведет к потере функции гена (две копии гена)	Увеличение числа семян на боб, повышение урожайности	Huachun 6	АТ	Не указано	Да	[77]
<i>Night light-inducible and clock-regulate D 2 (LNK2)</i> , 4 гена	Контроль циркадного ритма растения	Нокаут четырех копий гена	Ранний переход к цветению в условиях длинного дня	Williams 82	АТ	92.3%	Да	[78]
<i>GmFATB1a</i> , <i>GmFATB1b</i>	Ферменты, участвующие в биосинтезе жирных кислот (тиоэстеразы)	Нокаут	Снижение содержания насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой) в соевом масле при стабильном уровне ненасыщенных кислот	Williams 82	АТ	Не указано	Нет	[79]
<i>GmKIX-1</i>	Регулятор размера органов растения, негативный регулятор пролиферации клеток	Нокаут	Увеличение размера листьев и веса семян (повышение продуктивности)	Maverick	АТ	Не указано	Да	[80]
<i>Gly m Bd 30 K</i>	Транспортер жиров	Нокаут	Снижение вероятности возникновения аллергии	Jack	Биобаллистика эмбрионов	Не указано	Да	[81]
<i>GmGOLS1A</i> , <i>GmGOLS1B</i>	Ферменты биосинтеза олигосахаридов семейства рафинозы	Нокаут	Уменьшение содержания олигосахаридов семейства рафинозы (рафинозы, стахиозы, вербаскозы) (RFO) для улучшения питательных качеств	Maverick, DT26	АТ	До 100%	Нет	[82]
<i>Gly m Bd 28K</i> и <i>Gly m Bd 30K</i>	Основные аллергены сои – вицилин-подобный гликопротеин Gly m Bd 28 K и белок, переносящий жиры Gly m Bd 30 K	Нокаут	Снижение вероятности возникновения аллергии на сою, получение гипоаллергенных сортов	Enrei, Kariyutaka	АТ	До 100%	Да	[83]
<i>GmAPI</i>	Транскрипционный фактор семейства MADS-box, определяющий специфичность меристемы цветка	Нокаут четырех копий гена	В условиях короткого дня поздний переход к цветению, большее число узлов и междоузлий, что непосредственно связывают с числом бобов на растении и урожайностью	Williams 82	АТ	20%	Да	[84]
<i>GmPRR37</i>	Супрессор перехода к цветению в условиях длинного дня	Нокаут	Переход к раннему цветению у мутантов очень поздноцветущего сорта в условиях длинного дня	Zigongdongdou (ZGDD), Jack	АТ	Не указано	Нет	[85]
<i>GmLox</i> genes (<i>GmLox1</i> , <i>GmLox2</i> , <i>GmLox3</i>)	Липооксигеназы	Нокаут трех генов	Улучшение вкусовых качеств	Huachun 6	АТ	78.9%	Да	[85]
<i>GmF3H</i> , <i>GmF3H2</i> <i>GmFNSII-1</i>	Ферменты биосинтеза изофлавоноидов	Нокаут трех генов	Увеличение содержания изофлавоноидов в листьях и увеличение устойчивости к вирусу мозаики	Jack	АТ	44.4%	Да	[86]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>FAD2-1A</i>	Десатураза	Нокаут	Увеличение содержания олеиновой кислоты	Huaxia 3	АТ	Не указано	Нет	[87]
<i>GmFAD2-1B</i>	Десатураза жирных кислот	Нокаут	Уменьшение содержания линолевой и линоленовой кислот	Maverick	АТ	12%	Да	[88]
<i>GmFAD2-2A</i>	Десатураза жирных кислот	Нокаут	Увеличение содержания белка и снижение содержания линолевой кислоты (в зависимости от длины дня)	Jinong 38	АТ	55.5–95%	Да	[89]
<i>GmFT2a</i> и <i>GmFT3a</i>	Активаторы перехода к цветению	Нокаут одного или двух генов	Увеличение адаптационного потенциала	Jack	АТ	Не указано	Нет	[90]
<i>E1</i>	Регулятор перехода к цветению	Нокаут	Переход к раннему цветению в условиях длинного дня	Jack	АТ	75%	Да	[91]
<i>GmSPL9</i>	Транскрипционный фактор, регулятор перехода с ювенильной стадии	Нокаут	Изменение архитектуры растения, увеличение числа узлов главного стебля, ветвей	Williams 82	АТ	Не указано	Нет, получены трансгенные растения	[92]
НУТ								
<i>4CL</i> , <i>RVE7</i>	Регуляция накопления лигнина в условиях стресса; регуляция циркадных ритмов	Нокаут	Устойчивость к засухе	Kabuli	Трансфекция протопластов	Не указано	Нет	[93]
ТОМАТ								
<i>LeRBOH</i> <i>LeRBOHE</i>	Регуляторы накопления АФК в пыльниках	Нокаут	Создание форм с мужской стерильной зародышевой плазмой для использования в гибридной селекции	Ailsa Craig	АТ	Не указано	Да	[94]
<i>SINVINH1</i>	Ингибитор инвертазы	Нокаут	Повышение содержания сахарозы и глюкозы в плодах	Suzukoma	АТ	Не указано	Да	[95]
<i>SINVINH1</i> , <i>SIVPE5</i>	Ингибитор накопления растворимых сахаров	Нокаут <i>SINVINH1</i> и <i>SIVPE5</i>	Повышение содержания растворимых сахаров в плодах	M82	АТ	42.9–61.5%	Да	[96]
<i>More Axillary Growth 1 (MAX1)</i>	Ингибитор урвания оранбохола	Нокаут	Устойчивость к корневому паразитическому сорняку египетской заразихе (<i>Phelipanche aegyptiaca</i>)	МП-1	АТ	20%	Да	[97]
<i>SIVAT1</i>	Регуляция содержания ауксина	Нокаут	Повышение устойчивости к вертициллезу (<i>Verticillium dahliae</i> , <i>V. albo-atrum</i>) и фузариозу (<i>Fusarium oxysporum</i>)	Moneymaker	АТ	Не указано	Да	[98]
<i>SIBES1</i>	Участвие в сигнальном брассиностероидов	Нокаут	Получение более плотных плодов и увеличение сроков хранения	Ailsa Craig	АТ	Не указано	Да	[99]
<i>DMR6</i>	Восприимчивость к бактериальным грибным заболеваниям	Нокаут	Устойчивость к широкому спектру болезней	Fia. 8000	АТ	Не указано	Нет	[100]
<i>SINPRP1 domain(s)</i>	Синтез гликопротеинов клеточной стенки	Нокаут делеция	Устойчивость к солевому стрессу	Hongkwang I5T01	АТ	не указано	Да	[101]
<i>Ms I0³⁵</i> , <i>GST4A</i>	Мужская стерильность, кодирование глутатион S-трансферазы	Двойной нокаут <i>Ms I0³⁵</i> и <i>GST4A</i>	Создание линий томатов с мужской стерильностью	Линия 6Q71и 5N21	АТ	46.7 и 47.4% для <i>Ms I0³⁵</i> ; 28 и 26.3% для гена <i>GST4A</i>	Да	[102]
<i>eIF4E1</i>	Негативный регулятор устойчивости к вирусным патогенам	Нокаут	Повышение устойчивости к Y-вирусу картофеля и к вирусу мозаики огурца	Линия S8	АТ	15%	Да	[103]
<i>eIF4E1</i>	Негативный регулятор устойчивости к вирусным патогенам	Нокаут	Устойчивость томата к вирусу крапчатости перца	Micro-Tom	АТ	72%	Да	[104]

Таблица 1. Продолжение

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>eIF4E2</i>	Негативный регулятор устойчивости к вирусным патогенам	Нокаут	Устойчивость томата к вирусу крапчатости перца	West Virginia 106 (WVa106)	АТ	Не указано	Да	[105]
<i>STMS10</i>	Транскрипционный фактор bHLH, регулирующий продолжительность жизни клеток	Нокаут	Получение форм с мужской стерильностью	KS-13	АТ	46.6%	да	[106]
<i>GID1a</i>	Рецептор гиббереллина	Нокаут	Повышение устойчивости к засухе	M82	АТ	Не указано	Да	[107]
<i>PMR4</i>	Кодирование каллозасинтазы	Нокаут	Повышение устойчивости к мучнистой росе	Mooneymaker	АТ	Не указано	Нет	[108]
<i>rgsCaM</i>	Кальмодулин-подобный белок	Нокаут	Повышение устойчивости к вирусу желтой курчавости листьев	Mooneymaker	АТ	Не указано	Да	[109]
<i>CCD8</i>	Каротиндиоксигеназа 8	Нокаут	Повышение устойчивости к паразитическому сорняку египетской заразице	Линия T5	АТ	71.4%	Да	[110]
<i>SLAZ2</i>	Негативный регулятор биосинтеза жасмоната	Нокаут	Устойчивость к бактериальной пятнистости	Mooneymaker	АТ	Не указано	Да	[111]
<i>SGR1, LCY-E, BC, LCY-B1, LCY-B2</i>	Биосинтез ликопина (<i>SGR1</i> -encoding A STAY-GREEN protein, lycorane ϵ -cyclase, beta-lycorane cyclase, lycorane β -cyclase 1/2)	Нокаут	Повышение содержания ликопина	Ailsa Craig	АТ	0–95.8%	Да	[112]
РАПС								
<i>VnaSVp</i>	Регулятор продолжительности вегетативной стадии	Нокаут	Переход к раннему цветению	Линия J9707	АТ	45%	Да	[113]
<i>VnF5H</i>	Ферулят-5-гидроксилаза	Нокаут	Снижение содержания лигнина S/G и повышение устойчивости к белой плесени	Westar	АТ	Не указано	Да	[114]
<i>VnaA03.BP</i>	Регулятор морфогенеза листьев и изгиба цветоножки	Нокаут	Получение компактной формы куста	Zhong shuang11	АТ	79%	Да	[115]
<i>VnQCR8</i>	Консервативная субъединица комплекса цитохрома b-c1	Снижение числа копий <i>VnQCR8</i>	Повышение устойчивости к белой плесени и серой гнили	Westar	АТ	60.9%	Да	[116]
<i>VnaC04EFP5S</i>	Енолпирувилликимат-3-фосфатагидрогеназа	Нокаут	Устойчивость к глифосату	627R	АТ	20%	Да	[117]
<i>VnSHPIA09, VnSHPIA04, VnSHPIA04-A, VnSHP2C04-B, VnSHP2A05</i>	Контроль раскрываемости стручков	Нокаут	Предотвращение растрескивания стручков	Zhongshuang 6 (ZS6)	АТ	27.5–35%	Да	[118]
<i>CRT1a</i>	Кальретикулин	Нокаут	Устойчивость к вертициллезу (возб. <i>Verticillium longisporum</i>)	Express 617	АТ	20%	Да	[119]
<i>VnITPK</i>	Инозитол-тетрафосфатакиназа	Нокаут трех паралогов <i>VnITPK</i>	Уменьшение содержания фитиновой кислоты в семенах – улучшение качества для корма	Наудп	АТ	не указано	Да	[120]
<i>VnSFAR1, VnSFAR4, VnSFAR5</i>	Эстеразы	Нокаут	Повышение содержания масел в семенах	Линия RS306	АТ	0.2–1.1%	Да	[121]
<i>VnALSI</i>	Ацетолактатсинтаза	Замена P197S	Повышение устойчивости к гербицидам	Линия J9712	АТ	3.2%	Да	[122]
<i>VnIT2</i>	Биосинтез проантоцианидинов	Нокаут	Увеличение содержания линолевой и линоленовой кислот	Линия J9712	АТ	4.9%	Да	[123]

Таблица 1. Окончание

Ген	Функция продукта гена	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/Линия	Способ доставки	Частота мутантных линий	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Ссылка
<i>bnaab-rga-D</i>	DELLA белок	Нокаут	Засухоустойчивость, желтые семена	Westar	АТ	Не указано	Да	[124]
<i>BnPT8</i>	Биосинтез проантоцианидинов	Двойной нокаут	Повышение содержания масел и белков в семенах	Линия J9707	АТ	10,4%	Да	[125]
<i>BnaMAH1</i>	Моноксигеназа цитохрома P450	Нокаут двух гомологов <i>BnaMAH1</i>	Улучшение архитектоники, повышение продуктивности	862	АТ	56,3–67,4%	Да	[126]
<i>BnaEOD3</i>	Цитохром P450/CYP78A6	Нокаут четырех гомологичных локусов <i>BnaEOD3</i>	Увеличение числа и массы семян (повышение продуктивности)	Линия J9707	АТ	45,6%	Да	[127]
<i>BnWRKY70</i>	Устойчивость к патогенам	Инсерция, делеция	Повышение устойчивости к белой гнили	Линия J9712	АТ	50%	Да	[128]
БРОККОЛИ								
<i>BnMYB28</i>	Регулятор транскрипции глюкозинолатного пути	Делеция 9 п.н. в 3 экзоне	Повышенное содержание глюкораффина	Vepeforté, Kingdomes (KD)	Трансфекция протопластов	До 100%	Да	[129]
ПЕКИНСКАЯ КАПУСТА								
<i>BnaFLC2, BnaFLC3</i>	Регуляция биосинтеза глюкозинолата (A-GSL)	Двойной нокаут <i>BnaFLC2</i> и <i>BnaFLC3</i>	Переход к раннему цветению	Линия Kenshin (<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>)	АТ	97,7–100%	Да	[130]
КАПУСТА								
<i>MYB28</i>	Регулятор транскрипции глюкозинолатного пути	Нокаут	Улучшение продуктивности	Диплоид AG DH1012 (<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>alboglabra</i> (A12DHd) и <i>B. oleracea</i> ssp. <i>italica</i> (Green Duke GDDH33))	АТ	12%	Да	[131]
<i>BoCER1</i>	Биосинтез кутикулярного воска	Нокаут	Развитие бриллиантовой зеленой капусты (безвосковой)	Линия 'CW1'	АТ	3,4%	Да	[132]
ПЕРЕЦ								
<i>SaERT28</i>	Первичный негативный регулятор устойчивости к антракнозу	Делеция, инсерция	Повышение устойчивости к антракнозу	Arka Lohit (AL) (<i>Capsicum annuum</i>)	АТ	72,5–85,7%	Да	[133]
РЫЖИК								
<i>SsFAD2</i>	Десатуразы жирных кислот	Нокаут	Увеличение содержания мононенасыщенных жирных кислот	Same, Suneson	АТ	0,4–84,1%	Да	[134]
ХЛОПЧАТНИК								
<i>GoPGF</i>	Регулятор образования госсиполов	Нокаут	Удаление госсипола из семян хлопчатника	Stoneville 7A	АТ	Не указано	Да	[135]
<i>GnFAD2</i>	Десатураза жирных кислот	Нокаут	Увеличение содержания олеиновых кислот	Jm668	АТ	71,5%	Да	[136]

* Гены с неоднозначным эффектом, нокаут которых приводит к улучшению одних признаков, но ухудшает показатели по другим.

** Гены, которые и ранее использовали в качестве мишеней, но в новых работах они включены вместе с новыми генами для мультиплексного нокаута.

*** Ожидаемое целевое свойство не достигнуто, так как не нокаутированные гомологи компенсируют отсутствие продукта нокаутированного гена; сделано заключение о необходимости нокаута большего числа гомологов.

**** Применен другой белок (не Cas9, АТ – агробактериальная трансформация штаммами *A. tumefaciens* (если не указано иное)).

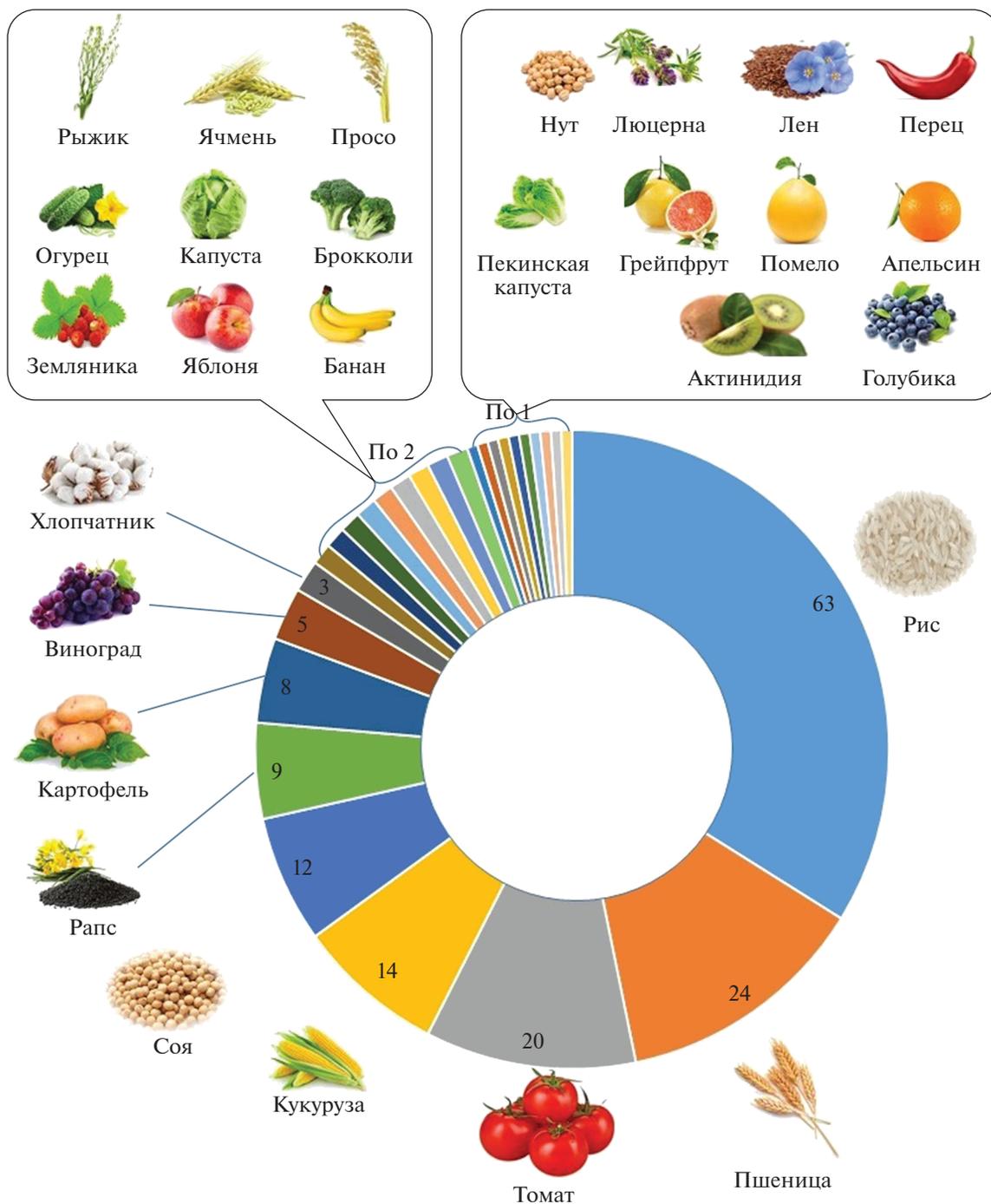


Рис. 2. Число генотипов, модифицированных с использованием системы CRISPR/Cas с целью изменения хозяйственно ценных признаков (суммарно из обзора [2] и табл. 1 за период с августа 2018 по март 2022 г.).

С целью повышения содержания амилопектина осуществлен нокаут генов крахмалсинтазы, связанной с крахмальными гранулами (*GBSS/Waxy/Wx*), у риса [147–149], картофеля [150–152], кукурузы [153] и пшеницы [39]. Проведен нокаут генов десатуразы жирных кислот *FAD2* (для улучшения состава жирных кислот) у риса [154], рапса [155], хлопчатника [136], сои [87–89] и рыжика [134].

Нокаут генов бетаинальдегид-дегидрогеназы позволил улучшить ароматические свойства зерна кукурузы [45].

В растениях огурца [156], пшеницы [33] и томата [103–105] осуществлен нокаут гена *eIF* (негативного регулятора вирусоустойчивости); генов *LOB1* (негативный регулятор устойчивости к раку

цитрусовых) в растениях грейпфрута [157], апельсина [159] и помело [70], а также двух генов негативных регуляторов устойчивости к мучнистой росе: *MLO* – у винограда [60, 159], томата [160,], пшеницы [161]; *EDR* – у пшеницы [162] и винограда [61].

При помощи нокаута генов *CEN* изменена архитектура растений киви и голубики [67, 69].

Гены “зеленой революции” *SD1*, нокаут которых приводит к короткостебельности и устойчивости к полеганию, описаны в работах по редактированию риса [163] и пшеницы [36]. Сорты риса с рецессивным аллелем гена *SD1* (которые участвовали в зеленой революции) были известны и ранее, тогда как у пшеницы в зеленой революции в свое время участвовал совсем другой ген, несущий мутацию приобретения функции вместо мутации потери функции [164]. У гексаплоидной пшеницы три копии гена *SD1*, поэтому вероятность потери функции всеми тремя копиями ничтожно мала. Такая возможность появилась при разработке методов геномного редактирования.

При проведении нокаута у полиплоидных видов растений (пшеница, картофель) редактирующую конструкцию часто приходится направлять сразу на несколько аллельных/гомеоаллельных генов (см. табл. 1). Еще и поэтому система CRISPR/Cas с ее возможностью мультиплексного редактирования стала настоящей находкой для растений, у которых часто встречается полиплоидия. Мультиплексное редактирование разных генов все активнее применяется и для улучшения сортов культурных растений как по одному [36], так и по разным [14, 165] признакам.

НОКДАУН vs НОКАУТА И ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ

Важное значение имеет комплексная оценка мутантов и изучение возможного плеiotропного действия генов-мишеней. Тщательное изучение отредактированных растений показывает, что далеко не всегда внесенные модификации вызывают однозначный эффект – улучшая одни признаки, они могут негативно влиять на другие. Так, в работе Li и соавт. [6] подчеркнуто, что при использовании мутантов риса по гену *PHYC*, отличающихся более ранним переходом к колошению, следует учитывать условия окружающей среды и стараться подбирать микроклиматические условия с умеренными температурами во время налива зерна во избежание ухудшения его качества. Сообщается также, что нокаут гена *OsMORE1a* (устойчивость к поражению гемибактериальными фитопатогенами), несмотря на его положительный эффект, не лишен таких побочных эффектов, как повышенная восприимчивость к некротрофному патогену [166].

При выборе в качестве мишеней генов, являющихся негативными регуляторами, важное значение может иметь более тонкое изменение настройки генов экспрессии, чем просто нокаут. Так, делеции в первом экзоне, не приводящие к сдвигу рамки считывания, позволили модифицировать функцию гена *SP4* таким образом, что увеличился размер и число зерен в метелке, а следовательно, повысилась продуктивность растений риса [7]. При этом были изучены эффекты делеций разной длины и показан больший эффект делеции 3 п.н., чем 15 п.н. Нокаут гена негативного регулятора *OsIRO3* [167] не привел к желаемому эффекту, зато нокаут этого гена, выявленный среди сортов, полученных методами традиционной селекции), способствовал повышению толерантности к защелачиванию почв. Следовательно, в дальнейшем редактирование можно использовать для внесения необходимых изменений в промотор гена *OsIRO3*. Так, делеция 6 п.н. в промоторе *OsSWEET14* риса, полученная с использованием системы CRISPR/Cas, привела к нокауту этого гена, что способствовало снижению восприимчивости к возбудителю бактериального увядания. Проведенная при этом комплексная проверка мутантных растений не выявила какого-либо побочного негативного воздействия на основные хозяйственно ценные признаки [8]. Нокаут одного из структурных генов фенилпропаноидного пути (*C3H*) приводил к получению стерильных карликовых растений риса, тогда как нокаут этого гена при помощи РНК-интерференции имел положительные эффекты. Потенциально редактирование можно использовать для того, чтобы подобрать необходимые модификации в промоторе *C3H* для достижения эффекта, аналогичного полученному при помощи РНК-интерференции [168].

Есть, однако, и примеры, когда преiotропное действие нокаута оказывает положительный кумулятивный эффект. Так, изучение генетической системы, регулирующей процессы программируемой гибели клеток, позволило выбрать удачную мишень – ген *OsPDCD5* риса, нокаут которого привел к повышению урожайности риса за счет плеiotропного действия (изменения архитектуры растений, повышения скорости фотосинтеза, увеличения массы и числа зерен в метелке). Аналогичным образом нокаут гена гексокиназы (*OsHKK1*), одного из компонентов сигнальной трансдукции и фосфорилирования глюкозы, позволил повысить урожайность за счет одновременного увеличения озерненности метелки, удлинения эффективных побегов метелки, повышения эффективности фотосинтеза; при этом качество зерна у мутантных линий не уступало качеству исходных линий.

МЕТОДЫ ДОСТАВКИ И СПОСОБЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ

В подавляющем большинстве случаев редактирующую конструкцию доставляют в растения с помощью агробактериальной трансформации (87.6% работ; табл. 1), реже – биобаллистики (6.6%), трансфекции протопластов (5.1%) и с использованием гаплоиндукторов (0.7%).

Агробактериальную трансформацию проводят как на зародышах [45, 47, 117], так и на каллусах [168, 169]. Наиболее часто применяют штаммы *Agrobacterium tumefaciens* [18, 54, 127, 132], реже – *A. rhizogenes* [82, 88].

Метод биобаллистики чаще всего используют для доставки редактирующей конструкции в клетки пшеницы [32–34], сои [81], брокколи [129]. Проводят также трансфекцию протопластов ячменя [26], пшеницы [37], картофеля [51, 52, 55] и нута [93], при помощи гаплоиндукции доставляют редактирующие конструкции в растения пшеницы [36].

Не во всех работах представлены данные о растениях-регенерантах и стабильных трансформантах (табл. 1). Вероятно, это связано с желанием зафиксировать приоритетность выбора нового гена-мишени. Это несколько снижает общий уровень опубликованных исследований.

Частота получения мутантных линий сильно зависит от генотипа. Так, например, частота мутаций среди семи трансгенных растений помело составила 100% (#Pum_т 1–6 и 8), в то время как у одного растения мутации не были обнаружены [72].

На эффективность трансформации может влиять и сама редактирующая конструкция. У растений T0 люцерны посевной частота мутаций редактируемых генов-мишеней (*Gmams1*, *Gmams2* или *Gmams1,2*) в зависимости от выбранной конструкции составила 52% (32 из 61), 40% (21 из 52) и 45% (30 из 66) соответственно [75]. Эффективность редактирования одного из целевых генов – *GmFAD2-1A* или *GmFAD2-2A* – в растениях сои составила 95 и 55.56% соответственно, при этом в 66.67% случаев отмечено появление двойных мутантов [89].

Желаемого изменения признаков чаще всего удавалось достичь при помощи нокаута генов (табл. 1). В отдельных случаях свойство белкового продукта изменяли путем небольших делеций в кодирующих последовательностях, не влияющих на сдвиг рамки считывания [7], или изменяли экспрессию генов путем внесения делеций в промоторы [8]. В единичных случаях осуществляли нуклеотидные замены. Причем в сравнении с работами, опубликованными до 2019 года, когда одонуклеотидные замены вносили при помощи гомологической рекомбинации с использованием донорного фрагмента, в более свежих работах

наблюдается технологический прорыв, связанный с применением редактирования отдельных оснований (base-editing) и редактирования с помощью поиска и замены (prime-editing) [48, 49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему моменту достигнуты существенные успехи в улучшении сортов почти 30 сельскохозяйственных культур при помощи редактирования генов. Чаще всего эти работы направлены на повышение урожайности и устойчивости к болезням, а также на улучшение свойств растительного сырья. Появление удобной системы редактирования CRISPR/Cas способствовало активному развитию частной молекулярной генетики многих культурных видов растений. Перспектива дальнейшего развития практико-ориентированных работ по редактированию генов связана с расширением применения таких способов модификации, как base-editing и prime-editing, позволяющих вносить нуклеотидные замены. Следует ожидать расширения спектра редактируемых мишеней за счет новых генов, связанных с улучшением признаков, путем замены в них нуклеотидов, а не нокаута. Возможности широкого практического применения будут зависеть от степени преодоления генотипзависимой эффективности трансформации и регенерации конкретной культуры. Определенные перспективы связаны также с диверсификацией способов доставки редактирующих конструкций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 21-66-00012).

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. (2017) Crop genes modified using the CRISPR/Cas system. *Russ. J. Genet.* 7(8), 822–832. <https://doi.org/10.1134/S2079059717050124>
2. Короткова А.М., Герасимова С.В., Хлесткина Е.К. (2019) Текущие достижения в области модификации генов культурных растений с использованием системы CRISPR/Cas. *Вавил. журн. генет. селекции.* 23(1), 29–37.
3. Zegeye W.A., Chen D., Islam M., Wang H., Riaz A., Rani M.H., Hussain K., Liu Q., Zhan X., Cheng S., Cao L., Zhang Y. (2022) *OsFBK4*, a novel GA insensitive gene positively regulates plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecol. Genet. Genom.* 23. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2022.100115>

4. Wu Q., Liu Y., Huang J. (2022) CRISPR-Cas9 mediated mutation in *OsPUB43* improves grain length and weight in rice by promoting cell proliferation in spikelet hull. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(4), 2347. <https://doi.org/10.3390/ijms23042347>
5. Kim C.Y., Park J.Y., Choi G., Kim S., Vo K.T.X., Jeon J.S., Kang S., Lee Y.H. (2022) A rice gene encoding glycosyl hydrolase plays contrasting roles in immunity depending on the type of pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **23**(3), 400–416. <https://doi.org/10.1111/mpp.13167>
6. Li B., Du X., Fei Y., Wang F., Xu Y., Li X., Li W., Chen Z., Fan F., Wang J., Tao Y., Jiang Y., Zhu Q.-H., Yang J. (2021) Efficient breeding of early-maturing rice cultivar by editing *PHYC* via CRISPR/Cas9. *Rice.* **14**, 86. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00527-3>
7. Hu J., Huang L., Chen G., Liu H., Zhang Y., Zhang R., Zhang S., Liu J., Hu Q., Hu F., Wang W., Ding Y. (2021) The elite alleles of *OsSPL4* regulate grain size and increase grain yield in rice. *Rice.* **14**, 90. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00531-7>
8. Duy P.N., Lan D.T., Thu H.P., Thanh H.N., Pham N.P., Auguy F., Thi B.T.H., Manh T.B., Cunnac S., Pham X.H. (2021) Improved bacterial leaf blight disease resistance in the major elite Vietnamese rice cultivar TBR225 via editing of the *OsSWEET14* promoter. *PLoS One.* **16**(9), e0255470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255470>
9. Dong S., Dong X., Han X., Zhang F., Zhu Y., Xin X., Wang Y., Hu Y., Yuan D., Wang J., Huang Z., Niu F., Hu Z., Yan P., Cao L., He H., Fu J., Xin Y., Tan Y., Mao B., Zhao B., Yang J., Yuan L., Luo X. (2021) *OsPDCD5* negatively regulates plant architecture and grain yield in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**(29), e2018799118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018799118>
10. Nurhayati, Ardie S.W., Santoso T.J., Sudarsono. (2021) CRISPR/Cas9-mediated genome editing in rice cv. IPB3S results in a semi-dwarf phenotypic mutant. *Biodiversitas J. Biol. Diversity.* **22**(9), 3792–3800. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220924>
11. Tao H., Shi X., He F., Wang D., Xiao N., Fang H., Wang R., Zhang F., Wang M., Li A., Liu X., Wang G.L., Ning Y. (2021) Engineering broad-spectrum disease-resistant rice by editing multiple susceptibility genes. *J. Integr. Plant Biol.* **63**(9), 1639–1648. <https://doi.org/10.1111/jipb.13145>
12. Nawaz G., Usman B., Peng H., Zhao N., Yuan R., Liu Y., Li R. (2020) Knockout of *Pi21* by CRISPR/Cas9 and iTRAQ-based proteomic analysis of mutants revealed new insights into *M. oryzae* resistance in elite rice line. *Genes.* **11**, 735. <https://doi.org/10.3390/genes11070735>
13. Zheng S., Ye C., Lu J., Liufu J., Lin L., Dong Z., Li J., Zhuang C. (2021) Improving the rice photosynthetic efficiency and yield by editing *OsHXK1* via CRISPR/Cas9 system. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9554. <https://doi.org/10.3390/ijms22179554>
14. Zeng Y., Wen J., Zhao W., Wang Q., Huang W. (2020) Rational improvement of rice yield and cold tolerance by editing the three genes *OsPIN5b*, *GS3*, and *OsMYB30* with the CRISPR-Cas9 system. *Front. Plant Sci.* **10**, 1663. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01663>
15. Wu M., Liu H., Lin Y., Chen J., Fu Y., Luo J., Zhang Z., Liang K., Chen S., Wang F. (2020) In-frame and frame-shift editing of the *Ehd1* gene to develop japonica rice with prolonged basic vegetative growth periods. *Front. Plant Sci.* **11**, 307. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00307>
16. Honma Y., Adhikari P.B., Kuwata K., Kagenishi T., Yokawa K., Notaguchi M., Kurotani K., Toda E., Bessho-Uehara K., Liu X., Zhu S., Wu X., Kasahara R.D. (2020) High-quality sugar production by osgcs1 rice. *Commun. Biol.* **3**, 617. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01329-x>
17. Usman B., Nawaz G., Zhao N., Liu Y., Li R. (2020) Generation of high yielding and fragrant rice (*Oryza sativa* L.) lines by CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of three homoeologs of cytochrome P450 gene family and *OsBADH2* and transcriptome and proteome profiling of revealed changes triggered by mutations. *Plants.* **9**, 788. <https://doi.org/10.3390/plants9060788>
18. Wang G., Wang C., Lu G., Wang W., Mao G., Habben J.E., Song C., Wang J., Chen J., Gao Y., Liu J., Greene T.W. (2020) Knockouts of a late flowering gene via CRISPR-Cas9 confer early maturity in rice at multiple field locations. *Plant. Mol. Biol.* **104**, 137–150. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01031-w>
19. Zhang A., Liu Y., Wang F., Li T., Chen Z., Kong D., Bi J., Zhang F., Luo X., Wang J., Tang J., Yu X., Liu G., Luo L. (2019) Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene. *Mol. Breeding.* **39**(3), 47. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0954-y>
20. Kim Y.A., Moon H., Park C.J. (2019) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *Os8N3* in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Rice.* **12**, 67. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0325-7>
21. Hu X., Cui Y., Dong G., Feng A., Wang D., Zhao C., Zhang Y., Hu J., Zeng D., Guo L., Qian Q. (2019) Using CRISPR-Cas9 to generate semi-dwarf rice lines in elite landraces. *Sci. Rep.* **9**, 19096. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55757-9>
22. Yang Q., Ding J., Feng X., Zhong X., Lan J., Tang H., Harwood W., Li Z., Guzmán C., Xu Q., Zhang Y., Jiang Y., Qi P., Deng M., Ma J., Wang J., Chen G., Lan X., Wei Y., Zheng Y., Jiang Q. (2022). Editing of the starch synthase IIa gene led to transcriptomic and metabolomic changes and high amylose starch in barley. *Carbohydrate Polymers.* **285**, 119238. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119238>
23. Galli M., Martiny E., Imani J., Kumar N., Koch A., Steinbrenner J., Kogel K.H. (2022) CRISPR/Sp-Cas9-mediated double knockout of barley microRNA *MORC1* and *MORC6a* reveals their strong involvement in plant immunity, transcriptional gene silencing and plant growth. *Plant Biotechnol. J.* **20**(1), 89–102. <https://doi.org/10.1111/pbi.13697>
24. Lee J.H., Won H.J., Tran P.H.N., Lee S.-Mi, Je H.-Y.K., Jung H. (2021) Improving lignocellulosic biofuel production by CRISPR/Cas9-mediated lignin modifica-

- tion in barley. *GCB Bioenergy*. **13**, 742–752. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12808>
25. 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>
 26. Герасимова С.В., Короткова А.М., Хертинг К., Хикель С., Хоффи Р., Будхагатапалли Н., Отто И., Хензель Г., Шумный В.К., Кочетов А.В., Кумлен Й., Хлесткина Е.К. (2018) Применение РНК-направленной нуклеазы Cas9 для сайт-специфической модификации генома в протопластах сибирского сорта ячменя с высокой способностью к регенерации. *Вавил. журн. генет. селекции*. **22**(8), 1033–1039. <https://doi.org/10.18699/VJ18.447>
 27. Holubova K., Hensel G., Vojta P., Tarkowski P., Bergougnoux V., Galuszka P. (2018) Modification of barley plant productivity through regulation of cytokinin content by reverse-genetics approaches. *Front. Plant. Sci.* **9**, 1676. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01676>
 28. 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**(8), 782. <https://doi.org/10.3390/cells8080782>
 29. Ibrahim S., Saleem B., Rehman N., Zafar A.S., Naem M.K., Khan M.R. (2021) CRISPR/Cas9 mediated disruption of inositol pentakisphosphate 2-kinase 1 (TaIPK1) reduces phytic acid and improves iron and zinc accumulation in wheat grains. *J. Adv. Res.* 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.07.006>
 30. Guo M., Wang Q., Zong Y., Nian J., Li H., Li J., Wang T., Gao C., Zuo J. (2021) Genetic manipulations of *TaARE1* boost nitrogen utilization and grain yield in wheat. *J. Genet. Genomics*. **48**(10), 950–953. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.07.003>
 31. Zhang S., Zhang R., Gao J., Gu T., Song G., Li W., Li D., Li Y., Li G. (2019) Highly efficient and heritable targeted mutagenesis in wheat via the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR/Cas9 system. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(17), 4257. <https://doi.org/10.3390/ijms20174257>
 32. Raffan S., Sparks C., Huttly A., Hyde L., Martignago D., Mead A., Hanley S.J., Wilkinson P.A., Barker G., Edwards 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**(8), 1602–1613. <https://doi.org/10.1111/pbi.13573>
 33. Hahn F., Loures S.L., Sparks C.A., Kanyuka K., Nekrasov V. (2021) Efficient CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in spring and winter wheat varieties. *Plants*. **10**, 1481. <https://doi.org/10.3390/plants10071481>
 34. Li J., Jiao G., Sun Y., Chen J., Zhong Y., Yan L., Jiang D., Ma., 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>
 35. Tang H., Liu H., Zhou Y., Liu H., Du L., Wang K., Ye X. (2020) Fertility recovery of wheat male sterility controlled by Ms2 using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **19**(2), 224–226. <https://doi.org/10.1111/pbi.13482>
 36. 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**(12), 2376–2378.
 37. Wang W., Pan Q., Tian B., He F., Chen Y., Bai G., 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>
 38. Abe F., Haque E., Hisano H., Tanaka T., Kamiya Y., Mikami M., Sato K. (2019) Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. *Cell Rep.* **28**(5), 1362–1369.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.090>
 39. 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>
 40. 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**(3), 553–560. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0332-R>
 41. 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>
 42. Guan H., Chen X., Wang K., Liu X., Zhang D., Li Y., Song Y., Shi Y., Wang T., Li C., Li Y. (2022) Genetic variation in *ZmPAT7* contributes to tassel branch number in maize. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(5), 2586. <https://doi.org/10.3390/ijms23052586>
 43. Li Y., Lin Z., Yue Y., Zhao H., Fei X., Lizhu E., Liu C., Chen S., Lai J., Song W. (2021) Loss-of-function alleles of *ZmPLD3* cause haploid induction in maize. *Nat. Plants*. **7**, 1579–1588. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01037-2>
 44. Wang Y., Liu X., Zheng X., Wang W., Yin X., Liu H., Ma C., Niu X., Zhu J.K., Wang F. (2021) Creation of aromatic maize by CRISPR/Cas. *J. Integr. Plant. Biol.* **63**(9), 1664–1670. <https://doi.org/10.1111/jipb.13105>
 45. Gao L., Yang G., Li Y., Sun Y., Xu R., Chen Y., Wang Z., Xing J., Zhang Y. (2021) A Kelch-repeat superfamily

- gene, *ZmNL4*, controls leaf width in maize (*Zea mays* L.). *Plant J.* **107**(3), 817–830.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15348>
46. Liu L., Gallagher J., Arevalo E.D., Chen R., Skopelitis T., Wu Q., Bartlett M., Jackson D. (2021) Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize *CLE* genes. *Nat. Plants.* **7**(3), 287–294.
<https://doi.org/10.1038/s41477-021-00858-5>
 47. Li Q., Wu G., Zhao Y., Wang B., Zhao B., Kong D., Wei H., Chen C., Wang H. (2020) CRISPR/Cas9-mediated knockout and overexpression studies reveal a role of maize phytochrome C in regulating flowering time and plant height. *Plant Biotechnol. J.* **18**(12), 2520–2532.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13429>
 48. Jiang Y.Y., Chai Y.P., Lu M.H., Han X.L., Lin Q., Zhang Y., Zhang Q., Zhou Y., Wang X.C., Gao C., Chen Q.J. (2020) Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two *ALS* genes in maize. *Genome Biol.* **21**(1), 257.
<https://doi.org/10.1186/s13059-020-02170-5>
 49. Li Y., Zhu J., Wu H., Liu C., Huang C., Lan J., Zhao Y., Xie C. (2020) Precise base editing of non-allelic acetolactate synthase genes confers sulfonylurea herbicide resistance in maize. *Crop J.* **8**, 449–456.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.10.001>
 50. Qi X., Wu H., Jiang H., Zhu J., Huang C., Zhang X., Liu C., Cheng B. (2020) Conversion of a normal maize hybrid into a *waxy* version using *in vivo* CRISPR/Cas9 targeted mutation activity. *Crop J.* **8**, 440–448.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.01.006>
 51. Zhao X., Jayarathna S., Turesson H., Fält A., Nestor G., González M.N., Olsson N., Beganovic M., Hofvander P., Andersson R., Andersson M. (2021) Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato. *Sci. Rep.* **11**, 4311.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83462-z>
 52. Tuncel A., Corbin K.R., Ahn-Jarvis J., Harris S., Hawkins E., Smedley M.A., Harwood W., Warren F.J., Patron N.J., Smith A.M. (2019) Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 2259–2271.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13137>
 53. Takeuchi A., Ohnuma M., Teramura H., Asano K., Noda T., Kusano H., Tamura K., Shimada H. (2021) Creation of a potato mutant lacking the starch branching enzyme gene *StSBE3* that was generated by genome editing using the CRISPR/dMac3-Cas9 system. *Plant Biotechnol.* (Tokyo). **38**(3), 345–353.
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.0727a>
 54. Zheng Z., Ye G., Zhou Y., Pu X., Su W., Wang J. (2021) Editing sterol side chain reductase 2 gene (*StSSR2*) via CRISPR/Cas9 reduces the total steroidal glycoalkaloids in potato. *All Life.* **14**(1), 401–413.
<https://doi.org/10.1080/26895293.2021.1925358>
 55. Gonzalez M.N., Massa G.A., Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.-S., Storani L., Oneto D.C.A., Hofvander P., Feingold S.E. (2020) Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene *via* ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.* **10**, 1649.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01649>
 56. Kieu N.P., Lenman M., Wang E.S., Petersen B.L., Andreasson E. (2021) Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Sci. Rep.* **11**(1), 4487.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
 57. Osakabe Y., Liang Z., Ren C., Nishitani C., Osakabe K., Wada M., Komori S., Malnoy M., Velasco R., Poli M., Jung M.-H., Koo O.-J., Viola R., Kanchiswamy C.N. (2018) CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nat. Protoc.* **13**(12), 2844–2863.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0067-9>
 58. Scintilla S., Salvagnin U., Giacomelli L., Zeilmaker T., Malnoy M.A., van der Voort J.R., Moser C. (2021) Regeneration of plants from DNA-free edited grapevine protoplasts.
<https://doi.org/10.1101/2021.07.16.452503>
 59. Olivares F., Loyola R., Olmedo B., Miccono M.D.L.Á., Aguirre C., Vergara R., Riquelme D., Madrid G., Plantat P., Mora R., Espinoza D., Prieto H. (2021) CRISPR/Cas9 targeted editing of genes associated with fungal susceptibility in *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless using geminivirus-derived replicons. *Front. Plant Sci.* **12**, 791030.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.791030>
 60. Wan D.Y., Guo Y., Cheng Y., Hu Y., Xiao S., Wang Y., Wen Y.Q. (2020) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvMLO3* results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Res.* **7**, 116.
<https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8>
 61. Yang L., Guo Y., Hu Y., Wen Y. (2020) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VviEDR2* results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Acta Horticulturae Sinica.* **47**(4), 623–634.
<https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2019-0660>
 62. Li M., Jiao Y., Wang Y., Zhang N., Wang B., Liu R., Yin X., Xu Y., Liu G. (2020) CRISPR/Cas9-mediated *VvPR4b* editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Hortic. Res.* **7**(1), 149.
<https://doi.org/10.1038/s41438-020-00371-4>
 63. Sunitha S., Rock C.D. (2020) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *TAS4* and *MYBA7* loci in grapevine rootstock 101-14. *Transgenic Res.* **29**(3), 355–367.
<https://doi.org/10.1007/s11248-020-00196-w>
 64. Ren C., Guo Y., Kong J., Lecourieux F., Dai Z., Li S., Liang Z. (2020) Knockout of *VvCCD8* gene in grapevine affects shoot branching. *BMC Plant Biol.* **20**(1), 47.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-2263-3>
 65. Tripathi J.N., Ntui, V.O., Shah T., Tripathi L. (2021) CRISPR/Cas9-mediated editing of *DMR6* orthologue in banana (*Musa* spp.) confers enhanced resistance to bacterial disease. *Plant Biotechnol. J.* **1**(7), 1291–1293.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13614>
 66. Hu C., Sheng O., Deng G., He W., Dong T., Yang Q., Dou T., Li C., Gao H., Liu S., Yi G., Bi F. (2021)

- CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *MaACO1* (aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1) promotes the shelf life of banana fruit. *Plant Biotechnol. J.* **19**(4), 654–656.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13534>
67. Varkonyi-Gasic E., Wang T., Cooney J., Jeon S., Voogd C., Douglas M.J., Pilkington S.M., Akagi T., Allan A.C. (2021) *Shy Girl*, a kiwifruit suppressor of feminization, restricts gynoceium development via regulation of cytokinin metabolism and signalling. *New Phytol.* **230**, 1461–1475.
<https://doi.org/10.1111/nph.17234>
68. Pompili V., Costa L. D., Piazza S., Pindo M., Malnoy M. (2019) Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnol. J.* **18**(3), 845–858.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13253>
69. Omori M., Yamane H., Li K., Matsuzaki R., Ebihara S., Li T., Tao R. (2020) Expressional analysis of *FT* and *CEN* genes in a continuously flowering highbush blueberry “*Blue Muffin*”. *Acta Hort.* **1280**, 197–201.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1280.27>
70. Jia H., Wang Y., Su H., Huan X., Wang N. (2022) *LbCas12a-D156R* efficiently edits *LOB1* effector binding elements to generate canker-resistant citrus plants. *Cells.* **11**(3), 315.
<https://doi.org/10.3390/cells11030315>
71. Zhou J., Wang G., Liu Z. (2018) Efficient genome editing of wild strawberry genes, vector development and validation. *Plant Biotechnol. J.* **16**(11), 1868–1877.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12922>
72. Feng J., Dai C., Luo H., Han Y., Liu Z., Kang C. (2019) Reporter gene expression reveals precise auxin synthesis sites during fruit and root development in wild strawberry. *J. Exp. Botany.* **70**(2), 563–574.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery384>
73. Bottero E., Gomez C., Stritzler M., Tajima H., Frare R., Pascuan C., Blumwald E., Ayub N., Soto G. (2022) Generation of a multi-herbicide-tolerant alfalfa by using base editing. *Plant Cell Rep.* **41**, 493–495.
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02827-w>
74. Zhang Z., Wang J., Kuang H., Hou Z., Gong P., Bai M., Zhou S., Yao X., Song S., Yan L., Guan Y. (2022) Elimination of an unfavorable allele conferring pod shattering in an elite soybean cultivar by CRISPR/Cas9. *ABIOTECH.*
<https://doi.org/10.1007/s42994-022-00071-8>
75. Chen X., Yang S., Zhang Y., Zhu X., Yang X., Zhang C., Li H., Feng X. (2021) Generation of male-sterile soybean lines with the CRISPR/Cas9 system. *Crop J.* **9**(6), 1270–1277.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.05.003>
76. Wang T., Xun H., Wang W., Ding X., Tian H., Hussain S., Dong Q., Li Y., Cheng Y., Wang C., Lin R., Li G., Qian X., Pang J., Feng X., Dong Y., Liu B., Wang S. (2021) Mutation of *GmA1TR* genes by CRISPR/Cas9 genome editing results in enhanced salinity stress tolerance in soybean. *Front. Plant Sci.* **12**, 779598.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.779598>
77. Cai Z., Xian P., Cheng Y., Ma Q., Lian T., Nian H., Ge L. (2021) CRISPR/Cas9-mediated gene editing of *GmJAGGED1* increased yield in the low-latitude soybean variety Huachun 6. *Plant Biotechnol. J.* **19**(10), 1898–1900.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13673>
78. Li Z., Cheng Q., Gan Z., Hou Z., Zhang Y., Li Y., Li H., Nan H., Yang C., Chen L., Lu S., Shi W., Chen L., Wang Y., Fang C., Kong L., Su T., Li S., Kou K., Wang L., Kong F., Liu B., Dong L. (2021) Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of soybean *LNK2* advances flowering time. *Crop J.* **9**(4), 767–776.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.09.005>
79. Ma J., Sun S., Whelan J., Shou H. (2021) CRISPR/Cas9-mediated knockout of *GmFATB1* significantly reduced the amount of saturated fatty acids in soybean seeds. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3877.
<https://doi.org/10.3390/ijms22083877>
80. Nguyen C.X., Paddock K.J., Zhang Z., Stacey M.G. (2021) *GmKIX8-1* regulates organ size in soybean and is the causative gene for the major seed weight QTL qSw17-1. *New Phytol.* **229**, 920–934.
<https://doi.org/10.1111/nph.16928>
81. Adachi K., Hirose A., Kanazashi Y., Hibara M., Hirata T., Mikami M., Endo M., Hirose S., Maruyama N., Ishimoto M., Abe J., Yamada T. (2021) Site-directed mutagenesis by biolistic transformation efficiently generates inheritable mutations in a targeted locus in soybean somatic embryos and transgene-free descendants in the T1 generation. *Transgenic Res.* **30**, 77–89.
<https://doi.org/10.1007/s11248-020-00229-4>
82. Le H., Nguyen N.H., Ta D.T., Le T.N.T., Bui T.P., Le N.T., Nguyen C.X., Rolletschek H., Stacey G., Stacey M.G., Pham N.B., Do P.T., Chu H.H. (2020) CRISPR/Cas9-mediated knockout of galactinol synthase-encoding genes reduces raffinose family oligosaccharide levels in soybean seeds. *Front. Plant Sci.* **11**, 612942.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.612942>
83. Sugano S., Hirose A., Kanazashi Y., Adachi K., Hibara M., Itoh T., Mikami M., Endo M., Hirose S., Maruyama N., Abe J., Yamada T. (2020) Simultaneous induction of mutant alleles of two allergenic genes in soybean by using site-directed mutagenesis. *BMC Plant Biol.* **20**, 513.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02708-6>
84. Chen L., Nan H., Kong L., Yue L., Yang H., Zhao Q., Fang C., Li H., Cheng Q., Lu S., Kong F., Liu B., Dong L. (2020) Soybean AP1 homologs control flowering time and plant height. *J. Integr. Plant Biol.* **62**, 1868–1879.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12988>
85. Wang L., Sun S., Wu T., Liu L., Sun X., Cai Y., Li J., Jia H., Yuan S., Chen L., Jiang B., Wu C., Hou W., Han T. (2020) Natural variation and CRISPR/Cas9-mediated mutation in *GmPRR37* affect photoperiodic flowering and contribute to regional adaptation of soybean. *Plant Biotechnol. J.* **18**, 1869–1881.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13346>
86. Zhang P., Du H., Wang J., Pu Y., Yang C., Yan R., Yang H., Cheng H., Yu D. (2020) Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering in-

- creases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotechnol. J.* **18**(6), 1384–1395.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13302>
87. Hou Z.H., Wu Y., Cheng Q., Gan Z.R., Liu B.H. (2019) Creation of high oleic acid soybean mutation plants by CRISPR/Cas9. *Acta Agronomica Sinica* (China). **45**(6), 839–847.
 88. Do P.T., Nguyen C.X., Bui H.T., Tran L.T.N. Stacey G., Gillman J.D., Zhang Z.J. Stacey M.J. (2019) Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous *GmFAD2-1A* and *GmFAD2-1B* genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biol.* **19**, 311.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1906-8>
 89. Wu N., Lu Q., Wang P., Zhang Q., Zhang J., Qu J., Wang N. (2020) Construction and analysis of *GmFAD2-1A* and *GmFAD2-2A* soybean fatty acid desaturase mutants based on CRISPR/Cas9 technology. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1104.
<https://doi.org/10.3390/ijms21031104>
 90. Cai Y., Wang L., Chen L., WT., Liu L., Sun S., Wu C., Yao W., Jiang B., Yuan S., Han T., Hou W. (2020) Mutagenesis of *GmFT2a* and *GmFT5a* mediated by CRISPR/Cas9 contributes for expanding the regional adaptability of soybean. *Plant Biotechnol. J.* **18**, 298–309.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13199>
 91. Han J., Guo B., Guo Y., Zhang B., Wang X., Qiu L.-J. (2019) Creation of early flowering germplasm of soybean by CRISPR/Cas9 technology. *Front. Plant Sci.* **10**, 1446.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01446>
 92. Bao A., Chen H., Chen L., Chen S., Hao Q., Guo W., Qiu D., Shan Z., Yang Z., Yuan S., Zhang C., Zhang X., Liu B., Kong F., Li X., Zhou X., Trna L.-S.P., Cao D. (2019) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol.* **19**, 131.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1746-6>
 93. Badhan S., Ball A.S., Mantri N. (2021) First report of CRISPR/Cas9 mediated DNA-free editing of *4CL* and *RVE7* genes in chickpea protoplasts. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 396.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010396>
 94. Dai X., Han H., Huang W., Zhao L., Song M., Cao X., Liu C., Niu X., Lang Z., Ma C., Xie H. (2022) Generating novel male sterile tomatoes by editing respiratory burst oxidase homolog genes. *Front. Plant Sci.* **12**, 817101.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.817101>
 95. Kawaguchi K., Takei-Hoshi R., Yoshikawa I., Nishida K., Kobayashi M., Kusano M., Lu Y., Ariizumi T., Ezura H., Otagaki S., Matsumoto S., Shiratake K. (2021) Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Sci. Rep.* **11**(1), 21534.
 96. Wang B., Li N., Huang S., Hu J., Wang Q., Tang Y., Yang T., Asmutola P., Wang J., Yu Q. (2021) Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated *SIINVINH1* and *SIVPE5* gene editing. *Peer. J.* **9**, e12478.
<https://doi.org/10.7717/peerj.12478>
 97. Bari V.K., Nassar J.A., Aly R. (2021) CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of *MORE AXILLARY GROWTH 1* in tomato confers resistance to root parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Sci. Rep.* **11**, 3905.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82897-8>
 98. Hanika K., Schipper D., Chinnappa S., Oortwijn M., Schouten H.J., Thomma B.P.H.J., Bai Y. (2021) Impairment of tomato *WAT1* enhances resistance to vascular wilt fungi despite severe growth defects. *Front. Plant Sci.* **12**, 721674.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721674>
 99. Liu H., Lihong Liu, Liang D., Zhang M., Jia C., Qi M., Liu Y., Shao Z., Meng F., Hu S., Yin Y., Li C., Wang Q. (2021) SIBES1 promotes tomato fruit softening through transcriptional inhibition of *PMEUI*. *Science.* **24**(8), 102926.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102926>
 100. Thomazella D.P.D.T., Seong K., Mackelprang R., Dahlbeck D., Geng Y., Gill U.S., Qi T., Pham J., Giuseppe P., Lee C.Y., Ortega A., Cho M., Hutton S.F., Staskawicz B. (2021) Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **118**(27), e2026152118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2026152118>
 101. Tran M.T., Doan D.T.H., Kim J., Song Y.J., Sung Y.W., Das S., Kim E.J., Son G.H., Kim S.H., Van Vu T., Kim J.Y. (2021) CRISPR/Cas9-based precise excision of SIHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. *Plant Cell Rep.* **40**(6), 999–1011.
<https://doi.org/10.1007/s00299-020-02622-z>
 102. Liu J., Wang S., Wang H., Luo B., Cai Y., Li X., Zhang Y., Wang X. (2021) Rapid generation of tomato male-sterile lines with a marker use for hybrid seed production by CRISPR/Cas9 system. *Mol. Breed.* **41**(3), 25.
<https://doi.org/10.1007/s11032-021-01215-2>
 103. Atarashi H., Jayasinghe W.H., Kwon J., Kim H., Taninaka Y., Igarashi M., Ito K., Yamada T., Masuta C., Nakahara K.S. (2020) Artificially edited alleles of the eukaryotic translation initiation factor *4E1* gene differentially reduce susceptibility to cucumber mosaic virus and potato virus Y in tomato. *Front. Microbiol.* **11**, 564310.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.564310>
 104. Yoon Y.J., Venkatesh J., Lee J.H., Kim J., Lee H.E., Kim D.S., Kang B.C. (2020) Genome editing of *EIF4E1* in tomato confers resistance to pepper mottle virus. *Front. Plant Sci.* **11**, 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01098/full>
 105. Kuroiwa K., Thenault C., Nogue F., Perrot L., Maziera M., Galloisa J.L. (2022) CRISPR-based knockout of *EIF4E2* in a cherry tomato background successfully recapitulates resistance to pepper veinal mottle virus. *Plant Sci.* **316**, 111160.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111160>
 106. Jung Y.J., Kim D.H., Lee H.J., Nam K.H., Bae S., Nou I.S., Cho Y.-G., Kim M.K., Kang K.K. (2020) Knockout of *SIMS10* gene (Solyc02g079810) encoding bHLH transcription factor using CRISPR/Cas9 system confers male sterility phenotype in tomato.

- Plants*. **9**(9), 1189.
<https://doi.org/10.3390/plants9091189>
107. Illouz-Eliaz N., Nissan I., Nir I., Ramon U., Shohat H., Weiss D. (2020) Mutations in the tomato gibberellin receptors suppress xylem proliferation and reduce water loss under water-deficit conditions. *J. Exp. Botany*. **71**(12), 3603–3612.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa137>
 108. Santillán Martínez M.I., Bracuto V., Koseoglou E., Appiano M., Jacobsen E., Visser R.G.F., Wolters A.M.A., Bai Y. (2020) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene *PMR4* for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biol.* **20**, 284.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02497-y>
 109. Faal G.P., Farsi M., Seifi A., Kakhki A.M. (2020) Virus-induced CRISPR–Cas9 system improved resistance against tomato yellow leaf curl virus. *Mol. Biol. Rep.* **47**(5), 3369–3376.
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05409-3>
 110. Bari V.K., Nassar J.A., Kheredin S.M., Gal-On A., Ron M., Britt A., Steele D., Yoder J., Aly R. (2019) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Sci. Rep.* **9**, 11438.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47893-z>
 111. Ortigosa A., Gimenez-Ibanez S., Leonhardt N., Solano R. (2019) Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SIJAZ2*. *Plant Biotechnol. J.* **17**(3), 665–673.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13006>
 112. Li X., Wang Y., Chen S., Tian H., Fu D., Zhu B., Luo Y., Zhu H. (2018) Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front. Plant Sci.* **9**, 559.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00559>
 113. Ahmar S., Zhai Y., Huang H., Yu K., Hafeez M., Khan U., Shahid M., Samad R.A., Khan S.U., Amoo O., Fan C., Zhou Y. (2020) Development of mutants with varying flowering times by targeted editing of multiple *SVP* gene copies in *Brassica napus* L. *Crop J.* **10**(1), 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.03.023>
 114. Cao Y., Yan X., Ran S., Ralph J., Smith R.A., Chen X., Qu C., Li J., Liu L. (2022) Knockout of the lignin pathway gene *BnF5H* decreases the S/G lignin compositional ratio and improves *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus*. *Plant Cell Environ.* **45**(1), 248–261.
<https://doi.org/10.1111/pce.14208>
 115. Fan S., Zhang L., Tang M., Cai Y., Liu J., Liu H., Liu J., Terzaghi W., Wang H., Hua W., Zheng M. (2021) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *BnaA03.BP* gene confers semi-dwarf and compact architecture to rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Biotechnol. J.* **19**(12), 2383–2385.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13703>
 116. Zhang X., Cheng J., Lin Y., Fu Y., Xie J., Li B., Bian X., Feng Y., Liang W., Tang Q., Zhang H., Liu X., Zhang Y., Liu C., Jiang D. (2021) Editing homologous copies of an essential gene affords crop resistance against two cosmopolitan necrotrophic pathogens. *Plant Biotechnol. J.* **19**(11), 2349–2361.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13667>
 117. Wang Z., Wan L., Xin Q., Zhang X., Song Y., Wang P., Hong D., Fan Z., Yang G. (2021) Optimizing glyphosate tolerance in rapeseed by CRISPR/Cas9-based geminiviral donor DNA replicon system with Csy4-based single-guide RNA processing. *J. Exp. Bot.* **72**(13), 4796–4808.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erab167>
 118. Zaman Q.U., Wen C., Yuqin S., Mengyu H., Desheng M., Jacqueline B., Baohong Z., Chao L., Qiong H. (2021) Characterization of SHATTERPROOF homoeologs and CRISPR-Cas9-mediated genome editing enhances pod-shattering resistance in *Brassica napus* L. *CRISPR J.* **4**(3), 360–370.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0129>
 119. Probsting M., Schenke D., Hossain R., Thureau C., Wighardt L., Schuster A., Zhou Z., Ye W., Rietz S., Leckband G., Cai D. (2020) Loss-of-function of CRT1a (calreticulin) reduces susceptibility to *Verticillium longisporum* in both *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Biotechnol. J.* **18**, 2328–2344.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13394>
 120. Sashidhar N., Harloff H.J., Potgieter L., Jung C. (2020) Gene editing of three *BnITPK* genes in tetraploid oilseed rape leads to significant reduction of phytic acid in seeds. *Plant Biotechnol. J.* **18**(11), 2241–2250.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13380>
 121. Karunarathna N.L., Wang H., Harloff H.-J., Jiang L., Jung C. (2020) Elevating seed oil content in a polyploid crop by induced mutations in *SEED FATTYACID REDUCER* genes. *Plant Biotechnol. J.* **18**(11), 2251–2266.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13381>
 122. Wu J., Chen C., Xian G., Liu D., Lin L., Yin S., Sun Q., Fang Y., Zhang H., Wang Y. (2020) Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing. *Plant Biotechnol. J.* **18**(9), 1857–1859.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13368>
 123. Xie T., Chen X., Guo T., Rong H., Chen Z., Sun Q., Batley J., Jiang J., Wang Y. (2020) Targeted knockout of *BnTT2* homologues for yellow-seeded *Brassica napus* with reduced flavonoids and improved fatty acid composition. *J. Agric. Food Chem.* **68**(26), 5676–5690.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01126>
 124. Wu J., Yan G., Duan Z., Wang Z., Kang C., Guo L., Liu K., Tu J., Shen J., Yi B., Fu T., Li X., Ma C., Dai C. (2020) Roles of the *Brassica napus* DELLA protein BnaA6.RGA, in modulating drought tolerance by interacting with the ABA signaling component BnaA10.ABF2. *Front. Plant Sci.* **11**, 577.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00577>
 125. Zhai Y., Yu K., Cai S., Hu L., Amoo O., Xu L., Yang Y., Ma B., Jiao Y., Zhang C., Khan M.H.U., Khan S.U. (2020) Targeted mutagenesis of *BnTT8* homologs controls yellow seed coat development for effective oil production in *Brassica napus* L. *Plant Biotechnol. J.* **18**(5), 1153–1168.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13281>

126. Zheng M., Zhang L., Tang M., Liu J., Liu H., Yang H., Fan S., Terzaghi, W., Wang H., Hua W. (2020) Knock-out 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.* **18**(3), 644–654.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13228>
127. Khan M.H.U., Hu L., Zhu M., Zhai Y., Khan S.U., Ahmar S., Amoo O., Zhang K., Fan C., Zhou Y. (2021) Targeted mutagenesis of *EOD3* gene in *Brassica napus* L. regulates seed production. *J. Cell. Physiol.* **236**(3), 1996–2007.
<https://doi.org/10.1002/jcp.29986>
128. Sun Q., Lin L., Liu D., Wu D., Fang Y., Wu J., Wang Y. (2018) CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of the *BnWRKY11* and *BnWRKY70* genes in *Brassica napus* L. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(9), 2716.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092716>
129. Kim Y.C., Ahn W.S., Cha A., Jie E. Y., Kim S. W., Hwang B.-H., Lee S. (2022) Development of glucoraphanin-rich broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by CRISPR/Cas9-mediated DNA-free *BolMYB28* editing. *Plant Biotechnol. Rep.* **16**, 123–132.
<https://doi.org/10.1007/s11816-021-00732-y>
130. Jeong S.Y., Ahn H., Ryu J., Oh Y., Sivanandhan G., Won K.-H., Park Y.D., Kim J.-S., Kim H., Lim Y.P., Kim S.-G. (2019) Generation of early-flowering chinese cabbage (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*) through CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Biotechnol. Rep.* **13**(5), 491–499.
<https://doi.org/10.1007/s11816-019-00566-9>
131. Neequaye M., Stavstrup S., Harwood W., Lawrenson T., Hundleby P., Irwin J., Troncoso-Rey P., Saha S., Traka M.H., Mithen R., Østergaard L. (2021) CRISPR-Cas9-mediated gene editing of *MYB28* genes impair glucoraphanin accumulation of *Brassica oleracea* in the field. *CRISPR J.* **4**(3), 416–426.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0007>
132. Cao W., Dong X., Ji J., Yang L., Fang Z., Zhuang M., Zhang Y., Lv H., Wang Y., Sun P., Liu Y., Li Z., Han F. (2021) BoCER1 is essential for the synthesis of cuticular wax in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae.* **277**, 109801.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109801>
133. Mishra R., Mohanty J.N., Mahanty B., Joshi R.K. (2021) A single transcript CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of *CaERF28* confers anthracnose resistance in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Planta.* **254**(1), 5.
<https://doi.org/10.1007/s00425-021-03660-x>
134. Lee K.-R., Jeon I., Yu H., Kim S.-G., Kim H.-S., Ahn S.-J., Lee J., Lee S.-K., Kim H.U. (2021) Increasing monounsaturated fatty acid contents in hexaploid *Camelina sativa* seed oil by *FAD2* gene knockout using CRISPR-Cas9. *Front. Plant Sci.* **12**, 702930.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702930>
135. Janga M.R., Pandeya D., Campbell L.M., Konganti K., Villafuerte S.T., Puckhaber L., Pepper A., Stipanovic R.D., Scheffler J.A., Rathore K.S. (2019). Genes regulating gland development in the cotton plant. *Plant Biotechnol. J.* **17**(6), 1142–1153.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13044>
136. Chen Y., Fu M., Li H., Wang L., Liu R., Liu Z., Zhang X., Jin S. (2021) High-oleic acid content, nontransgenic allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) generated by knockout of *GhFAD2* genes with CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol. J.* **19**(3), 424–426.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13507>
137. Вавилов Н.И. (1920) Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Доклад на 3-й Всероссийской встрече селекционеров. Саратов, с. 16.
138. Li Z., Liu Z. B., Xing A., Moon B.P., Koellhoffer J.P., Huang L., Cigan A.M. (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* **169**(2), 960–970.
139. Butt H., Eid A., Ali Z., Atia M.A., Mokhtar M.M., Hassan N., Mahfouz M.M. (2017) Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Front. Plant Sci.* **8**, 1441.
140. Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M., Terada R., Arazoe T., Ishii H., Teramura H., Yamamoto T., Komatsu H., Miura K., Ezura H., Nishida K., Ariizumi T., Kondo A. (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **35**, 441–443.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3833>
141. Shimatani Z., Fujikura U., Ishii H., Matsui Y., Suzuki M., Ueke Y., Taoka K., Terada R., Nishida K., Kondo A. (2018) Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant Physiol. Biochem.* **131**, 78–83.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.04.028>
142. Shimatani Z., Fujikura U., Ishii H., Terada R., Nishida K., Kondo A. (2018) Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data Brief.* **20**, 1325–1331.
<https://doi.org/10.1016/J.DIB.2018.08.124>
143. Sun Y., Jiao G., Liu Z., Zhang X., Li J., Guo X., Du W., Du J., Francis F., Zhao Y., Xia L. (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.* **8**, 298.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00298>
144. Butler N.M., Baltus N.J., Voytas D.F., Douches D.S. (2016) Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Front. Plant Sci.* **7**, 1045.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01045>
145. Svitashv S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. (2015) Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* **169**(2), 931–945.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00793>
146. Braatz J., Harloff H.J., Mascher M., Stein N., Himmelbach A., Jung C. (2017) CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol.* **174**(2), 935–942.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00426>

147. Liu X., Ding Q., Wang W., Pan Y., Tan C., Qiu Y., Chen Y., Li H., Li Y., Ye N., Xu N., Wu X., Ye R., Liu J., Ma C. (2022) Targeted deletion of the first intron of the *Wxb* allele via CRISPR/Cas9 significantly increases grain amylose content in rice. *Rice* (N.Y.). **15**(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00548-y>
148. Yunyan F., Jie Y., Fangquan W., Fangjun F., Wenqi L., Jun W., Yang X., Jinyan Z., Weigong Z. (2019) Production of two elite glutinous rice varieties by editing *Wx* gene. *Rice Sci.* **26**, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.04.007>
149. Zhang J., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.K. (2018) Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. *J. Integr. Plant Biol.* **60**(5), 369–375. <https://doi.org/10.1111/jipb.12620>
150. Veillet F., Chauvin L., Kermarrec M.P., Sevestre F., Chauvin J.E. (2019) The *Solanum tuberosum* *GBSSI* gene: a target for assessing gene and base editing in tetraploid potato. *Plant Cell Rep.* **38**, 1065–1080. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02426-w>
151. Kusano H., Ohnuma M., Mutsuro-Aoki H., Asahi T., Ichinosawa D., Onodera H., Asano K., Noda T., Horie T., Fukumoto K., Kihira M., Teramura H., Yazaki K., Umemoto N., Muranaka T., Shimada H. (2018) Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato. *Sci. Rep.* **8**, 13753. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32049-2>
152. Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* **36**(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>
153. Qi X., Wu H., Jiang H., Zhu J., Huang C., Zhang X., Liu C., Cheng B. (2020) Conversion of a normal maize hybrid into a *waxy* version using *in vivo* CRISPR/Cas9 targeted mutation activity. *Crop J.* **8**, 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.01.006>
154. Abe K., Araki E., Suzuki Y., Toki S., Saika H. (2018) Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiol. Biochem.* **131**, 58–62. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.04.033>
155. Okuzaki A., Ogawa T., Koizuka C., Kaneko K., Inaba M., Imamura J., Koizuka N. (2018) CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* **131**, 63–69. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.04.025>
156. Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., Gal-On A. (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* **17**(7), 1140–1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>
157. Jia H., Zhang Y., Orbović V., Xu J., White F.F., Jones J.B., Wang N. (2017) Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol. J.* **15**(7), 817–823. <https://doi.org/10.1111/pbi.12677>
158. Peng A., Chen S., Lei T., Xu L., He Y., Wu L., Yao L., Zou X. (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol. J.* **15**(12), 1509–1519. <https://doi.org/10.1111/pbi.12733>
159. Malnoy M., Viola R., Jung M.H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S., Nagamangala Kanchiswamy C. (2016) DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front. Plant Sci.* **7**, 1904.
160. Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci. Rep.* **7**(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598017-00578-x>
161. 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**(9), 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
162. Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. (2017) Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* **91**(4), 714–724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
163. Hu X., Cui Y., Dong G., Feng A., Wang D., Zhao C., Zhang Y., Hu J., Zeng D., Guo L., Qian Q. (2019) Using CRISPR-Cas9 to generate semi-dwarf rice lines in elite landraces. *Sci. Rep.* **9**, 19096. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55757-9>
164. Khlestkina E.K., Shvachko N.A., Zavarzin A.A., Börner A. (2020) Vavilov's series of the “green revolution” genes. *Russ. J. Genetics.* **56**(11), 1371–1380. <https://doi.org/10.1134/S1022795420110046>
165. 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>
166. Kim C.Y., Park J.Y., Choi G., Kim S., Vo K.T.X., Jeon J.S., Lee Y.H. (2022) A rice gene encoding glycosyl hydrolase plays contrasting roles in immunity depending on the type of pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **23**(3), 400–416. <https://doi.org/10.1111/mpp.13167>
167. Carey-Fung O., O'Brien M., Beasley J.T., Johnson A.A.T. (2022) A model to incorporate the bHLH transcription factor *OsIRO3* within the rice iron homeostasis regulatory network. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1635. <https://doi.org/10.3390/ijms23031635>
168. Takeda Y., Tobimatsu Y., Karlen S.D., Koshihara T., Suzuki S., Yamamura M., Murakami S., Mukai M., Hattori T., Osakabe K., Ralph J., Sakamoto M., Umezawa T. (2018) Downregulation of *p-COUMAROYL ESTER 3-HYDROXYLASE* in rice leads to altered cell wall structures and improves biomass saccharification. *Plant J.* **95**(5), 796–811. <https://doi.org/10.1111/tpj.13988>

Improvement of Crops Using the CRISPR/Cas System: New Target Genes

Y. V. Ukhatova¹ *, M. V. Erastenkova¹, E. S. Korshikova¹, E. A. Krylova¹, A. S. Mikhailova¹,
T. V. Semilet¹, N. G. Tikhonova¹, N. A. Shvachko¹, and E. K. Khlestkina¹

¹*Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
Ministry of Science and Higher Education, St. Petersburg, 190000 Russia*

**e-mail: sci_secretary@vir.nw.ru*

Successful application of the CRISPR/Cas genome editing system to various crops largely depends on the correct choice of target genes that may be purposefully changed to improve yield, quality, and resistance to biotic and abiotic stressors. The objective of this work was systematizing and cataloguing the information on the confirmed target genes for crop improvement. The latest systematic review was presented on peer-reviewed scientific papers (indexed in the Scopus database) published before August 17, 2019. The present study covers the period from August 18, 2019 to March 15, 2022. The search according to the given algorithm revealed 2090 publications, and their analysis showed that only 685 original papers contained the results of gene editing for 28 crops (the search included 56 crops). A significant part of these publications described the application of genome editing to target genes previously identified in similar works or the studies were associated with reverse genetics, while only 136 publications contained data on editing new target genes whose modification was aimed at improving plant traits important for breeding. The total number of target genes in cultivated plants that were edited to improve properties of breeding value over the entire period of the CRISPR/Cas system application was 287. A detailed analysis of the editing of new target genes is presented in this review. The studies were most often aimed at increasing plant productivity and disease resistance as well as improving the properties of plant materials. Observations are made whether it was possible to obtain stable transformants at the time of publication and whether the editing technique was applied to non-model cultivars. For a number of crops, however, the range of modified cultivars was significantly expanded, specifically for wheat, rice, soybean, tomato, potato, rapeseed, grapevine, and maize. In a vast majority of cases, agrobacterium-mediated transformation was used to deliver the editing construct; less often it was bioballistics, protoplast transfection or haploinducers. The desired change in traits was most often achieved by gene knockout. In some cases, knockdown and nucleotide substitutions were applied. The base-editing and prime-editing approaches have increasingly been used to make nucleotide substitutions in crop genes. The emergence of a convenient CRISPR/Cas editing system helped to significantly intensify the development of molecular genetics specific to many crop species.

Keywords: base-editing, CRISPR/Cas, prime-editing, biotechnology, target genes, genome editing, cultivated plants, targeted mutagenesis