

ОБЗОРЫ / REVIEWS

«В результате традиционной селекции генетический потенциал сельскохозяйственных культур доведен до физиологического предела. Зерновые и другие основные культуры уже практически исчерпали свои генетические возможности роста урожайности. Страны с высокоразвитым сельским хозяйством достигли естественных, природных пределов»

Лестер Рассел Браун, 2011

УДК 633.16:575.2

doi: 10.30766/2072-9081.2019.20.1.05-19

Подходы к повышению продуктивности и адаптивности ячменя с помощью технологий генетической модификации*

© 2019. А.В. Бакулина, И.Г. Широких

ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого», г. Киров, Российская Федерация

В обзоре отражены достигнутые к настоящему времени успехи в изучении молекулярных механизмов стрессоустойчивости ячменя для улучшения его хозяйственно ценных признаков как культуры сельскохозяйственного производства. Описаны возможные генно-инженерные подходы, развиваемые в целях повышения устойчивости культуры к абиотическим стрессам. Особое внимание уделено совершенствованию генома путем интеграции гетерологичных генов. Перечислены перспективные для практического осуществления трансформаций целевые гены и промоторы, проанализирована их эффективность в зависимости от других факторов трансформации. Освещены новейшие технологии целенаправленного мутагенеза, применяемые для геномного редактирования (системы ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9). Приведены примеры создания с помощью генных технологий новых форм ячменя, отличающихся повышенной засухоустойчивостью, толерантностью к почвенной кислотности и токсичности алюминия, солевому стрессу. Показано, что генетическая модификация позволяет не только ускорить экспериментальный процесс создания новых генотипов, но и представляет собой исследовательский инструмент для анализа и выяснения функций генов: с помощью техник сайленсинга и РНК-интерференции было выявлено и идентифицировано большое количество последовательностей, кодирующих ценные признаки ячменя. Обсуждаются перспективы развития постгеномных технологий для использования в практической селекции этой культуры.

Ключевые слова: ячмень, стрессоустойчивость, постгеномная селекция, генная трансформация, геномное редактирование

Для цитирования: Бакулина А.В., Широких И.Г. Подходы к повышению продуктивности и адаптивности ячменя с помощью технологий генетической модификации. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2019; 20(1):05-19. DOI: 10.30766/2072-9081.20.1.05-19.

Increasing of barley productivity and adaptability by using genetic modification technologies

© 2019. A.V. Bakulina, I.G. Shirokikh

Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Kirov, Russian Federation

The review presents the achievements in the research of barley stress tolerance molecular mechanisms to improve its economically valuable traits as a crop of agricultural production. Possible genetic engineering approaches developed in order to increase the barley resistance to abiotic stresses have been described. Special attention is paid to the genome improvement through the integration of heterologous genes. The targeted genes and promoters perspective for transformations, their efficiency in dependence to other transformation factors have been summarized and analyzed. The latest technologies of targeted mutagenesis used for genome editing (ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 systems) are observed. The examples of creation of new barley forms with increased resistance to drought, soil acidity, aluminum toxicity and salt stress by using gene technologies are given. It is shown that genetic modification allows not only to accelerate the experiment process of new genotypes creation, but also represents a research tool for the analysis and identification of gene functions. A large number of sequences

*Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук по заданию 0767-2019-0093 «Разработка и реализация фундаментальных научно-методических подходов мобилизации, изучения, создания (в т.ч. с использованием биотехнологий) и поддержания уникальных природных и экспериментальных генетических ресурсов яровых зерновых культур (пшеница, ячмень, овес); моделей сортов с повышенной продуктивностью и устойчивостью к действию стрессовых биотических и абиотических факторов, с улучшенными селекционно-ценными признаками; технологии управления продукционным процессом с учетом эдафических и биотических стрессовых факторов европейского Северо-Востока России, локального и глобального изменения климата для решения актуальных задач обеспечения импортозамещения и улучшения качества питания населения»

encoding valuable traits of barley were identified by means of silencing and RNA interference techniques. The prospects of development of post-genomic technologies for use in practical breeding of this culture are discussed.

Key words: *barley, stress tolerance, post-genomic selection, genetic transformation, genome editing*

For citation: Bakulina A.V., Shirokikh I.G. Increasing of barley productivity and adaptability by using genetic modification technologies. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2019; 20(1): 05-19. (In Russ.). DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.1.05-19

В результате выведения новых высокопродуктивных и низкорослых сортов пшеницы и риса в сельском хозяйстве ряда стран Азии и Латинской Америки в середине 1960-х годов был достигнут прорыв, известный как «зеленая революция». Благодаря селекции сортов интенсивного типа в странах третьего мира была не только преодолена угроза голода, но развивающиеся страны смогли полностью обеспечить себя продовольствием. За вклад в осуществление «зелёной революции» американский агроном-селекционер Норман Борлоуг был удостоен Нобелевской премии мира 1970 года. В своей Нобелевской лекции учёный подчёркивал, что «зеленая революция» позволила достичь лишь временного успеха в войне с голодом, которую ведет человечество, она дала людям передышку. Сегодня ученый убежден: человечество уже располагает технологиями (либо полностью готовыми к применению, либо находящимися в завершающей стадии разработки), способными надежно прокормить 10 млрд человек [1].

Действительно, селекция, направленная на создание интенсивных сортов, привела к тому, что продуктивность основных культур достигла своего физиологического предела. Зерновые и ряд других культур уже практически исчерпали свои генетические возможности роста урожайности. Между тем, на практике реализуется лишь 30% урожайности, заложенной в генетическом потенциале растений, из-за потерь, вызванных болезнями, вредителями и абиотическими стрессами [2]. Кроме того, успехи «зеленой революции» привели к беспрецедентному ухудшению глобальной экологической обстановки вследствие ирригационных мероприятий и загрязнения почв пестицидами. Значительно возросла частота экстремальных по погодным условиям лет, а современный период считается периодом неустойчивого (аномального) климата. Потери в сельском хозяйстве США и России от различных абиотических стрессов составляют в общих потерях до 70-80%. В структуре площадей, подвергнутых действию разнообразных абиотических факторов, в мире наибольшую долю занимают почвы с дефицитом элементов питания (39%) (рис. 1). На втором месте по распространенности стрессов в растениеводстве – воздействие низких

температур (26%), далее следуют дефицит влаги (16%), периодическое подтопление и анаэробность почв (10%), почвенная кислотность и засоление (6%) [3]. В дальнейшем ситуация с распространенностью абиотических и эдафических стрессов будет только усугубляться. Поэтому вполне закономерно, что вторую «зеленую революцию», о которой заговорили еще в 70-е годы прошлого столетия, связывают, главным образом, с решением проблемы стрессов сельскохозяйственных растений. Потребуется немалые усилия как традиционной селекции, так и современной сельскохозяйственной биотехнологии, для того чтобы добиться темпов роста урожайности основных продовольственных культур, достаточных, чтобы прокормить растущее население Земли [4].

Среди зерновых культур ячмень по площади посевов занимает четвертое место после пшеницы, риса и кукурузы. В сезоне 2017-2018 гг. мировые посевные площади ячменя составили 48,1 млн га, а в Российской Федерации – 7,85 млн га [5]. Наша страна является мировым лидером по производству зерна ячменя – 20,6 млн тонн в 2017 г. [6] (рис. 2).

Несмотря на то, что среди зарегистрированных на сайте Международной службы мониторинга за применением агробиотехнологии (ISAAA) есть допущенные для использования в сельском хозяйстве трансгенные линии наиболее распространенных зерновых культур: рис, кукуруза и пшеница, ячменя среди них пока нет [7].

Развитию геномной инженерии (ГИ) ячменя в значительной мере должны способствовать успехи в расшифровке генома этой культуры. Первое сообщение о создании для ячменя генетической карты высокой плотности появилось в 2012 г. [8], а в 2016 г., с помощью методов секвенирования нового поколения, расшифровка генома *H. vulgare* была практически завершена [9]. Новые сведения о структуре и функциях более 39 тыс. генов ячменя открыли дорогу для комплексного функционального анализа работы генных сетей, в том числе связанных с агрономически важными признаками этой культуры. Полагают, что эти исследования должны способствовать существенному увеличению продуктивности и устойчивости ячменя к стрессам [10].

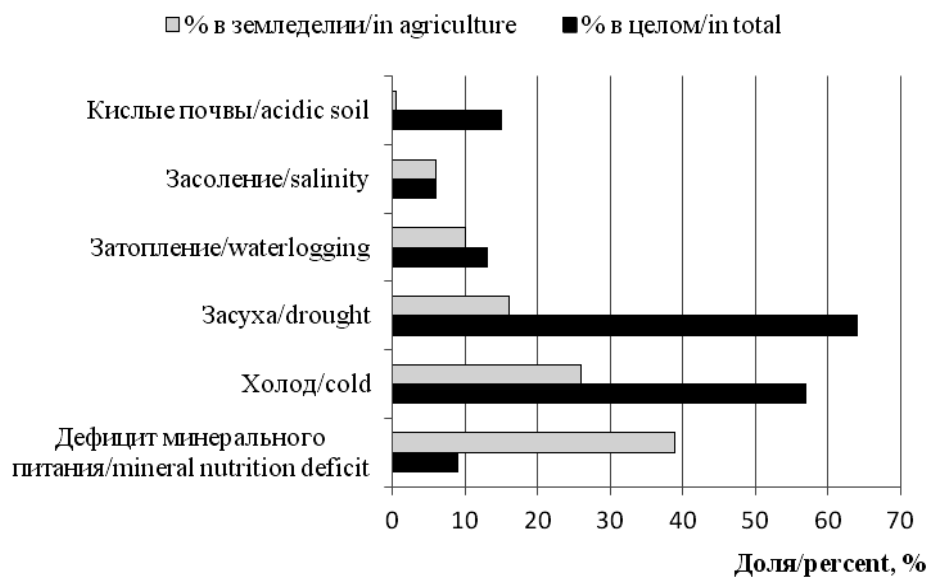


Рис. 1. Почвы, подверженные действию абиотических стрессов (по [3])
Fig. 1. Soils exposed to abiotic stresses (according to [3])

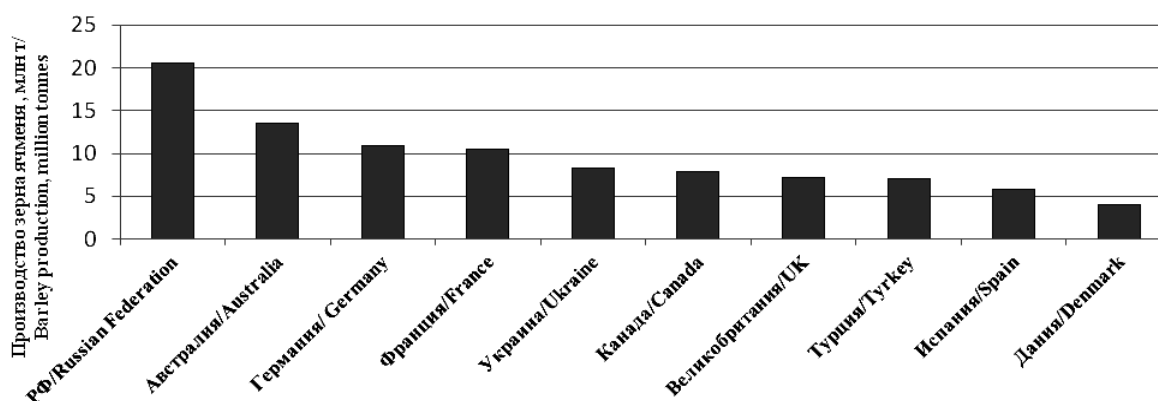


Рис. 2. Страны-лидеры по производству зерна ячменя в 2017 г. (по [6])
Fig. 2. Countries-leaders in barley grain production in 2017 (according to [6])

Целый ряд лабораторий в мире работает над созданием трансгенных линий *H. vulgare* как с целью получения фундаментальных знаний о функциях генов, так и для решения прикладных задач, связанных с увеличением устойчивости ячменя к насекомым, вирусам, грибным и бактериальным патогенам, гербицидам и абиотическим стрессам, повышением питательности и качества урожая.

Для оценки достигнутых успехов и перспектив их внедрения в практическую селекцию нами проведен анализ опубликованных работ, в которых для повышения стрессоустойчивости ячменя использованы методы ГИ, включая интеграцию в геном гетерологичных (других организмов) генов и ГИ манипуляции с собственными генами ячменя. Особое внимание уделено получению модифици-

рованных растений ячменя без продукции в них трансгенных белков – с помощью новейшей технологии – редактирования генома.

Повышение устойчивости ячменя к абиотическим стрессам путем переноса гетерологичных генов. Ответ растений на абиотический стресс является генетически сложным и трудным для контроля и конструирования, поскольку связан со значительными перестройками физиолого-биохимических процессов и с изменением экспрессии довольно большого числа генов. Например, установлено, что под действием солевого стресса у растений одновременно изменяется экспрессия более чем 1500 генов [11]. Поэтому для повышения стрессоустойчивости необходим перенос различных генов, которые вовлечены в пути передачи сигнала и регуляции, кодиру-

ют ферменты синтеза функциональных и структурных протекторов (осмолитики, антиоксиданты) или регуляторные белки [12, 13, 14, 15]. Рассмотрим те целевые гены и механизмы устойчивости, которые уже были использованы различными авторами для повышения устойчивости ячменя к абиотическим стрессам к настоящему времени.

Гены белков мембранного транспорта.

Суперэкспрессию генов, кодирующих белки, связанные с регуляцией мембранного транспорта, успешно используют для конструирования растений, толерантных к ионной токсичности. Например, для получения форм ячменя, устойчивых к повышенному содержанию ионов алюминия, австралийские ученые использовали ген транспортера малата (aluminum-activated malate transporter – *ALMT1*), выделенный из алюмотолерантного сорта пшеницы. Благодаря активному эффлюксу малата, трансформанты ячменя при выращивании в гидропонной культуре и на кислой почве превосходили исходную форму по урожайности зерна и сохраняли стабильную экспрессию интегрированного гена в поколении T2 [16, 17].

Получены также трансгенные растения ячменя с суперэкспрессией собственного *ALMT1* гена. Однако стабильная экспрессия *HvALMT1* сопровождалась снижением темпов роста трансформантов, появлением пятнистости и некрозов листьев. И хотя генно-модифицированные (ГМ) растения отличались увеличением в 20 раз эффлюкса малата и в 15 раз — сукцината, что должно способствовать повышению алюмотолерантности, практическое использование данного подхода ограничено ввиду нарушения баланса органических кислот в растении [18].

Повышению устойчивости к алюминию способствовала интеграция в геном ячменя сорта Golden Promise гена мембранного транспортера цитрата *HvAACT1* [19]. По эффективности эффлюкса из корней цитрата трансформант не уступал алюмотолерантному сорту Dayton. Таким образом, встраивание генов транспортеров органических кислот в геномы чувствительных к ионной токсикации сортов может в ближайшем будущем дополнить традиционные методы селекции.

Для повышения солеустойчивости сорта Golden Promise исследовательская группа из Австралии использовала ген арабидопсиса *AtNHX1*, кодирующий вакуолярный Na^+/H^+ транспортер. Большинство линий, экспресси-

рующих *AtNHX1*, не имели существенных преимуществ по сравнению с исходной формой. Для достижения большей эффективности данного подхода авторы делают вывод о необходимости пирамидирования нескольких генов [20]. Позднее эта же группа авторов показала, что повысить солеустойчивость ячменя можно посредством сверхэкспрессии гена, кодирующего субъединицу С вакуолярной АТФ-азы (vacuolar-type H^+ -ATPase – VHA-C) из арабидопсиса. Вакуолярная АТФ-аза растительных клеток представляет собой основной потенциал-генерирующий фермент, обеспечивающий движущую силу (протонный градиент) для транспорта в вакуоль различных ионов и метаболитов [21]. Субъединица С играет ключевую роль в обратимой сборке VHA и в обеспечении сопряженной работы периферического и интегрального доменов мембраны [22]. Линии, экспрессирующие *AtVHA-C*, в меньшей степени снижали в условиях засоления урожайность зеленой массы и зерна по сравнению с исходным сортом [23].

В ответ на повышение концентрации NaCl в побегах или корнях многих видов растений индуцируется Na^+/H^+ -обменная активность [24]. В регуляции Na^+/H^+ -обменника задействованы протеинкиназы, модифицирующие другие белки путём фосфорилирования остатков аминокислот. Трансгенные по гену протеинкиназы *AtCIPK16* растения ячменя продемонстрировали солеустойчивость при длительном (в течение 30 дней) воздействии 300 mM NaCl [25].

Увеличению накопления биомассы и продуктивности ячменя способствовала в условиях засоления экспрессия гетерологичного гена *AVPI*, кодирующего вакуолярную H^+ -пирофосфатазу арабидопсиса. Положительный эффект этой работы заключался в отсутствии изменений концентрации натрия в листьях трансгенных растений при стрессе, вызванном высокой соленостью среды [26].

Гены, кодирующие транспортеры ионов, пытались также использовать для решения проблемы дефицита минерального питания растений. Например, известна попытка увеличить потребление из почвы фосфатов, для чего в геном ячменя Golden Promise встроили ген *Phl1-6*, кодирующий транспортер фосфата. Однако растения с суперэкспрессией гена *Phl1-6* не отличались от контроля по скорости потребления фосфатов и содержанию фосфора в биомассе. Неудачу авторы связывают с

посттранскрипционной регуляцией активности транспортера [27].

Гены, контролирующие уровень фитогормонов. Фитогормоны регулируют не только процессы роста и развития растений, но и ответную реакцию организма на факторы окружающей среды. При абиотических стрессах повышению жизнеспособности растений способствуют цитокинины. В университете Палацкого в г. Оломоуце (Чехия) для увеличения выносливости ячменя к дефициту влаги использовали в качестве целевого ген, связанный с молекулярными механизмами восприятия и трансдукции цитокининового сигнала. Ячмень Golden Promise был трансформирован геном *AtCKX1* (цитокинин оксидазы/дегидрогеназы (СКХ; ЕС.1.5.99.12)) из арабидопсиса. Трансгенные растения характеризовались замедленным ростом побегов, но при этом – увеличением массы корневой системы и, соответственно, поглощающей способности корней. Благодаря этому в условиях засухи все трансгенные линии имели более высокую степень обводненности листьев и характеризовались более высокими показателями урожайности в сравнении с исходным сортом [28].

Сообщалось, что повышенное содержание цитокининов в алейроновом слое зерна, где преимущественно экспрессируется ген *HvCKX1*, способствует накоплению крахмала в эндосперме, за счет чего усиливается налив зерна [29]. В результате подавления путем РНК-интерференции у ячменя экспрессии гена *HvCKX2* польские ученые наблюдали снижение у растений активности СКХ, которое сопровождалось увеличением озерненности колоса и массы 1000 зерен [30].

Гены антиоксидантов. Воздействие стрессовых факторов сопровождается увеличением у растений продукции активных форм кислорода (АФК), содержание которых может возрастать до 10 раз [31] и приводить к окислительным повреждениям внутриклеточных структур. И хотя при передаче стрессового сигнала АФК одновременно служат у растений сигнальными молекулами, их избыточная генерация способна привести клетку к гибели, поэтому необходимо их своевременное удаление [32]. Один из подходов в геномном конструировании стрессоустойчивых линий растений основан на механизме нейтрализации АФК и усилении антиоксидантной защиты за счет встраивания соответствующих генов.

Сообщалось о повышении антиоксидантной защиты ячменя, с использованием

гена гомогенизат геранилгеранилтрансферазы (*HvHGGT*) – фермента, участвующего в синтезе токотриенола (одна из форм витамина Е). Сверхэкспрессия гена *HvHGGT* под эндогенным промотором D-гордеина (*proHor*) увеличила содержание токотриенола на 10-15% по сравнению с исходным сортом, а также снизила уровень перекисного окисления липидов в тканях примерно на 20% [33].

Эффективным антиоксидантом является белок тиоредоксин (TRX), который вместе с глутатионом участвует в обезвреживании АФК, передавая электроны различным пероксидазам [34]. Корни растений ячменя, экспрессирующих ген *TRX* из канареечника, характеризовались, в сравнении с исходными растениями, более низкой степенью окисления белка в условиях стресса, обусловленного токсичностью ионов алюминия. У трансформантов в сравнении с исходной формой значительно возросла активность также других антиоксидантных ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и аскорбат пероксидазы [35]. В более ранней работе ген тиоредоксина пшеницы (*Trx h*) был использован для получения линий ячменя, устойчивых к селениту, ингибирующему прорастание семян на почвах, загрязненных промышленными отходами [36]. Трансгенные по гену *Trx h* линии ячменя переводили селенит в нетоксичную форму, благодаря чему при использовании ингибирующих концентраций селенита отличались более высокой всхожестью семян и увеличением линейных размеров от проростков нетрансформированных растений. Авторы полагают, что растения ячменя с гетерологичным геном *TRX* могут найти применение в фиторемедиации загрязненных селенитом почв.

Для повышения антиоксидантной защиты растений предпринимались попытки использования генов, кодирующих различные окислительно-восстановительные ферменты. Так, трансгенез по гену супероксиддисмутазы (*SOD*) приводил к повышению устойчивости к стрессу, обусловленному алюминием, у кукурузы [37], риса [38], райграсса [39]. Для повышения антиоксидантной защиты ячменя и увеличения его устойчивости к токсичности алюминия в геномы двух отечественных сортов (Купец и Белгородский 100) был встроены гены Fe-супероксиддисмутазы (*Fe-SOD1*) из арабидопсиса. Используемая генно-инженерная конструкция была снабжена сигнальной последовательностью гена *rbcS* гороха (*Pisum sativum* L.), направляющей его белковый про-

дукт в пластиду, поскольку при большинстве стрессов для сохранения нормальной жизнедеятельности растительной клетки хлоропласт является одним из наиболее значимых компартов. Однако уровень экспрессии трансгена у полученных путем агробактериальной трансформации растений был недостаточен и не обеспечил значимого усиления активности SOD. Две из трех независимых трансгенных линий характеризовались низкой семенной продуктивностью, а всхожесть трансгенных семян варьировала от 5,0 до 52,7% в зависимости от линии. Малочисленность семенного потомства и низкая всхожесть семян не позволили изучить наследование перенесенной генетической конструкции в потомстве трансформантов и оценить изменение устойчивости растений ячменя к окислительному стрессу [40].

Одним из проявлений окислительного стресса у растений является образование и накопление активных карбонильных соединений (альдегидов и кетонов) – карбонильный стресс, который, в отличие от окислительного, происходит не внутри клеток, а во внеклеточном матриксе, где ферментные системы защиты не так эффективны, как системы, находящиеся в клетках. Группе венгерских исследователей удалось противодействовать карбонильному стрессу посредством агробактериального переноса в ячмень гена альдозоредуктазы (*MsALR*) из люцерны посевной (*Medicago sativa* L.). Для оценки защитного эффекта *MsALR* в отношении хлорофиллов и каротиноидов в некоторых трансгенных линиях фермент был направлен в хлоропласты. Накопление рекомбинантного белка *MsALR* как в цитозоле, так и в хлоропластах увеличивало толерантность трансгенных линий к карбонильному стрессу [41].

Далее было показано, что альдокеторедуктазы (AKR) не только модифицируют реакционно активные формы альдегидов, но также могут синтезировать осмопротекторы. Так, было установлено, что трансгенные растения ячменя, конститутивно экспрессирующие AKR, полученные либо из арабидопсиса (AKR4C9), либо из люцерны (*MsALR*), вырабатывают больше сорбита, чем нетрансгенный ячмень. При этом трансгенные растения демонстрировали повышенную толерантность к кадмию и соли [42].

Гены транскрипционных факторов. Использование подхода, основанного на встраивании одного гена, кодирующего про-

дукт с определенной функцией, имеет достаточно ограниченный успех при повышении толерантности культур к абиотическим стрессам, т.к. адаптация к стрессу обусловлена взаимодействием множества метаболических путей. Кроме того, растение всегда стремится к восстановлению нарушенного воздействием стрессора внутреннего гомеостаза, чему не может способствовать сверхэкспрессия одного продукта, в особенности, конститутивная. Поэтому перспективными целевыми генами служат регуляторные гены, которые связаны с несколькими метаболическими путями и влияют на ключевые метаболические пути.

В осуществлении практически всех метаболических процессов принимают участие транскрипционные факторы (TFs). Установлено, что экспрессию стресс-чувствительных генов регулируют разные семейства TFs, такие как ERF/AP2, HSF, bZIP, MYB, MYC, NFY, NAC, WRKY, Cys₂His₂, MADS-box и Zn-finger [43].

Одно из самых крупных семейств TFs представлено в растениях белками NAC (по apical meristem (NAM)), часть из которых регулирует у зерновых реакцию на засуху, холод и засоление, а другие активны в отношении патогенов [44]. Сверхэкспрессия гена, кодирующего транскрипционный фактор *HvSNAC1*, в ячмене позволила получить трансгенные растения ячменя с засухоустойчивостью, которые не отличались от растений исходного типа в условиях оптимального увлажнения. Кроме того, конститутивная сверхэкспрессия *HvSNAC1* привела к увеличению фотосинтетической активности, снижению потерь воды и повышению продуктивности ячменя в условиях полевой засухи [45].

Известно, что экспрессия генов NAC возрастает не только при засухе, но и при действии низких температур. В связи с этим гены *OsMYB4*, *TaCBF14* и *TaCBF15*, принадлежащие к семейству NAC, были успешно использованы для повышения морозостойкости ячменя [46, 47].

TFs семейства DREB (dehydration responsive elements-binding proteins) включены в АБК-независимые пути и регулируют экспрессию *Cor*-генов (cold responsive genes), что обуславливает отзывчивость растения на дегидратацию. Интеграция в геном ячменя генов *DREB2* и *DREB3* пшеницы повысила устойчивость трансформантов к водному дефициту, однако сопровождалась задержкой роста и снижением урожайности. Нарушения в росте и развитии трансформантов удалось устранить

путем использования стресс-индуцибельного промотора *Zm-Rab17*, который обеспечивал высокий уровень экспрессии трансгена только в условиях засухи [48].

Гены *DREB* участвуют также у однодольных культур в формировании холодовых адаптаций. Показано усиление их экспрессии в условиях низких температур, что, в свою очередь, активирует гены, кодирующие белки RD/COR (responsive to dehydration/cold-responsive) [49]. Линии ячменя с гетерологичным геном *DREB3* были получены под контролем двух холод-индуцибельных промоторов, и проявили высокий уровень устойчивости к низким температурам, не отличаясь при этом от исходных растений по фенотипу [50].

МикроРНК. Помимо TFs, в регуляции экспрессии генов у растений участвуют микроРНК (miРНК) – малые (20-24 нуклеотида) регуляторные некодирующие РНК [51]. Роли растительных miРНК в последнее время уделяется большое внимание в связи с попытками повысить устойчивость растений к засухе и воздействию высоких температур [52, 53, 54].

Продуктивность ячменя в условиях недостатка влаги удалось повысить с помощью *Hv-miR827*, как это было ранее показано для арабидопсиса [55]. Решающее значение при этом играл выбор промотора. Растения со стресс-индуцибельным промотором *Zm-Rab17* были более эффективны в использовании воды и не отличались от исходных растений по продолжительности вегетации, а также быстрее восстанавливались после перенесенного осмотического стресса [56].

Группа исследователей Японского общества физиологов растений идентифицировала два представителя семейства miR393 и их целевые гены *HvTIR1* и *HvAFB*, связанные с обеспечением толерантности ячменя к алюминию. Сверхэкспрессия miR393 снижает степень окислительных повреждений и гибель клеток. Целевое ингибирование активности miR393, напротив, сопровождается повышением чувствительности корня к ионам алюминия. Был сделан вывод, что miR393 участвует в регуляции чувствительности ячменя к алюминию через изменение сигналинга ауксинов. На этом может быть основана новая ГИ стратегия повышения устойчивости растений к токсичности алюминия [57].

Недавно идентифицирована ранее неизвестная miРНК ячменя, связанная с засухоустойчивостью – *hvu-miRX*. Согласно данным геномного анализа ген *hvu-miRX* располагается

на коротком плече хромосомы 2 и, по-видимому, встречается только у растений трибы Triticeae. Трансгенные растения ячменя, экспрессирующие *hvu-miRX*, характеризовались засухоустойчивостью. Было установлено, что *hvu-miRX* оказывает влияние на различные гены, включая TFs [58].

Всего по имеющимся в литературе данным, в геном *H. vulgare* перенесено уже более двух десятков различных генов, так или иначе связанных с формированием у ячменя устойчивости к абиотическим стрессам. Преимуществом трансгенного подхода является гораздо больший спектр генов устойчивости, доступных для вовлечения в формообразовательный процесс, в сравнении с традиционной селекцией [59]. Кроме того, он исключает возможность передачи любых нежелательных генов от растений-доноров растению-реципиенту. Однако сложность механизмов устойчивости и разнообразие стрессовых воздействий обуславливают необходимость переноса, как правило, не одного, а нескольких генов одновременно, что создает дополнительные трудности на пути повышения устойчивости культуры к абиотическим стрессам. Использование ГИ технологий на практике показывает довольно низкую эффективность. Выход трансгенных растений в работах по трансформации составляет, как правило, не более 1-2% [60]. Существенным ограничением трансгеноза являются непредсказуемость плейотропных эффектов встраиваемого гена, нестабильность экспрессии и наследуемости гетерологичных вставок. Экспрессия гетерологичных генов часто вызывает отклонения в росте, развитии и снижении продуктивности трансформантов, вследствие чего трансгеноз нельзя рассматривать, как предполагалось ранее, в качестве более быстрого, чем традиционные методы селекции, способа получения улучшенных форм растений. Поэтому геновая трансформация сегодня служит скорее ценным инструментом выяснения функциональной роли отдельных генов и их регуляции, нежели инструментом создания новых адаптивных и устойчивых к абиотическим стрессам форм.

Улучшение культуры ячменя в процессе геномного редактирования. В последние годы, в отношении многих сельскохозяйственных культур, включая ячмень, интенсивно изучается возможность получения модифицированных нетрансгенных растений с помощью внесения в геном заданных мутаций. Первоначально возникла идея изменять у рас-

тений определенные гены с помощью таргетинга (target-мишень) – гомологичной рекомбинации последовательностей, находящихся в хромосоме, с искусственно введенными в клетку последовательностями ДНК. Впервые эффективность таргетинга на ячмене проверили в Германии (Институт исследования селекции растений общества Макса Планка). Известно, что целевым объектом имидазолиноновых гербицидов является ген ацетолактатсинтазы (*als*), кодирующий фермент биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью. Мутация этого гена у растений, в том числе и у ячменя, ведет к индукции гербицидной устойчивости [61]. Ранее ALS уже использовался для анализа успешности таргетинга генов у табака (*Nicotiana tabacum*), арабидопсиса и риса. Таргетинг ячменя по гену *als*, в отличие от других культур, осуществить не удалось по причине более сложного генома этой культуры [62]. Авторы пришли к выводу, что прилагаемые усилия и временные затраты при использовании этого метода будут неоправданно велики в случае его практического приложения.

Более успешно проводить целенаправленный мутагенез позволяет редактирование генома, основанное на индукции двунитевых разрывов ДНК (double-stranded breaks – DSB). Разрывы образуются под действием различных ферментов или физических воздействий напротив друг друга, с последующей репарацией негомологичных концов (NHEJ non-homologous end-joining). К настоящему времени известны три основные технологии направленного изменения (редактирования) генома: ZFN (zinc finger nuclease – нуклеазы с доменами «цинковые пальцы»), TALEN (transcription activator-like effector nucleases – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и система CRISPR/Cas9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) [63]. Редактирование генома является очень точным процессом, и получаемые с использованием этой технологии растения, не содержат, как правило, гетерологичных последовательностей ДНК. По этой причине редактирование генома более предпочтительно, чем большинство традиционных трансгенных технологий. Однако репарация двойных разрывов тоже может приводить к небольшим (до нескольких десятков пн) делециям или инсерциям в районе DSB целевого гена.

Возможность целенаправленного мутагенеза ячменя с помощью технологии TALEN (индукции DSB специфическими эффекторными нуклеазами, подобными активаторам транскрипции), была впервые показана в совместной работе датских и американских исследователей [64].

В Германии с использованием техники TALEN в геноме ячменя был нокаутирован трансген *gfp* (green fluorescent protein, GFP), который ранее был встроен в геном ячменя в процессе агробактериальной трансформации пыльцевых зерен. Индуцированная мутация, благодаря гаплоидной природе клеток-мишеней, была легко обнаружена, а после удвоения генома получены гомозиготные мутантные растения [65]. В дальнейшем авторы оптимизировали данный подход, продемонстрировав возможность редактирования генома путем точного изменения определенной целевой последовательности ДНК, что привело к предсказуемому изменению функции гена *gfp*. Так, в результате совместной бомбардировки геном нуклеазы и донорной конструкцией, в клетках эпидермиса листьев накапливался не зеленый (GFP), а желтый флуоресцирующий белок (yellow fluorescent protein – YFP), с частотой примерно 3 на 100 мутированных клеток [66].

С использованием недавно разработанных синтетических нуклеаз/никаз (надрезающих эндонуклеаз), которые позволяют индуцировать DSB почти в любой последовательности генома, для культуры ячменя эффективность генного таргетинга была повышена [67]. Благодаря высокой избирательности и предсказуемости результата авторы рассматривают эти технологии в качестве рутинного инструмента генной инженерии ячменя в будущем. Однако наиболее революционным на сегодняшний день способом геномного редактирования является система CRISPR/Cas9, которая впервые была обнаружена у бактерий, где она играет роль своеобразного противовирусного иммунитета, обнаруживая встроенные в бактериальную ДНК вирусные гены и прицельно устраняя их. Эта система позволяет быстро и достаточно просто вносить изменения в заданный участок генома любой (как животной, так и растительной) клетки, получать нетрансгенные организмы с заданными модификациями одновременно в нескольких мишенях [68]. Система CRISPR/Cas9 успешно применяется для нокаутирования генов, а также для встраивания экзогенных последова-

тельностей в геноме и делеции участков генома различной длины [63, 69]. В основу метода положен комплекс, включающий одиночную направляющую РНК (single guide RNA – специфическую sgRNA) и бактериальную нуклеазу Cas (CRISPR associated – ассоциированную с CRISPR). Комплекс CRISPR/Cas9 способен производить точечные DSB в участке генома, комплементарном последовательности sgRNA. Разница между CRISPR/Cas9 и другими системами редактирования геномов состоит в том, что для того чтобы ориентировать нуклеазу относительно представляющего интерес гена, требуется только направляющая РНК, а не сложная сборка белка.

На ячмене геномное редактирование с использованием системы CRISPR/Cas9 впервые осуществлено исследовательским коллективом из Великобритании. Для нокаутирования был выбран ген *HvPM19*, кодирующий АВА-индуцируемый белок плазматической мембраны, который, как полагают, участвует в контроле продолжительности периода покоя семян. Для ячменя и других зерновых культур управление экспрессией данного гена представляет практический интерес, поскольку слишком раннее прорастание семян приводит к снижению урожая и негативно влияет на качество зерна. Полученная у ячменя сорта Mогех, посредством системы CRISPR/Cas9, мутация гена *HvPM19* стабильно наследовалась в последующих поколениях [70].

Во всем мире усиливается интерес к возможности управления селекционными методами содержания в зерне растворимых пищевых волокон [71]. Их источником являются β -глюканы – специфические полисахариды клеточной стенки эндосперма ячменя и других зерновых культур. Этим был обусловлен выбор гена эндо-N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (ENGase-endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase) – фермента, участвующего в углеводном обмене растений в работе австрийских ученых [72]. Систему CRISPR/Cas9 применили для получения целенаправленной мутации ячменя по гену указанного фермента. Если в работе Lawtonson с соавторами [70] число растений, у которых удалось вызвать с помощью CRISPR/Cas9 направленные мутации, не превышало 23%, то в Австрии, с помощью техник агробактериальной трансформации и бомбардировки пятью различными sgRNA-несущими плазмидами, была достигнута более высокая эффективность: индуцированные Cas9 мутации наблюдались уже у 78% растений ячменя.

Генетический анализ растений в поколении T1 подтвердил наличие в конкретных участках небольших вставок и делеций геномных фрагментов [72]. Каких-либо изменений в фенотипе полученных растений по сравнению с исходным сортом Golden Promise не выявлено. В последующих поколениях трансформантов авторы планируют провести биохимический анализ для выявления возможных изменений в составе β -глюканов.

В одной из недавних работ, посвященных геномике ячменя, системы TALEN и CRISPR/Cas9 использованы для индукции мутаций, способствующих выяснению функциональной роли фитазы (*HvPAPhy_a*) в процессах налива зерна, а также для подбора наиболее эффективного промотора этого гена [73, 74].

Первые работы по редактированию генома ячменя стали появляться и с участием российских ученых. Для проведения направленной модификации были выбраны два гена: *Nud*, контролирующий признак голозерности/пленчатости, и ген *Vrs1*, детерминирующий двурядность/шестирядность колоса. Методом полиэтиленгликоль-зависимой трансформации векторы, несущие систему CRISPR/Cas9, были перенесены в протопласты мезофилла листа ячменя сорта Алей, отличающегося высокой регенерационной способностью *in vitro*. Частота индуцированных мутаций колебалась в пределах 6-20%. Таким образом, была продемонстрирована возможность сайт-специфической модификации генома одного из ячменей сибирской селекции [75].

В Венгрии технология CRISPR/Cas9 была использована для придания ячменю устойчивости к вирусу карликовости пшеницы WDV (wheat dwarf virus). Посредством агробактериальной трансформации в геном сорта Golden Promise была перенесена конструкция с четырьмя WDV специфичными sgRNA, и получены растения T0, у которых наличие вставки было подтверждено методом ПЦР и секвенирования. Спустя 42 суток с момента инфицирования вирусом WDV модифицированных линий, на них никаких признаков инфекции не обнаружено [76].

С помощью CRISPR/Cas9 можно производить мультиплексное редактирование сразу нескольких целевых генов. Для этого вводится белок Cas9 и несколько разных sgRNA – «РНК-гидов». Каждый из них направляет Cas9 к собственной мишени, и вместе они обеспечивают мутации, способные комплексно

решить поставленную задачу. Первое сообщение об успешном проведении мультиплексного редактирования ячменя с использованием разработанного набора оригинальных специфических РНК-направляющих векторов сделали польские ученые. При одновременном редактировании в геноме ячменя Golden Promise трех генов (*HvCKX1*, *HvCKX3*, *Nud*), у 21% растений, прошедших модификацию, имелись мутации во всех мишенях [77].

Наблюдаемая в настоящее время быстрая эволюция методов геномного редактирования вселяет надежду, что использование CRISPR/Cas9 систем довольно скоро найдет более широкое приложение, включая не только фундаментальные исследования функционального состояния геномов или слаженной работы ансамбля генов, но и для создания улучшенных сортов сельскохозяйственных растений, включая культуру ячменя. Большая часть работ по редактированию генома ячменя, к настоящему времени выполнена на модельном сорте Golden Promise, который отличается высокой регенерационной и трансформационной способностью. Выбор сорта обусловлен тем, что успех технологий введения геном компонентов, необходимых для редактирования генома (TALENs и CRISPR/Cas9), зависит от наличия протоколов эффективной трансформации и регенерации для конкретных генотипов растений. Перспективы дальнейшего использования этих технологий для культуры ячменя требуют разработки «генотип-независимых» методов генетической трансформации и регенерации, которые составят технологическую основу для геномного редактирования.

Заключение. Несмотря на значительный прогресс в области молекулярной биологии растений и связанных с ней подходов к улучшению хозяйственно ценных признаков ячме-

ня, полученные с помощью методов геномной инженерии (транспозеза) формы и линии этой культуры до сих пор далеки от практического использования в сельском хозяйстве. Наряду с недостаточностью технологических решений для успешного перенесения и экспрессии в геноме ячменя гетерологичных последовательностей, ограничивающим фактором для коммерциализации достигнутых успехов является, как и по другим сельскохозяйственным культурам, общественное неприятие генномодифицированных растений и содержащих их продуктов на международном рынке.

Кроме придания ячменю новых хозяйственно ценных качеств, геномная инженерия имеет большое значение для развития функциональной геномики этой культуры. Генетическая модификация стала главным исследовательским инструментом для анализа и выяснения функций отдельных генов.

Успехи молекулярной генетики, наряду с транспозезом, дали значительный толчок развитию методов, объединяемых в понятие геномного редактирования, которое можно рассматривать в качестве альтернативы не только классическим методам селекции растений, но и трансгенным методам улучшения сельскохозяйственных культур. Из представленных выше материалов следует, что в ряде случаев для решения селекционных задач достаточно провести манипуляции с собственным генетическим материалом.

Анализ развития биотехнологических методов свидетельствует о том, что единственная возможность их эффективного использования лежит на пути интеграции традиционных методов и ДНК-технологий. Только системный биологический подход увеличит в значительной мере возможности дальнейшего совершенствования культуры ячменя как одного из важнейших зерновых злаков.

References

1. Борлоуг Н.Э. "Зеленая революция": вчера, сегодня и завтра // Экология и жизнь. 2001. №4. Т.1. Режим доступа: <http://www.ecolife.ru/jornal/econ/2001-4-1.shtml>.
2. Borloug N.E. "Zelenaya revolyutsiya": vchera, segodnya i zavtra. [Green revolution: yesterday, today and tomorrow]. *Ekologiya i zhizn'*. 2001. no.4. Vol. 1. URL: <http://www.ecolife.ru/jornal/econ/2001-4-1.shtml> (In Russ.).
3. Brown L. The great food crisis of 2011 // Foreign Policy. 2011. Vol. 10. pp. 1-5. Available at: http://www.earthpolicy.org/plan_b_updates/2011/update90.
4. FAO World Soil Resources Report 90. Land resource potential and constraints at regional and country levels. Rome, 2000. 122 p. URL: <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/wsr.pdf>.
5. Tilman D., Balzer C., Hill J., Befort B.L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture // PNAS. 2011. Vol. 108. no. 50. pp. 20260-20264. DOI: 10.1073/pnas.1116437108.
6. World agricultural production / United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Circular Series: December 2018. URL: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>.

6. FAOSTAT. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed: 25.01.2019).
7. GM Approval Database. URL: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. (accessed: 25.01.2019).
8. Mayer K. F. X., Waugh R., Langridge P., Close T. J., Wise R. P., Graner A., Matsumoto T., Sato K., Schulman A., Muehlbauer G. J., Stein N., Ariyadasa R., Schulte D., Poursarebani N., Zhou R., Steuernagel B., Mascher M., Scholz U., Shi B., Madishetty K., Svensson J. T., Bhat P., Moscou M., Resnik J., Hedley P., Liu H., Morris J., Frenkel Z., Korol A., Bergès H., Taudien S., Felder M., Groth M., Platzer M., Himmelbach A., Lonardi S., Duma D., Alpert M., Cordero F., Beccuti M., Ciardo G., Ma Y., Wanamaker S., Cattonaro F., Vendramin V., Scalabrin S., Radovic S., Wing R., Morgante M., Nussbaumer T., Gundlach H., Martis M., Poland J., Spannagl M., Pfeifer M., Moisy C., Tanskanen J., Zuccolo A., Russell J., Druka A., Marshall D., Bayer M., Swarbreck D., Sampath D., Ayling S., M. Febrer, Caccamo M., Tanaka T., Schmutzer T., Brown J. W. S., Fincher G. B. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome // *Nature*. 2012. Vol. 491. no. 7426. pp. 711-716. DOI: 10.1038/nature11543.
9. Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok S.O., Wicker T., Radchuk V., Dockter C., Hedley P.E., Russell J., Bayer M., Ramsay L., Liu H., Haberer G., Zhang X.Q., Zhang Q., Barrero R.A., Li L., Taudien S., Groth M., Felder M., Hastie A., Staakova H., Vrana J., Chan S., Amatrian M.M., Ounit R., Wanamaker S., Bolser D., Colmsee C., Schmutzer T., Aliyeva-Schnorr L., Grasso S., Tanskanen J., Chailyan A., Sampath D., Heavens D., Clissold L., Cao S., Chapman B., Dai F., Han Y., Li H., Li X., Lin C., McCooke J.K., Tan C., Wang P., Wang S., Yin S., Zhou G., Poland J.A., Bellgard M.I., Borisjuk L., Houben A., Doleael J., Ayling S., Lonardi S., Kersey P., Langridge P., Muehlbauer G.J., Clark M.D., Caccamo M., Schulman A.H., Mayer K.F.X., Platzer M., Close T.J., Scholz U., Hansson M., Zhang G., Braumann I., Spannagl M., Li C., Waugh R., Stein N. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome // *Nature*. 2017. Vol. 544. no. 7651. pp. 427-433. DOI: 10.1038/nature22043.
10. Mrízová K., Holasková E., Öz M. T., Jiskrová E., Frébort I., Galuszka P. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture // *Biotechnology advances*. 2014. Vol. 32. no. 1. pp. 137-157. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.011.
11. Ma S., Gong Q., Bohnert H.J. Dissecting salt stress pathways // *Journal of experimental botany*. 2006. Vol. 57. no. 5. pp. 1097-1107. DOI: 10.1093/jxb/erj098.
12. Vyroubalová Š., Šmehilová M., Galuszka P., Ohnoutková L. Genetic transformation of barley: limiting factors // *Biologia Plantarum*. 2011. Vol. 55. no. 2. pp. 213-224. DOI: 10.1007/s10535-011-0032-8.
13. Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютикова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам // *Цитология и генетика*. 2009. Т. 43. № 2. С. 72-93. Режим доступа: <http://dspace.nbuv.gov.ua/bitstream/handle/123456789/66636/10-Kolodyazhna.pdf?sequence=1>.
14. Kolodyazhnaya Ya.S., Kutsokon' N.K., Levenko B.A., Syutikova O.S., Rakhmetov D.B., Kochetov A.V. *Transgennyye rasteniya, tolerantnyye k abioticheskim stressam*. [Transgenic plants tolerant to abiotic stresses]. *Tsitologiya i genetika*. 2009. Vol. 43. no. 2. pp. 72-93. (In Russ.). URL: <http://dspace.nbuv.gov.ua/bitstream/handle/123456789/66636/10-Kolodyazhna.pdf?sequence=1>.
15. Reguera M., Peleg Z., Blumwald E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2012. Vol. 1819. no. 2. pp. 186-194. DOI:10.1016/j.bbagr.2011.08.005.
16. Баранова Е.Н., Серенко Е.К., Гулевич А.А. Генно-инженерный подход к повышению устойчивости растений к засолению: проблемы и перспективы: в кн. Проблемы агробиотехнологии / под ред. П.Н. Харченко. М.: Росинформагротех, 2012. С. 49-68.
17. Baranova E.N., Serenko E.K., Gulevich A.A. *Genno-inzhenernyy podkhod k povysheniyu ustoychivosti rasteniy k zasoleniyu: problemy i perspektivy: v kn. Problemy agrobiotekhnologii*. [Genetic engineering approach to increase of resistance to salinity in plants: problems and prospects: in book / Problems of agricultural biotechnologies]. *pod red. P.N. Kharchenko*. Moscow: *Rosinformagrotekh*, 2012. pp. 49-68. (In Russ.).
18. Delhaize E., Ryan P.R., Hebb D.M., Yamamoto Y., Sasaki T., Matsumoto H. Engineering high level aluminium tolerance in barley with the *ALMT1* gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. no. 42. pp. 15249-15254. DOI: 10.1073/pnas.0406258101
19. Delhaize E., Taylor P., Hocking P. J., Simpson R. J., Ryan P. R., Richardson A. E. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminium resistance gene (*TaALMT1*) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil // *Plant biotechnology journal*. 2009. Vol. 7. no. 5. pp. 391-400. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00403.x
20. Gruber B.D., Delhaize E., Richardson A.E., Roessner U., James R. A., Howitt S.M., Ryan P.R. Characterisation of HvALMT1 function in transgenic barley plants // *Functional Plant Biology*. 2011. Vol. 38. no. 2. pp. 163-175. DOI: 10.1071/FP10140.
21. Zhou G., Delhaize E., Zhou M., Ryan P.R. The barley MATE gene, HvAACT1, increases citrate efflux and Al³⁺ tolerance when expressed in wheat and barley // *Annals of botany*. 2013. Vol. 112. no. 3. pp. 603-612. DOI: 10.1093/aob/mct135.

20. Adem G. D., Roy S. J., Plett D. C., Zhou M., Bowman J. P., Shabala, S. Expressing AtNHX1 in barley (*Hordeum vulgare* L.) does not improve plant performance under saline conditions // Plant growth regulation. 2015. Vol. 77. no. 3. pp. 289-297. DOI: 10.1007/s10725-015-0063-9.
21. Чень Т., Михайлова Ю.В., Шишова М.Ф. Молекулярно-филогенетический анализ субъединиц H⁺-атфазы тонопласта // Экологическая генетика. 2015. Т. 13. № 4. С. 76-90. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarno-filogeneticheskiy-analiz-subedinitov-h-atfazoy-tonoplasta>.
- Chen' T., Mikhaylova Yu.V., Shishova M.F. *Molekulyarno-filogeneticheskiy analiz sub"edinitov H⁺-atfazoy tonoplasta*. [Molecular phylogenetic analysis of H⁺-ATPase subunits of tonoplast]. *Ekologicheskaya genetika*. 2015. Vol. 13. no. 4. pp. 76-90. (In Russ.). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarno-filogeneticheskiy-analiz-subedinitov-h-atfazoy-tonoplasta>.
22. Hong-Hermesdorf A., Brück A., Grüber A., Grüber G., Shumacher K. A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C // FEBS Letters. 2006. Vol. 580. pp. 932-939. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.01.018.
23. Adem G. D., Roy S. J., Huang Y., Chen, Z. H., Wang, F., Zhou M., Bowman J. P., Holford P., Shabala S. Expressing Arabidopsis thaliana V-ATPase subunit C in barley (*Hordeum vulgare*) improves plant performance under saline condition by enabling better osmotic adjustment // Functional Plant Biology. 2017. Vol. 44. no. 12. pp. 1147-1159. DOI: 10.1071/FP17133.
24. Rodriguez-Rosales M.P., Galvez F.J., Huertas R., Aranda M.N., Baghour M., Cagnac O., Venema K. Plant NHX cation/proton antiporters // Plant Signal. Behav. 2009. Vol. 4. pp. 265-276. DOI: 10.4161/psb.4.4.7919.
25. Roy S.J., Huang W., Wang X.J., Evrard A., Schmöckel S.M., Zafar Z.U., Tester M. A novel protein kinase involved in Na⁺ exclusion revealed from positional cloning // Plant, cell & environment. 2013. Vol. 36. no. 3. pp. 553-568. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02595.x.
26. Schilling R. K., Marschner P., Shavrukov Y., Berger B., Tester M., Roy S. J., Plett D. C. Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field // Plant biotechnology journal. 2014. Vol. 12. no. 3. pp. 378-386. DOI: 10.1111/pbi.12145.
27. Rae A. L., Jarmey J. M., Mudge S. R., Smith F. W. Over-expression of a high-affinity phosphate transporter in transgenic barley plants does not enhance phosphate uptake rates // Functional Plant Biology. 2004. Vol. 31. no. 2. pp. 141-148. DOI: 10.1071/FP03159.
28. Pospíšilová H., Jiskrová E., Vojta P., Mrázová K., Kokáš F., Čudejková M. M., Bergougnoux V., Plíhal O., Klimešová J., Novák O., Džurova L., Frébort I., Galuszka P. Transgenic barley overexpressing a cytokinin dehydrogenase gene shows greater tolerance to drought stress // New biotechnology. 2016. Vol. 33. no. 5. pp. 692-705. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.12.005.
29. Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrázová K., Frébort I., Galuszka P. Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants // Biotechnology advances. 2013. Vol. 31. no. 1. pp. 97-117. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.12.003.
30. Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. Silencing of the HvCKX1 gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity // Journal of Experimental Botany. 2010. Vol. 61. no. 6. pp. 1839-1851. DOI: 10.1093/jxb/erq052.
31. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis // Plant physiology. 2001. Vol. 126. no. 1. pp. 445-462. DOI: 10.1104/P.126.1.445.
32. Kreslavski V.D., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // Russian Journal of Plant Physiology. 2012. Vol. 59. no. 2. pp. 141-154. DOI: 10.1134/S1021443712020057.
33. Chen J., Liu C., Shi B., Chai Y., Han N., Zhu M., Bian H. Overexpression of HvHGGT Enhances Tocotrienol Levels and Antioxidant Activity in Barley // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2017. Vol. 65. no. 25. pp. 5181-5187. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00439.
34. Arnér E. S., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // Eur J Biochem. 2000. Vol. 267. no. 20. pp. 6102-6109. DOI:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
35. Li Q., Niu H.B., Yin J., Niu J. S., Ren J.P., Li Y., Wang X. Transgenic barley with overexpressed PTRx increases aluminum resistance in roots during germination // Journal of Zhejiang University-Science B. 2010. Vol. 11. no. 11. pp. 862-870. DOI: 10.1631/jzus.B1000048.
36. Kim Y. B., Garbisu C., Pickering I. J., Prince R. C., George G. N., Cho M. J., Wong J. H., Buchanan B. B. Thioredoxin h overexpressed in barley seeds enhances selenite resistance and uptake during germination and early seedling development // Planta. 2003. Vol. 218. pp. 186-191. DOI: 10.1007/s00425-003-1102-8.
37. Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J., Moens T., Botterman J., Van Montagu M., Inze D. Overproduction of Arabidopsis thaliana FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize // Plant Cell Physiol. 1999. Vol. 40. pp. 515-523. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029572.
38. Bhoonika K., Pyngrope S., Dubey R. S. Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar // Plant Growth Regulation. 2013. Vol. 71. pp. 235-252. DOI: 10.1007/s10725-013-9824-5.

39. Cartes P., McManus M., Wulff-Zottele C., Leung S., Gutiérrez-Moraga A., Mora M. L. Differential superoxide dismutase expression in ryegrass cultivars in response to short term aluminium stress // *Plant Soil*. 2012. Vol. 350. no. 1-2. pp. 353-363. DOI: 10.1007/s11104-011-0919-3.
40. Бакулина А.В., Широких И.Г., Лундовских И.А. Подходы к агробактериальной трансформации ячменя отечественных сортов // **ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность: матер. докл. V Всеросс. симпозиума. М., 1-4 декабря 2014. С. 33-36.**
- Bakulina A.V., Shirokikh I.G., Lundovskikh I.A. *Podkhody k agrobakterial'noy transformatsii yachmenya otechestvennykh sortov*. [Approaches to Agrobacterium-mediated transformation of domestic barley cultivars]. **TRANS-GENNYE RASTENIYA: tekhnologii sozdaniya, biologicheskie svoystva, primenenie, biobezopasnost': mater. dokl. V Vseross. simpoziuma**. [TRANSGENIC PLANTS: technologies of creation, biological properties, application, biosafety: abstracts of the 5th All-Russian. symposium]. Moscow, 1-4 dekabrya 2014. pp. 33-36 (In Russ.).
41. Nagy B., Majer P., Mihály R., Pauk, J., Horváth, G. V. Stress tolerance of transgenic barley accumulating the alfalfa aldose reductase in the cytoplasm and the chloroplast // *Phytochemistry*. 2016. Vol. 129. pp. 14-23. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.07.007.
42. Éva C., Solti Á., Oszvald M., Tömösközi-Farkas R., Nagy B., Horváth G. V., Tamás L. Improved reactive aldehyde, salt and cadmium tolerance of transgenic barley due to the expression of aldo-keto reductase genes // *Acta physiologiae plantarum*. 2016. Vol. 38. no. 4. pp. 38-99. DOI: 10.1007/s11738-016-2118-6.
43. Hirayama T., Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future // *The Plant Journal*. 2010. Vol. 61. no. 6. pp. 1041-1052. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x.
44. McGrann G.R., Steed A., Burt C., Goddard R., Lachaux C., Bansal A., Corbitt M., Gorniak K., Nicholson P., Brown J. K. M. Contribution of the drought tolerance-related Stress-responsive NAC1 transcription factor to resistance of barley to Ramularia leaf spot // *Molecular plant pathology*. 2015. Vol. 16. no. 2. pp. 201-209. DOI: 10.1111/mp.12173.
45. Al Abdallah A. M., Ayad J. Y., Elenein J. A., Al Ajlouni Z., Harwood W. A. Overexpression of the transcription factor HvSNAC1 improves drought tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Molecular breeding*. 2014. Vol. 33. no. 2. pp. 401-414. DOI: 10.1007/s11032-013-9958-1.
46. Soltész A., Smedley M., Vashegyi I., Galiba G., Harwood W., Vágújfalvi A. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance // *Journal of experimental botany*. 2013. Vol. 64. no. 7. pp. 1849-1862. DOI: 10.1093/jxb/ert050.
47. Soltész A., Vágújfalvi A., Rizza F., Kerepesi I., Galiba G., Cattivelli L., Coraggio I., Crosatti C. The rice Osmyb4 gene enhances tolerance to frost and improves germination under unfavourable conditions in transgenic barley plants // *Journal of applied genetics*. 2012. Vol. 53. no. 2. pp. 133-143. DOI: 10.1007/s13353-011-0081-x.
48. Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge, Lopato S. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors // *Plant biotechnology journal*. 2011. Vol. 9. no. 2. pp. 230-249. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x.
49. Zhao T., Liang D., Wang P., Liu J., Ma F. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in Malus under abiotic stress // *Molecular genetics and genomics*. 2012. Vol. 287. no. 5. pp. 423-436. DOI: 10.1007/s00438-012-0687-7.
50. Kovalchuk N., Jia W., Eini O., Morran S., Pyvovarenko T., Fletcher S., Bazanova N., Harris J., Beck-Oldach K., Shavrukov Y., Langridge P., Lopato S. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters // *Plant Biotechnology Journal*. 2013. Vol. 11. no. 6. pp. 659-670. DOI: 10.1111/pbi.12056.
51. Koroban N.V., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Sadritdinova A.F., Fedorova M.S., Snezhkina A.V., Bolsheva N.L., Muravenko O.V., Dmitriev A.A., Melnikova N.V. The role of microRNA in abiotic stress response in plants *Molecular Biology*. 2016. Vol. 50. no. 3. pp. 337-343. DOI: 10.7868/S0026898416020105.
52. Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants // *Annu Rev Plant Biol*. 2006. Vol. 57. pp. 19-53. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218.
53. Pacak A., Kruszka K., Swida-Barteczka A., Karlowski W., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z. The microRNA-guided regulation of tillering in barley // *BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. 2015. Vol. 96. no. 1. P. 42.
54. Budak H., Kantar M., Bulut R., Akpinar B. A. Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals // *Plant Sci*. 2015. Vol. 235. pp. 1-13. URL: http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-33b7210c-9ecb-4ffc-94fe-f1a0e9421185/c/BTA_Art_25769-10_39-153.pdf.
55. Liu H. H., Tian X., Li Y. J., Wu C. A., Zheng C. C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* // *RNA*. 2008. Vol. 14. pp. 836-843. URL: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.895308>.
56. Ferdous J., Whitford R., Nguyen M., Brien C., Langridge P., Tricker, P. J. Drought-inducible expression of Hv-miR827 enhances drought tolerance in transgenic barley // *Functional & integrative genomics*. 2017. Vol. 17. no. 2-3. pp. 279-292. DOI: 10.1007/s10142-016-0526-8.
57. Bai B., Bian H., Zeng Z., Hou N., Shi B., Wang J., Han N. miR393-mediated auxin signaling regulation is involved in root elongation inhibition in response to toxic aluminum stress in barley // *Plant and Cell Physiology*. 2017. Vol. 58. no. 3. pp. 426-439. DOI: 10.1093/pcp/pcw211.

58. Zhou H., Hussain S.S., Hackenberg M., Bazanova N., Eini O., Li J., Gustafson P., Shi B. Identification and characterisation of a previously unknown drought tolerance-associated micro RNA in barley. *The Plant Journal*, 2018. Vol. 95. pp. 138-149. DOI: 10.1111/tbj.13938.
59. Дейнеко Е.В. Генетическая инженерия растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. №1. С. 125-137. Режим доступа: <https://vavilov.elpub.ru/index.php/jour/article/download/233/235>.
- Deyneko E.V. *Geneticheskaya inzheneriya rasteniy*. [Genetic engineering of plants]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2014. Vol. 18. no. 1. pp. 125-137. (In Russ.). URL: <https://vavilov.elpub.ru/index.php/jour/article/download/233/235>
60. Рябушкина Н.А., Галиакбаров Н.Н. Молчание генов в растениях. Как это явление можно использовать в биоинженерии // Биотехнология. Теория и практика. 2009. №1. С. 15-31.
- Ryabushkina N.A., Galiakbarov N.N. *Molchanie genov v rasteniyakh. Kak eto yavlenie mozhno ispol'zovat' v bioinzhenerii*. [Silence of genes in plants. How this phenomenon can be used in bioengineering]. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*. 2009. no.1. pp. 15-31. (In Russ.).
61. Lee H., Rustgi S., Kumar N., Burke I., Yenish J. P., Gill K. S., von Wettstein D., Ullrich S. E. Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108. pp. 8909-8913. DOI: 10.1073/pnas.1105612108.
62. Horvath M., Steinbiss H.H., Reiss B. Gene Targeting Without DSB Induction Is Inefficient in Barley // *Frontiers in plant science*. 2017. Vol. 7: 1973. DOI: 10.3389/fpls.2016.01973
63. Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментальный для редактирования генома растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 1. С. 104-111. DOI: 10.18699/VJ17.228.
- Zlobin N.E., Ternovoy V.V., Grebenkina N.A., Taranov V.V. *Sdelat' slozhnoe proshche: sovremennyy instrumentariy dlya redaktirovaniya genoma rasteniy*. [Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2017. Vol. 21. no. 1. pp. 104-111. (In Russ.). DOI: 10.18699/VJ17.228.
64. Wendt T., Holm P. B., Starker C. G., Christian M., Voytas D. F., Brinch-Pedersen H., Holme I. B. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants // *Plant molecular biology*. 2013. Vol. 83. no. 3. pp. 279-285. DOI: 10.1007/s11103-013-0078-4.
65. Gurushidze M., Hensel G., Hiekel S., Schedel S., Valkov V., Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. no. 2. 3. e92046. DOI: 10.1371/journal.pone.0092046.
66. Budhagatapalli N., Rutten T., Gurushidze M., Kumlehn J., Hensel G. Targeted modification of gene function exploiting homology-directed repair of TALEN-mediated double-strand breaks in barley // *Genes, Genomes, Genetics*. 2015. V. 5. no. 9. pp. 1857-1863. DOI: 10.1534/g3.115.018762.
67. Watanabe K., Breier U., Hensel G., Kumlehn J., Schubert I., Reiss B. Stable gene replacement in barley by targeted double-strand break induction // *Journal of experimental botany*. 2015. Vol. 67. no. 5. pp. 1433-1445. DOI: 10.1093/jxb/erv537.
68. Короткова А. М., Герасимова С. В., Шумный В. К., Хлесткина Е. К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 2. С. 250-258. DOI: 10.18699/VJ17.244.
- Korotkova A. M., Gerasimova S. V., Shumnyy V. K., Khlestkina E. K. *Geny sel'skokhozyaystvennykh rasteniy, modifitsirovannye s pomoshch'yu sistemy CRISPR/Cas*. [Crop genes modified using CRISPR/Cas system]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2017. Vol. 21. no. 2. pp. 250-258. (In Russ.). DOI: 10.18699/VJ17.244
69. Власов В.В., Медведев С.П., Закиян С.М. «Редакторы» геномов. От цинковых пальцев до CRISPR // *Наука из первых рук*. 2014. Т. 56. № 2. С. 44-53. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/redaktory-genomov-ot-tsinkovykh-paltsev-do-crispr>.
- Vlasov V.V., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. *«Redaktory» genomov. Ot tsinkovykh pal'tsev do CRISPR*. ["Editors" of genomes. From zinc fingers to CRISPR]. *Nauka iz pervykh ruk*. 2014. Vol. 56. no. 2. pp. 44-53. (In Russ.). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/redaktory-genomov-ot-tsinkovykh-paltsev-do-crispr>.
70. Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Ostergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease // *Genome biology*. 2015. Vol. 16. no. 1. pp. 258. DOI: 10.1186/s13059-015-0826-7.
71. Полонский В.И., Сумина А.В. Содержание β-глюканов в зерне как перспективный признак при селекции ячменя на пищевое использование (обзор иностранной литературы) // *Сельскохозяйственная биология*. 2013. №5. С. 30-43. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/soderzhanie-glyukanov-v-zerne-kak-perspektivnyy-priznak-pri-selekcii-yachmenya-na-pischevoe-ispolzovanie-obzor-inostrannoy-literatury>.
- Polonskiy V.I., Sumina A.V. *Soderzhanie β-glyukanov v zerne kak perspektivnyy priznak pri selekcii yachmenya na pischevoe ispol'zovanie (obzor inostrannoy literatury)*. [β-glucans content as a perspective trait in the barley breeding for foodstuff use (review)]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2013. no. 5. pp. 30-43. (In Russ.). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/soderzhanie-glyukanov-v-zerne-kak-perspektivnyy-priznak-pri-selekcii-yachmenya-na-pischevoe-ispolzovanie-obzor-inostrannoy-literatury>

72. Kapusi E., Corcuera-Gómez M., Melnik S., Stoger E. Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley // *Frontiers in plant science*. 2017. Vol. 8. Art. 540. pp.1-11. DOI: 10.3389/fpls.2017.00540.

73. Holme I.B., Dionisio G., Madsen C.K., Brinch-Pedersen H. Barley *HvPAPhy_a* as transgene provides high and stable phytase activities in mature barley straw and in grains // *Plant Biotechnol J*. 2017. Vol. 15. pp. 415-422. DOI: 10.1111/pbi.12636.

74. Holme I.B., Wendt T., Gil-Humanes J., Deleuran L. C., Starker C. G., Voytas D. F., Brinch-Pedersen H. Evaluation of the mature grain phytase candidate *HvPAPhy_a* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs // *Plant Molecular Biology*. 2017. Vol. 95. no. 1-2. pp. 111-121. DOI: 10.1007/s11103-017-0640-6.

75. Gerasimova S.V., Korotkova A. M., Hertig C., Hiekel S., Hoffie R., Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable sibirian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018. Vol. 22(8). pp. 1033-1039. DOI: 10.18699/VJ18.447.

76. Kis A., Hamar É., Tholt G., Bán R., Havelda Z. Creating highly efficient resistance against Wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal*. 2019. pp. 1-4. DOI: 10.1111/pbi.13077.

77. Gasparis S., Kała M., Przyborowski M., Łyżnik L. A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant methods*. 2018. Vol. 14(1). P. 111. DOI: 10.1186/s13007-018-0382-8.

Поступила: 08.02.2019

Принята к публикации: 11.02.2019

Сведения об авторах:

Бакулина Анна Владимировна, кандидат биол. наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФГБНУ "Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого", ул. Ленина, д. 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5171-2476>**, e-mail: drugaeann1@rambler.ru

Широких Ирина Геннадьевна, доктор биол. наук, зав. лабораторией биотехнологии растений и микроорганизмов ФГБНУ "Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого", ул. Ленина, д. 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3319-2729>**, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru

Received: 08.02.2019

Accepted for publication: 11.02.2019

Information about the authors:

Anna V. Bakulina, PhD in Biological Sciences, researcher of the laboratory of biotechnologies of plants and microorganisms Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Lenina str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5171-2476>**, e-mail: drugaeann1@rambler.ru

Irene G. Shirokikh, Doctor of Biological Sciences, Head of the laboratory of biotechnologies of plants and microorganisms Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Lenina str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, **ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3319-2729>**, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru