

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ПШЕНИЦЫ, ЯЧМЕНЯ И КУКУРУЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

Стрыгина К.В.^{1*}, Хлесткина Е.К.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ *k.strygina@vir.nw.ru

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

Точное редактирование генов растительных организмов, обладающих сложными геномами, долгое время оставалось трудной задачей. Технология CRISPR/Cas, разработанная в последнее десятилетие, стала одним из наиболее предпочтительных инструментов для сайт-направленного мутагенеза генов растений и быстро заменила системы ZFN и TALEN. Однако, несмотря на то, что система CRISPR/Cas показала себя как эффективный инструмент модификации генома диплоидных видов, её применение для таких организмов, как злаки, обладающих сложными и, в случае мягкой пшеницы, полиплоидными геномами, осложняется рядом препятствий. В данном обзоре собраны основные результаты, полученные при использовании системы CRISPR/Cas на хозяйственно ценных злаках – мягкой пшенице *Triticum aestivum* L., ячмене *Hordeum vulgare* L. и кукурузе *Zea mays* L., структура генома которых увеличивает вероятность появления нецелевых мутаций и снижает специфичность редактирования. С каждым годом количество методических публикаций по направленному мутагенезу данных культур, нацеленных на оптимизацию и улучшение работы системы CRISPR/Cas, экспоненциально увеличивается, а эффективность редактирования достигает 100% для кукурузы и ячменя. Экспериментальные статьи, главным образом, направлены на улучшение хозяйственно ценных признаков растений, таких как повышение урожайности, питательной ценности и появление устойчивости к заболеваниям и гербицидам. Улучшение растений также связано с редактированием генов, влияющих на контроль опыления, который используется в гибридной селекции. Это создаёт предпосылки к созданию новых селекционных форм и к насыщению уже имеющихся сортов кукурузы, ячменя и пшеницы необходимыми свойствами.

Ключевые слова: геномное редактирование, *Hordeum*, *Triticum*, *Zea*, качество зерна, мужская стерильность, направленный мутагенез, период покоя семян, повышение урожайности, устойчивость к болезням.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы/The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны/Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-o2>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы/The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

**Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript
Конфликт интересов отсутствует/No conflict of interest**

WHEAT, BARLEY AND MAIZE GENES EDITING USING THE CRISPR/Cas SYSTEM

Strygina K. V.^{1*}, Khlestkina E. K.^{1,2}

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;

✉ *k.strygina@vir.nw.ru

² Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Acad. Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia.

Precise editing of the genes of plant organisms with complex genomes has long been a difficult task. The CRISPR/Cas technology developed in the last decade has become one of the preferred tools for site-directed mutagenesis of plant genes and has quickly replaced the ZFN and TALEN systems. However, while the CRISPR/Cas system has proven to be an effective tool for modifying the genome of diploid species, its application to organisms such as cereals with complex and, in the case of common wheat, polyploid genomes is complicated by a number of obstacles. This review summarizes the main results obtained using the CRISPR/Cas system in such economically valuable cereals as common wheat *Triticum aestivum* L., barley *Hordeum vulgare* L., and maize *Zea mays* L., the genome structure of which increases the probability of the emergence of non-target mutations and reduces the specificity of editing. Every year the number of methodological publications on the directed mutagenesis of these crops, aimed at optimizing and improving the performance of the CRISPR/Cas system, increases exponentially, and the editing efficiency reaches 100% for maize and barley. The experimental articles are mainly aimed at improving the economically important traits of plants, such as improved yields, nutritional value and resistance to diseases and herbicides. Plant improvement is also associated with editing genes that affect pollination control, which is used in hybrid breeding. This creates the prerequisites for the creation of new maize, barley and wheat varieties, and for the saturation of existing ones with the necessary properties.

Key words: genome editing, *Hordeum*, *Triticum*, *Zea*, grain quality, male sterility, targeted mutagenesis, seed dormancy, yield increase, disease resistance.

Для цитирования: Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Редактирование генов пшеницы, ячменя и кукурузы с использованием системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):46-56. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o2

For citation: Strygina K. V., Khlestkina E. K. Wheat, barley and maize genes editing using the CRISPR/Cas system. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):46-56. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o2

ORCID:

Strygina K. V. <https://orcid.org/0000-0001-6938-1348>

Khlestkina E. K. <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

УДК 575.852:577.214

Поступила в редакцию: 25.03.2020

Принята к публикации: 24.04.2020

Введение

Путь создания новых высокоурожайных, адаптированных к определённым условиям окружающей среды сортов культурных растений предполагает сочетание в одном генотипе нужных аллельных вариантов хозяйственно ценных признаков для конкретной зоны возделывания данной культуры. В основе этого трудоёмкого, многостадийного и длительного процесса лежит использование естественных механизмов клетки, связанных с рекомбинацией гомологичных хромосом, а также искусственный отбор (Becker, 1993; Khlestkina, Shumny, 2016). Начиная с 1950-х гг. в селекции стали активно применяться методы мутагенеза при использовании химических мутагенов и ионизирующего излучения, что позволяло индуцировать случайные мутации, и среди множества растений с изменённым генотипом отбирать растения, превосходящие исходный сорт по тому или иному признаку. Полученные мутанты использовали в качестве исходного материала для селекции. Так, например, был получен сорт пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L., посевами которого в своё время было занято несколько млн. га, – Новосибирская-67, высокоурожайный сорт с отличными хлебопекарными свойствами (Cherny et al., 1975). Другим примером являются высокоурожайные и короткостебельные сорта ячменя Diamant и Golden Promise, которые внесли очень большой вклад в Европейское сельское хозяйство и активно использовались в селекции во всём мире.

Секвенирование геномов культурных растений в последние два десятилетия, идентификация и описание первичной структуры генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, открыло возможность применения сайт-направленного мутагенеза – то есть позволило в отличие от случайного мутагенеза действовать с «ювелирной» точностью и вносить различные заданные изменения в геном от внесения длинной последовательности ДНК чужеродного происхождения вплоть до замены или удаления одного нуклеотида в конкретной позиции генома. Такого результата позволяют достичь технологии генетического редактирования, результат их применения – создание генотипов, которые приобрели новые свойства или избавлены от нежелательных признаков (Korotkova et al., 2017, 2019).

Первые системы генетического редактирования основаны на использовании нуклеаз с цинковыми пальцами (zinc finger nucleases, ZFN) и эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (transcription activator-like effector nuclease, TALEN).

Данные нуклеазы состоят из специфичных для нуклеотидной последовательности модулей связывания ДНК, соединённых с неспецифическим модулем расщепления ДНК, создающим двуцепочечные разрывы в сайтах-мишенях, которые восстанавливаются посредством работы естественных систем репарации клетки (Gaj et al., 2013; Shan et al., 2014; Ali et al., 2015; Belhaj et al., 2015; Bortesi,

Fischer, 2015). Использование систем ZFN и TALEN требует применения методов белковой инженерии. На смену этим трудоёмким и дорогостоящим подходами в 2013 году пришла система CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein), которая отличается большей доступностью, а по точности и эффективности не уступает предыдущим системам (Upadhyay et al., 2013; Doudna, Charpentier, 2014; Belhaj et al., 2015; Jaganathan et al., 2018). Основу данной системы составляют направляющая РНК (нРНК, состоящая примерно из 20 нуклеотидов, комплементарных последовательности в целевом гене), которая связывается с ДНК-мишенью, и нуклеаза Cas, которая расщепляет ДНК в позиции, следующей после мотива PAM (protospacer adjacent motif, PAM; обычно 5'NGG) (Pis. 1) (Jinek et al., 2012).

После того, как система CRISPR/Cas вносит двуцепочечный разрыв, происходит репарация по механизму негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) или гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR). Во время репарации путём NHEJ может возникнуть потеря небольшого участка ДНК, что может привести к сдвигу рамки считывания; при HDR возможна вставка участка ДНК, гомологичного на концах участку, содержащему двуцепочечный разрыв. Таким образом, система CRISPR/Cas представляет универсальный инструмент для редактирования генома, с которым возможно изменить последовательность целевого гена или добавить в геном организма новую последовательность; при этом система может быть нацелена как на один, так и на несколько генов (Doudna, Charpentier, 2014; Belhaj et al., 2015; Gerasimova et al., 2017).

Первые применения системы CRISPR/Cas на однодольных и двудольных растениях были описаны в 2013 году (Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013). Наследование индуцированных мутаций впервые было продемонстрировано на арабидопсисе *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и рисе *Oryza sativa* L. (Feng et al., 2014; Zhang et al., 2014; Zhou et al., 2014).

Но несмотря на то, что редактирование генома через систему CRISPR/Cas имеет значительные преимущества, есть ряд факторов, которые могут на настоящем этапе развития этой технологии затруднять применение системы для некоторых видов растений. Хозяйственно ценные культуры, таких как злаки (семейство Poaceae), обладают сложными, часто полиплоидными геномами. Такая структура генома и в особенности наличие многократных копий «похожих» генов увеличивает вероятность нецелевых мутаций и снижает специфичность редактирования (Peng et al., 2016; Kim et al., 2018).

Среди всех возделываемых культур наиболее масштабное применение технологии CRISPR/Cas наблюдается на модельном злаке рисе *O. sativa* ($2n = 24$) (Khlestkina, 2019). Рис обладает диплоидным геномом размером около 0,5 Gb, что делает его компактным по сравне-

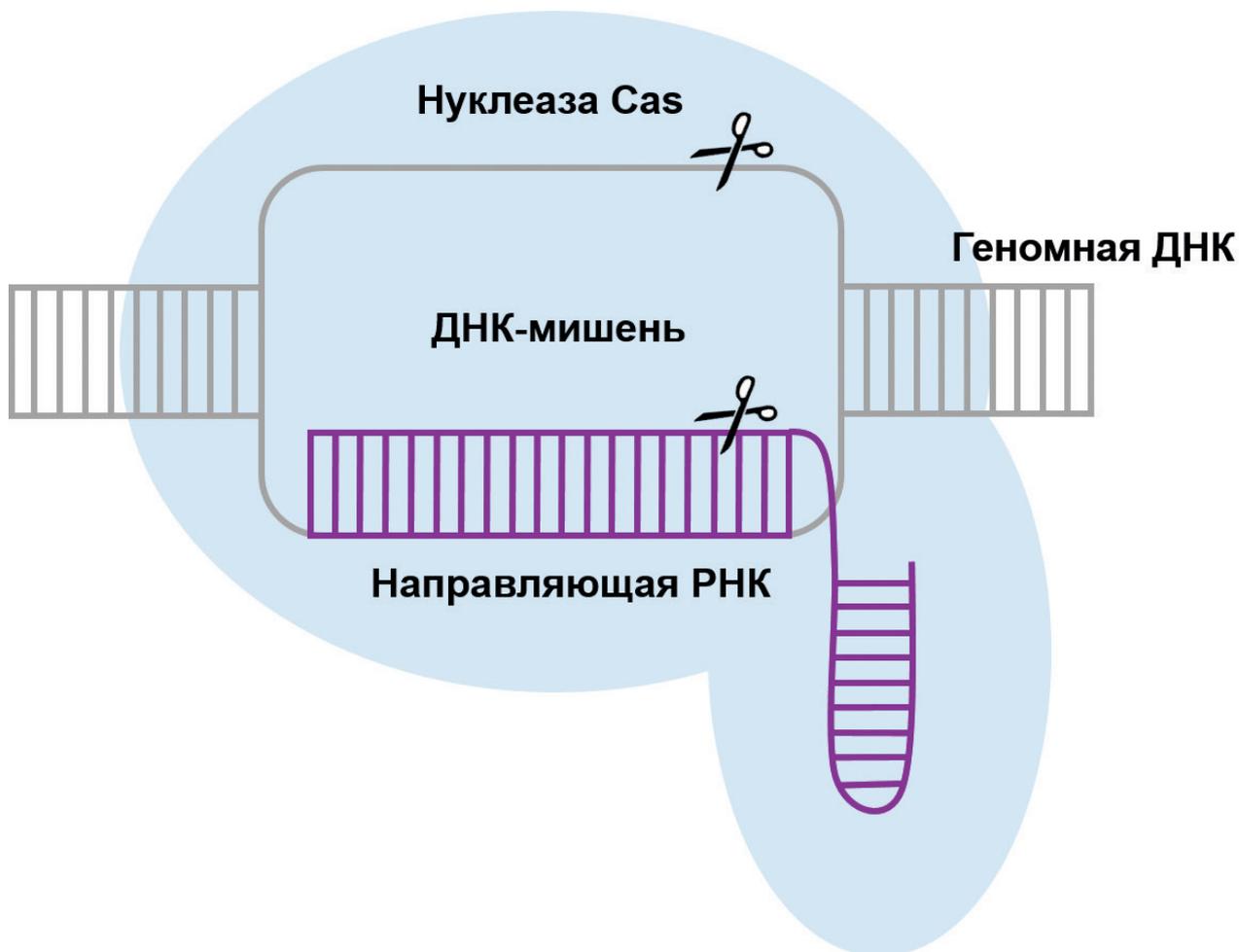


Рис. 1. Система CRISPR/Cas. Серым цветом обозначена геномная ДНК, голубым – нуклеаза Cas, фиолетовым – направляющая РНК. Пояснения даны в тексте.

Fig. 1. CRISPR/Cas system. Genomic DNA is indicated in gray, Cas nuclease in blue, guide RNA in purple. Explanations are given in the text.

нию с крупными геномами других модельных злаков: кукурузы *Zea mays* L. (2,4 Gb, $2n = 40$), мягкой пшеницы *T. aestivum* (17 Gb, $2n = 6x = 42$) и ячменя *Hordeum vulgare* L. (5 Gb, $2n = 14$). Помимо этого, геном пшеницы *T. aestivum* характеризуется сложной аллогексаплоидной структурой, состоящей из трёх разных субгеномов А, В и D. Каждый субгеном эквивалентен геному диплоидного растения, редактирование которого может привести к гомозиготным, гетерозиготным или химерным мутантам (Zhang et al., 2019b).

Но несмотря на это, на ячмене, пшенице и кукурузе было продемонстрировано успешное применение системы CRISPR/Cas (Upadhyay et al., 2013; Xing et al., 2014; Lawrenson et al., 2015). К настоящему моменту количе-

ство экспериментальных и методических публикаций по геномному редактированию данных культур с использованием CRISPR/Cas с каждым годом экспоненциально увеличивается (Рис. 2, Таблица), а эффективность редактирования кукурузы и ячменя достигает очень высоких частот – мутации обнаруживаются почти у 100% редактированных растений (Feng et al., 2016; Zhu et al., 2016; Gasparis et al., 2018; Kumar et al., 2018; Lee et al., 2019; Malzahn et al., 2019). Напротив, эффективность генетического редактирования пшеницы намного ниже и достигает в лучшем случае чуть более 50% (Zhang et al., 2018). Это делает гексаплоидный геном пшеницы важным объектом для оптимизации системы редактирования генома.

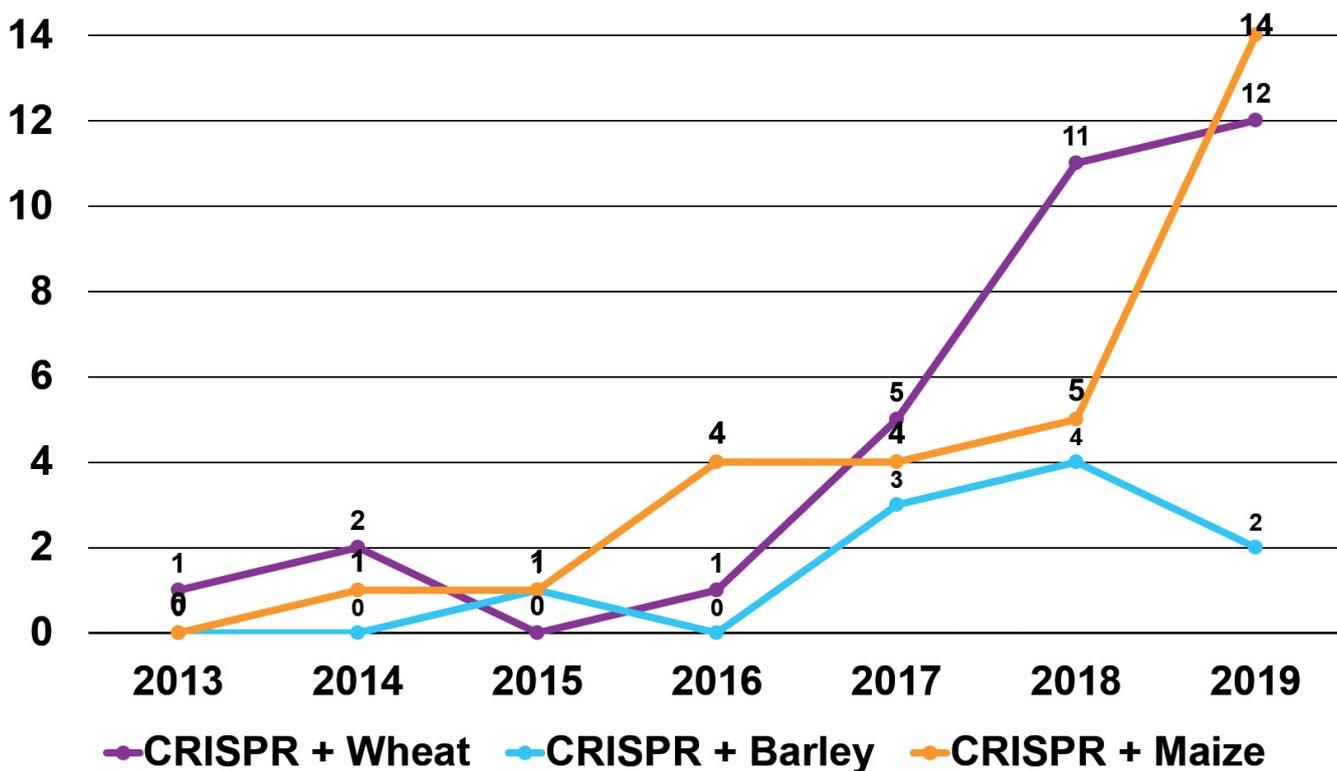


Рис. 2. Число экспериментальных работ, связанных с применением технологии CRISPR/Cas для редактирования генов кукурузы, ячменя и пшеницы, на основе публикаций, обнаруженных в базе данных Scopus (www.scopus.com, дата обращения 09.12.2019) посредством поиска по сочетанию терминов CRISPR + Maize, CRISPR + Barley и CRISPR + Wheat, соответственно, и дальнейшего анализа публикаций в ручном режиме.

Fig. 2. The number of experimental works related to the application of CRISPR/Cas technology for genes editing in maize, barley and wheat, based on publications identified in the Scopus database (www.scopus.com, accessed December 9, 2019) by search using combinations of terms CRISPR + Maize, CRISPR + Barley and CRISPR + Wheat, respectively, and subsequent analysis of publications in manual mode.

Разработка и оптимизация системы редактирования генома CRISPR/Cas для злаковых растений

Среди рассматриваемых культур впервые возможность использования системы редактирования генов CRISPR/Cas была продемонстрирована на пшенице *T. aestivum* (Uradhyau et al., 2013). В результате, использование суспензионной культуры клеток пшеницы позволило выявить мутации в 18–22% случаев для разных протоспейсеров генов *INOX* и *PDS*. Данная работа впервые показала, что система CRISPR/Cas может успешно применяться для редактирования очень больших геномов растений.

Первая работа, где был разработан набор векторов для трансформации однодольных растений на при-

мере кукурузы (ген *HKT1*), появилась в 2014 году (Xing et al., 2014), а возможность использования системы CRISPR/Cas на ячмене была продемонстрирована только в 2015 году (Lawrenson et al., 2015). В работе Lawrenson et al. (2015) был осуществлён нокаут гена *PM19*, который в пшенице действует как позитивный регулятор покоя зерна (Barrero et al., 2015), и нецелевой нокаут его высокогомолочных копий, произошедший несмотря на наличие по крайней мере одного несоответствия между направляющей РНК и последовательностью нецелевого гена. Описанные в работе нецелевые мутации стали рассматриваться как возможности для редактирования семейств генов у сельскохозяйственных культур (Lawrenson et al., 2015).

Последующие работы по редактированию геномов пшеницы, ячменя и кукурузы в основном были нацелены на улучшение и оптимизацию системы для редак-

Таблица. Перечень генов кукурузы *Zea mays* L., пшеницы *Triticum aestivum* L. и ячменя *Hordeum vulgare* L., нокаутированных с помощью системы CRISPR/Cas.

Table. A list of the genes of maize *Zea mays* L., wheat *Triticum aestivum* L., and barley *Hordeum vulgare* L. knocked out using the CRISPR/Cas system.

Вид	Ген	Функция гена	Фенотип после нокаутирования	Источник	
<i>Zea mays</i> L.	<i>a1, a4</i>	Биосинтез антоцианов	Отсутствие антоциановой пигментации	(Char et al., 2017)	
	<i>GRP1</i>	Регуляция сплайсинга	Изменение сплайсинга многочисленных генов	(Chen et al., 2018a)	
	<i>CST1</i>	Транспорт глюкозы	Снижение олигомеризации и транспортной активности глюкозы	(Wang et al., 2019b)	
	<i>DEK42</i>	Регуляция сплайсинга генов во время развития зерна	Нарушение экспрессии генов развития зерна	(Zuo et al., 2019)	
	<i>PIF5</i>	Регуляция световой сигнализации и морфогенеза	Подавленное удлинение мезокотила у выращенных в темноте растений	(Wu et al., 2019)	
	<i>Br2</i>	Транспорт ауксина	Полукарликовый фенотип	(Bage et al., 2020)	
	<i>EDR1</i>	Чувствительность к мучнистой росе	Устойчивость к мучнистой росе	(Zhang et al., 2017)	
	<i>GW2</i>	Негативная регуляция размера и веса зерна	Увеличения размера и веса зерна	(Wang et al., 2018)	
	<i>Ms1</i>	Мужская фертильность	Ядерная мужская стерильность	(Okada et al., 2019)	
	<i>Ms45</i>	Мужская фертильность	Ядерная мужская стерильность	(Singh et al., 2018)	
<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>PDS</i>	Биосинтез каротиноидов	Обесцвечивание	(Howells et al., 2018)	
	<i>PAPHy_a</i>	Созревание зерна	Низкий уровень фитазной активности зерна; замедленное прорастание	(Holme et al., 2017)	
	<i>Nud</i>	Образование плёнки зерна	Голозёрный тип	(Gasparis et al., 2018; Gerasi-mova et al., 2018)	
	<i>PTST1</i>	Накопление крахмала в зерновке	Отсутствие крахмала в зерновке	(Zhong et al., 2019)	
	<i>GBSSI</i>	Синтез крахмала в зерновке	Накопление амилопектина	(Zhong et al., 2019)	
	<i>MORCI</i>	Стабилизация генома	Дерепрессия мобильных генетических элементов	(Kumar et al., 2018)	
	<i>Hordeum vul-gare</i> L.				

рования генов, а также одновременного редактирования копий генов (Shan et al., 2014; Svitashv et al., 2015, 2016; Qi et al., 2016; Zhang et al., 2016, 2019b, 2019a; Zhu et al., 2016; Čermák et al., 2017; Kapusi et al., 2017; Liang et al., 2017, 2018; Wolter et al., 2017; Gil-Humanes et al., 2017; Rey et al., 2018; Feng et al., 2018; Gasparis et al., 2018; Hamada et al., 2018; Cui et al., 2019; Kumar et al., 2019; Doll et al., 2019; Young et al., 2019; Gao et al., 2019; Hayta et al., 2019; Hu et al., 2019).

Были продемонстрированы возможности редактирования одного основания ДНК – замены цитозина на тимин – без необходимости вставки чужеродной ДНК или разрыва двойной цепи ДНК; а также изменения аденина на гуанин при использовании аденозиндеаминазы, соединённой с никазой (Zong et al., 2017; Li et al., 2018). Также было показано, что гетерохроматин не влияет на эффективность редактирования при помощи системы CRISPR/Cas (Feng et al., 2016). Не влияет на эффективность редактирования и степень метилирования редактируемого участка ДНК, что также составляет преимущество данной системы (Hsu et al., 2013).

Позже, применение системы CRISPR/Cas в сочетании с технологией одноклеточных микроспор позволило разработать оптимизированную систему мутагенеза гаплоидных растений для индукции генетических модификаций в геноме пшеницы (Bhowmik et al., 2018). За счёт дальнейшего удвоения наборов хромосом гаплоидов можно сразу получить мутации в гомозиготе.

Схожая работа была проведена спустя год для кукурузы (Wang et al., 2019). Однако в этом случае для получения гаплоидов использовали метод применения гаплоиндуктора. Такой сочетанный метод был назван гаплоиндуктор-опосредованное геномное редактирование (haploid-inducer mediated genome editing, IMGE). Достоинство этого метода заключалось не только в возможности быстрого получения мутантов в гомозиготе, но и в том, что редактирующая система закладывается в специальную линию-гаплоиндуктор, а изменения проводятся в опыляемой элитной инбредной линии. Таким образом, в первом же поколении получают модифицированную нетрансгенную линию (гомозиготные двойные гаплоидные линии с целевым признаком могут быть получены уже в течение двух поколений, многократно ускоряя процедуру выведения сортов с улучшенными признаками; Wang et al., 2019). Кроме того, этот метод позволяет избежать проблем с генотипически обусловленным снижением способности к трансформации и регенерации. Достаточно в качестве гаплоиндуктора выбрать генотип, не связанный с этими проблемами. Метод IMGE может найти более широкое применение. Известно, что гаплоиндукторами пшеницы также могут являться линии кукурузы, следовательно, можно с его помощью повысить эффективность редактирования пшеницы. Кроме того, можно с помощью этого метода решать не только генотип-, но и видозависимые проблемы с трансформацией и регенерацией.

Несмотря на то, что на пути к широкому применению системы CRISPR/Cas для улучшения возделываемых культур ещё предстоит решить ряд технологических задач, сегодня уже наблюдаются яркие примеры, связанные с улучшением генотипов зерновых культур, определяющих широкий спектр хозяйственно-ценных признаков.

Питательная ценность зерна

Возможное улучшение питательной ценности зерна впервые было показано на кукурузе (Liang et al., 2014). Фитиновая кислота (инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат), присутствующая в большом количестве в зерновках кукурузы, является антинутриентом, поскольку она не может перевариваться животными с однокамерным желудком и может вызывать загрязнение окружающей среды. Таким образом, снижение содержания фитиновой кислоты в зерновках кукурузы – это важная задача. В данной работе в качестве мишени был нокаутирован ген *ZmIPK*, кодирующий фермент, который катализируют один из этапов биосинтеза фитиновой кислоты, благодаря чему синтез данного соединения должен быть блокирован у мутантной линии.

Изменение соотношения разных типов полимерных молекул (амилоза и амилопектин) в составе крахмала зерновки кукурузы было достигнуто благодаря редактированию гена *Wx1* (Qi et al., 2018). После его модификации у рецессивных гомозигот-мутантов *wx1/wx1* амилоза в зерновках растений T₀ практически не обнаруживалась.

Изменение содержания и состава глютена в зерновках пшеницы также является актуальной задачей в виду распространения целиакии, связанной с непереносимостью некоторых белковых компонентов зерновки пшеницы. Запасные белки зерна отвечают за уникальные вязкие и упругие свойства продуктов, полученных из пшеницы; однако, некоторые из них вызывают патологии у восприимчивых людей. Среди них семейство α -глиадинов является основной группой белков, определяющих чувствительность к глютену и развитие целиакии (Sapone et al., 2011). На сегодняшний день вышли две работы, нацеленные на снижение содержания аллергенов в зерне пшеницы при помощи генетического редактирования (Sánchez-León et al., 2018; Jouanin et al., 2019). Группа Sánchez-León разработала нРНК, нацеленные на консервативную область генов синтеза α -глиадина. В результате была получена двадцать одна мутантная линия, все из которых демонстрируют сильное снижение содержания α -глиадинов (Sánchez-León et al., 2018). Группа Jouanin разработала нРНК, нацеленные на специфические сайты семейств генов α -глиадина и γ -глиадина, трансформировала сорт пшеницы Fielder и выявила изменения в сравнении с мутантными линиями сорта Paragon и эталонным сортом пшеницы Chinse Spring (Jouanin et al., 2019). Полученные в данных исследованиях линии пшениц

могут использоваться для производства пищевых продуктов с низким содержанием глютена и служить исходным материалом для получения элитных сортов пшеницы. Однако ещё предстоит исследовать, какого качества хлеб может быть получен из этих сортов пшеницы.

Повышение урожайности

Возможность сохранения урожайности в условиях стресса за счёт изменения гена *ARGOS8* была показана на кукурузе (Shi et al., 2017). Ген *ARGOS8* является негативным регулятором этиленового ответа. Растения, обладающие избыточной экспрессией *ARGOS8*, имеют пониженную чувствительность к этилену и стабильный урожай в условиях стресса, вызванного засухой. В работе Shi et al. (2017) при использовании технологии CRISPR/Cas нативный промотор *ARGOS8* был заменён на промотор гена *GOS2* кукурузы. В результате уровень экспрессии гена *ARGOS8* был выше аллеля дикого типа, а полевые исследования показали, что растения с отредактированным *ARGOS8* имели более высокий урожай в сравнении с оригинальными растениями в условиях стресса и не несли потери урожая в условиях оптимального водного режима (Shi et al., 2017).

Для ячменя удалось добиться повышения продуктивности растения на 15% путём нокаута гена цитокининдегидрогеназы *CKX1* (Holubová et al., 2018). Однако, хотя растения произвели больше побегов и зёрен, общая биомасса зерна снизилась до 80%. Это свидетельствует о том, что локальное накопление цитокининов негативно влияет на поток питательных веществ, что приводит к снижению биомассы зерна.

Увеличения размеров зерновки и показателя масса тысячи зёрен у сортов пшеницы Bobwhite и Paragon удалось достичь при внесении нонсенс-мутаций в гомеологичные копии генов *GW2*, которые являются негативными регуляторами данных признаков (Wang et al., 2018). Растения, несущие один отредактированный ген, показали разные уровни увеличения данных признаков, причём масса тысячи зёрен увеличивалась в среднем на 5,5%. Двойные мутанты имели в среднем на 12,1% выше массу тысячи зёрен по отношению к линиям дикого типа, а тройные мутанты имели массу тысячи зёрен выше на 16,3% (Wang et al., 2018). Эти результаты указывают на то, что варибельность размера и массы зерна может модулироваться дозой гомеологичных генов.

В работе Wang et al. (2019) удалось изменить размер и вес зерновки пшеницы за счёт изменения последовательности гена *GW7* в геномах В и D (Wang et al., 2019c). Было показано, что мутации в одном или обоих генах увеличивают ширину и массу зерна, но уменьшают его длину. Последующий анализ показал, что ген *GW7* участвует в путях, регулирующих деление клеток и рост органов, что также подтверждается колокализацией белка *GW7* с белками α - и β -тубулина (Wang et al., 2019c).

Увеличить такой показатель продуктивности пшеницы, как число зёрен в колосе, удалось за счёт редактирования четырёх генов-мишеней, регулирующих размер зерна, – *CKX2-1*, *GLW7*, *GW2* и *GW8* (Zhang et al., 2019d). В результате было получено 68 мутантов по этим генам, причём растения, гомозиготные по делеции 1160 пн в гене *CKX2-1*, показали значительное увеличение числа зёрен в колосе и его плотности. Эти результаты показывают, что *CKX2-1* является негативным регулятором признака числа зёрен в колосе.

Гены гомеологичной серии *Qsd1-A1*, *-B1* и *-D1* пшеницы являются регуляторами периода покоя семян. В 2019 году вышла работа, описывающая получение мутантных линий пшеницы с потерей функции данных генов (Abe et al., 2019). В результате авторам удалось получить линию пшеницы, несущую мутации сразу трёх гомеологов *Qsd1*. Данное растение было скрещено с сортом дикого типа Fielder для получения нетрансгенного тройного рецессивного мутанта. Мутант показал значительно более длительный период покоя семян, чем дикий тип, что может быть использовано для снижения прорастания зерна на корню (Abe et al., 2019).

Устойчивость к факторам биотического и абиотического стресса

К настоящему времени вышли две работы по редактированию генов, связанных с чувствительностью к грибному патогену *Blumeria graminis* f. sp. tritici, Bgt, поражение которым вызывает заболевание пшеницы мучнистой росой, существенно снижая урожай (Singh et al., 2016). В одной из работ был произведён нокаут генов *MLO* (mildew-resistance loci; Wang et al., 2014), в другой – генов *EDR1* (enhanced disease resistance1; Zhang et al., 2017). Показано, что для полной устойчивости растений пшеницы необходим нокаут сразу трёх гомеологичных копий *EDR1*. То же самое касается *MLO*. Нокаут одной копии (*MLO-A1*) придавал лишь частичную устойчивость.

Устойчивость кукурузы к широкому спектру абиотических стрессов может быть достигнута за счёт редактирования гена *ACD6* (ранее *ANK23*). Но в данном случае для повышения устойчивости требуется усиление экспрессии этого гена, а его нокаут, напротив, приводит к восприимчивости. Так, при использовании системы CRISPR/Cas были созданы растения кукурузы, нокаутные по гену *ACD6*, которые были более восприимчивы к пузырчатой головне (грибной патоген *Ustilago maydis* (DC.) Corda), чем растения дикого типа (Zhang et al., 2019c). Напротив, у линии кукурузы (SC-9) с относительно высоким уровнем экспрессии *ACD6* наблюдалась повышенная устойчивость к *U. maydis*.

Ген *EPSPS* пшеницы является идеальной мишенью для геномного редактирования, поскольку известно несколько хорошо охарактеризованных аминокислотных замен в этом гене, которые придают растению устой-

чивость к широко используемому гербициду глифосату (Sammons, Gaines, 2014). За счёт изменения последовательностей гомеологичных генов-мишеней *EPSPS* была достигнута устойчивость пшеницы к этому препарату (Arndell et al., 2019).

Контроль опыления для гибридной селекции

Стерильность растений по мужскому типу является полезным инструментом для производства гибридных семян растений. Основываясь на типе наследования, мужская стерильность может быть цитоплазматической (ЦМС) и генетической/ядерной (ГМС). ЦМС обычно вызывается мутациями митохондриальных генов, которые приводят к нарушению функций митохондрий растений. ГМС связана с мутациями генов ядерного генома, регулирующих образование мужских гамет.

Ген мужской стерильности пшеницы *Ms45* в геномах А, В и D был нокаутирован с использованием CRISPR/Cas, в результате чего были обнаружены растения с мутациями во всех трёх гомеологичных копиях. Генетический анализ мутаций показал, что все три гена *Ms45* в доминантном состоянии способствуют мужской фертильности и что тройные гомозиготные мутанты необходимы для прекращения развития пыльца и достижения мужской стерильности (Singh et al., 2018).

В другой работе были получены стерильные формы пшеницы за счёт внесения мутаций в ген *Ms1* пшеницы у сортов пшеницы Fielder и Gladius (Okada et al., 2019). Внесение биаллельных мутаций привело к сдвигу рамки считывания, что привело к нокауту гена *Ms1*, а на уровне фенотипа - к полной стерильности по мужскому типу.

Стерильные генотипы кукурузы удалось получить за счёт нокаута ядерных генов *Ms33* и *Ms8* (Chen et al., 2018b; Xie et al., 2018). Мутация в этих генах и мужской стерильный фенотип наследуются согласно законам Менделя.

Необходимой компонентой системы контроля опыления в гибридной селекции, кроме генов стерильности, являются восстановители фертильности. При помощи системы CRISPR/Cas была уточнена функция разных аллельных вариантов гена *Rf4* кукурузы, расположенного на хромосоме 8S и кодирующего фактор транскрипции bHLH (Jaqueth et al., 2020). Редактирование привело к замене фенилаланина (F) в позиции 187 на тирозин (Y), анализ фенотипа (растения, содержащие F187, были полностью фертильными, а растения, содержащие Y187, были стерильными) подтвердил ранее высказанную гипотезу о том, что восстановление фертильности определяется изменением одной аминокислоты гена *Rf4*. F187 оказался критичным для стабилизации конформации белка Rf4 и его взаимодействия с другими белками (Jaqueth et al., 2020).

Заключение

В значительной мере быстрый выход работ по редактированию разнообразных генов зерновых культур с момента появления системы редактирования CRISPR/Cas связан не только с преимуществами самой системы, но и с накоплением знаний о хозяйственно-ценных генах пшеницы, ячменя и кукурузы. Геномное редактирование на настоящее время имеет два основных направления: определение/подтверждение функций генов и получение новых сортов сельскохозяйственных растений. Практический успех последнего будет во многом зависеть от законодательных норм для использования таких растений. Дальнейший успех в развитии геномного редактирования будет связан не только с преодолением технологических проблем (например, низкая эффективность редактирования пшеницы, генотип-зависимая низкая способность к трансформации и регенерации у ячменя), но прежде всего с интенсивностью и достижениями генетических исследований, направленных на расшифровку механизмов формирования хозяйственно-ценных признаков у этих культур.

Благодарности/Acknowledgements

Данная статья подготовлена при поддержке РФФИ (№ 18-416-543007). / The present paper was supported by RFFI (No. 18-416-543007).

Литература/References

- Abe F., Haque E., Hisano H., Tanaka T., Kamiya Y., Mikami M., Kawaura K., Endo M., Onishi K., Hayashi T., Sato K. Genome-Edited Triple-Recessive Mutation Alters Seed Dormancy in Wheat. *Cell Reports*. 2019;28(5):1362-1369.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.090
- Ali Z., Abul-Faraj A., Li L., Ghosh N., Piatek M., Mahjoub A., Aouida M., Piatek A., Baltus N.J., Voytas D.F., Dinesh-Kumar S., Mahfouz M.M. Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant*. 2015;8(8):1288-1291. DOI: 10.1016/j.molp.2015.02.011
- Arndell T., Sharma N., Langridge P., Baumann U., Watson-Haigh NS, Whitford R. gRNA validation for wheat genome editing with the CRISPR-Cas9 system. *BMC Biotechnology*. 2019;19(1):1-12. DOI: 10.1186/s12896-019-0565-z
- Bage S.A., Barten T.J., Brown A.N., Crowley J.H., Deng M., Fouquet R., Gomez J.R., Hatton T.W., Lamb J.C., LeDeaux J.R., Lemke B.M., Manjunath S., Marengo M.S., Morales E.Y., Garcia M.O., Peevers J.M., Pellet J.-L., Avendano A.R., Rymarkus L.A., Sridharan K., Valentine M.F., Yang D.H., Cargill E.J.. Genetic characterization of novel and CRISPR-Cas9 gene edited maize brachytic 2 alleles. *Plant Gene*. 2020;21(2020):100198. DOI: 10.1016/j.plgene.2019.100198
- Barrero J.M., Cavanagh C., Verbyla K.L., Tibbits J.F.G., Verbyla A.P., Huang B.E., Rosewarne G.M., Stephen S., Wang P., Whan A., Rigault P., Hayden M.J., Gubler F. Transcriptomic analysis of wheat near-isogenic lines identifies PM19-A1 and A2 as candidates for a major dormancy QTL. *Genome Biology*. 2015;16(1):93. DOI: 10.1186/s13059-015-0665-6
- Becker H. Pflanzenzüchtung. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer/UTB für Wissenschaft; 1993. [in German] (Russian Translation: Eds. V.I.

- Leunov, G.F. Monachos. Moscow: Partnership of scientific publications KMK; 2015. 425 p.).
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N.J., Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015;32:76-84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007
- Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Song H., Gao C., Voytas D.F., Kagale S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-10. DOI: 10.1038/s41598-018-24690-8
- Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*. 2015;33(1):41-52. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006
- Čermák T., Curtin S.J., Gil-Humanes J., Čegan R., Kono T.J.Y., Konečná E., Belanto J.J., Starker C.G., Mathre J.W., Greenstein R.L., Voytas D.F. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell*. 2017;29(6):1196-217. DOI: 10.1105/tpc.16.00922
- Char S.N., Neelakandan A.K., Nahampun H., Frame B., Main M., Spalding M.H., Becraft P.W., Meyers B.C., Walbot V., Wang K., Yang B. An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2017;15(2):257-68. DOI: 10.1111/pbi.12611
- Chen Q., Han Y., Liu H., Wang X., Sun J., Zhao B., Li W., Tian J., Liang Y., Yan J., Tian F. Genome-wide association analyses reveal the importance of alternative splicing in diversifying gene function and regulating phenotypic variation in maize. *Plant Cell*. 2018a;30(7):1404-23. DOI: 10.1105/tpc.18.00109
- Chen R., Xu Q., Liu Y., Zhang J., Ren D., Wang G., Liu Y. Generation of transgene-free maize male sterile lines using the CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*. 2018b;9:1180. DOI: 10.3389/fpls.2018.01180
- Cherny I.V., Shkvarnikov P.K., Maksimenko V.P. Spring wheat variety Novosibirskaya-67 (Sort yarovoy pshenitsy Novosibirskaya-67). Russian Federation; authorship certificate number: 1801; 1975. [in Russian] (Чёрный И.В., Шкварников П.К., Максименко В.П. Сорт яровой пшеницы Новосибирская 67. Российская Федерация; авторское свидетельство № 1801; 1975).
- Cui X., Balcerzak M., Scherthaner J., Babic V., Datla R., Brauer E.K., Labbé N., Subramaniam R., Ouellet T. An optimised CRISPR/Cas9 protocol to create targeted mutations in homoologous genes and an efficient genotyping protocol to identify edited events in wheat. *Plant Methods*. 2019;15(1):1-12. DOI: 10.1186/s13007-019-0500-2
- Doll N.M., Gilles L.M., Gérentes M.F., Richard C., Just J., Fierley J., Borrelli V.M.G., Gendrot G., Ingram G.C., Rogowsky P.M., Widiez T. Single and multiple gene knockouts by CRISPR-Cas9 in maize. *Plant Cell Reports*. 2019;38(4):487-501. DOI: 10.1007/s00299-019-02378-1
- Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. DOI: 10.1126/science.1258096
- Feng C., Su H., Bai H., Wang R., Liu Y., Guo X., Liu C., Zhang J., Yuan J., Birchler J.A., Han F. High-efficiency genome editing using a dmcl promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(11):1848-1857. DOI: 10.1111/pbi.12920
- Feng C., Yuan J., Wang R., Liu Y., Birchler J.A., Han F. Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(1):37-43. DOI: 10.1016/j.jgg.2015.10.002
- Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B., Wei P., Yang D., Wang Z. Multi-generation analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(12):4632-4637. DOI: 10.1073/pnas.1400822111
- Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(7):397-405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Gao Q., Xu W.Y., Yan T., Fang X.D., Cao Q., Zhang Z.J., Ding Z.H., Wang Y., Wang X.B. Rescue of a plant cytorhabdovirus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. *New Phytologist*. 2019;223(4):2120-33. DOI: 10.1111/nph.15889
- Gasparis S., Kała M., Przyborowski M., Łyznik 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;14:111. DOI: 10.1186/s13007-018-0382-8
- Gerasimova S., Hertig C., Korotkova A., Otto I., Hiekel S., Kochetov A., Kumlehn J., Khlestkina E. Converting hulled into naked barley through targeted knock-out of the Nud1 gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2018;54(1):101. DOI: 10.1007/s11627-018-9923-0
- Gerasimova S.V., Khlestkina E.K., Kochetov A.V., Shumny V.K. Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017;64(2):141-155. (Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях. *Физиология Растений*. 2017;64(2):92-108). DOI: 10.1134/S1021443717010071
- 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 Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):1033-1039. DOI: 10.18699/VJ18.447
- Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sánchez-León S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant Journal*. 2017;89(6):1251-1262. DOI: 10.1111/tpj.13446
- Hamada H., Liu Y., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Scientific Reports*. 2018;8:14422. DOI: 10.1038/s41598-018-32714-6
- Hayta S., Smedley M.A., Demir S.U., Blundell R., Hinchliffe A., Atkinson N., Harwood W.A. An efficient and reproducible Agrobacterium-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*. 2019;15:121. DOI: 10.1186/s13007-019-0503-z
- 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;95(1-2):111-121. DOI: 10.1007/s11103-017-0640-6
- Holubová K., Hensel G., Vojta P., Tarkowski P., Bergougnoux V., Galuszka P. Modification of barley plant productivity through regulation of cytokinin content by reverse-genetics approaches. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1676. DOI: 10.3389/fpls.2018.01676
- Howells R.M., Craze M., Bowden S., Wallington E.J. Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9. *BMC Plant Biology*. 2018;18:215. DOI: 10.1186/s12870-018-1433-z
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 2013;31(9):827-832. DOI: 10.1038/nbt.2647
- Hu J., Li S., Li Z., Li H., Song W., Zhao H., Lai J., Xia L., Li D., Zhang Y. A barley stripe mosaic virus-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. *Molecular Plant Pathology*. 2019;20(10):1463-1474. DOI: 10.1111/mpp.12849
- Jaganathan D., Ramasamy K., Sellamuthu G., Jayabalan S., Venkataran G. CRISPR for crop improvement: An update review. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:985. DOI: 10.3389/fpls.2018.00985
- Jaqueth J.S., Hou Z., Zheng P., Ren R., Nagel B.A., Cutter G., Niu X., Vollbrecht E., Greene T.W., Kumpatla S.P. Fertility restoration of maize CMS-C altered by a single amino acid substitution within the Rf4 bHLH transcription factor. *Plant Journal*. 2020;101(1):101-111. DOI: 10.1111/tpj.14521
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Jennifer A. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
- Jouanin A., Schaart J.G., Boyd L.A., Cockram J., Leigh F.J., Bates R., Wallington E.J., Visser R.G.F., Smulders M.J.M. Outlook for coe-

- liac disease patients: towards bread wheat with hypomutagenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC plant biology*. 2019;19(1):333. DOI: 10.1186/s12870-019-1889-5
- 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;8:540. DOI: 10.3389/fpls.2017.00540
- Khlestkina E.K. Rice genome editing using CRISPR/Cas system. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(1):49–54 [in Russian] (Хлесткина Е.К. Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(1):49-54). DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54
- Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(7):676-687. [in Russian] (Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. *Генетика*. 2016;52(7):774-787). DOI: 10.1134/S102279541607005X
- Kim D., Alptekin B., Budak H. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional and Integrative Genomics*. 2018;18(1):31-41. DOI: 10.1007/s10142-017-0572-x
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):29-37. [in Russian] (Короткова А.М., Герасимова С.В., Хлесткина Е.К. Текущие достижения в области модификации генов культурных растений с использованием системы CRISPR/Cas. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(1):29-37). DOI: 10.18699/VJ19.458
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):250-258. [in Russian] (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;21(2):250-258). DOI: 10.18699/VJ17.244
- Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(11):1892-903. DOI: 10.1007/s10142-017-0572-x
- Kumar R., Mamrutha H.M., Kaur A., Venkatesh K., Sharma D., Singh G.P. Optimization of Agrobacterium-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(2):1845-1853. DOI: 10.1007/s11033-019-04637-6
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard 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;16(1):258. DOI: 10.1186/s13059-015-0826-7
- Lee K., Zhang Y., Kleinstiver B.P., Guo J.A., Aryee M.J., Miller J., Malzahn A., Zarecor S., Lawrence-Dill C.J., Joung J.K., Qi Y., Wang K. Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(2):362-372. DOI: 10.1111/pbi.12982
- Li C., Zong Y., Wang Y., Jin S., Zhang D., Song Q., Zhang R., Gao C. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology*. 2018;19:59. DOI: 10.1186/s13059-018-1443-z
- Li J., Aach J., Norville J.E., McCormack M., Bush J., Church G.M., Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated plant genome editing via guide RNA/Cas9. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):688-691. DOI: 10.1038/nbt.2654. Multiplex
- Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y., Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 2017;8(1):1-5. DOI: 10.1038/ncomms14261
- Liang Z., Chen K., Zhang Y., Liu J., Yin K., Qiu J., Gao C. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nature Protocols*. 2018;13(3):413-430. DOI: 10.1038/nprot.2017.145
- Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*. 2014;41(2):63-68. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.12.001
- Malzahn A.A., Tang X., Lee K., Ren Q., Sretenovic S., Zhang Y., Chen H., Kang M., Bao Y., Zheng X., Deng K., Zhang T., Salcedo V., Wang K., Zhang Y., Qi Y. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and *Arabidopsis*. *BMC Biology*. 2019;17:9. DOI: 10.1186/s12915-019-0629-5
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):691-693. DOI: 10.1038/nbt.2655
- Okada A., Arndell T., Borisjuk N., Sharma N., Watson-Haigh N.S., Tucker E.J., Baumann U., Langridge P., Whitford R. CRISPR/Cas9-mediated knockout of Ms1 enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(10):1905-1913. DOI: 10.1111/pbi.13106
- Peng R., Lin G., Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS Journal*. 2016;283(7):1218-1231. DOI: 10.1111/febs.13586
- Qi W., Zhu T., Tian Z., Li C., Zhang W., Song R. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnology*. 2016;16:58. DOI: 10.1186/s12896-016-0289-2
- Qi X., Dong L., Liu C., Mao L., Liu F., Zhang X., Cheng B., Xie C. Systematic identification of endogenous RNA polymerase III promoters for efficient RNA guide-based genome editing technologies in maize. *Crop Journal*. 2018;6(3):314-320. DOI: 10.1016/j.cj.2018.02.005
- Rey M.D., Martín A.C., Smedley M., Hayta S., Harwood W., Shaw P., Moore G. Magnesium increases homoeologous crossover frequency during meiosis in ZIP4 (Ph1 gene) mutant wheat-wild relative hybrids. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:509. DOI: 10.3389/fpls.2018.00509
- Sammons R.D., Gaines T.A. Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Management Science*. 2014;70(9):1367-1377. DOI: 10.1002/ps.3743
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(4):902-910. DOI: 10.1111/pbi.12837
- Sapone A., Lammers K.M., Casolaro V., Cammarota M., Giuliano M.T., De Rosa M., Stefanile R., Mazzarella G., Tolone C., Russo M.I., Esposito P., Ferraraccio F., Carteni M., Riegler G., de Magistris L., Fasano A. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: Celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine*. 2011;9:23. DOI: 10.1186/1741-7015-9-23
- Shan Q., Wang Y., Li J. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):686-688. DOI: 10.1038/nbt.2650
- Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*. 2014;9(10):2395-2410. DOI: 10.1038/nprot.2014.157
- Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H.R., Archibald R.L., Yang M., Hakiimi S.M., Mo H., Habben J.E. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*. 2017;15(2):207-216. DOI: 10.1111/pbi.12603
- Singh M., Kumar M., Albertsen M.C., Young J.K., Cigan A.M. Concurrent modifications in the three homeologs of Ms45 gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology*. 2018;97(4-5):371-383. DOI: 10.1007/s11103-018-0749-2
- Singh R.P., Singh P.K., Rutkoski J., Hodson D.P., He X., Jørgensen L.N., Hovmöller M.S., Huerta-Espino J. Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annual Review of Phytopathology*. 2016;54(1):303-322. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-095835
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K., Cigan A.M.

- Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 2016;7(1):1-7. DOI: 10.1038/ncomms13274
- Svitashev S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology*. 2015;169(2):931-945. DOI: 10.1104/pp.15.00793
- Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. RNA-Guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2013;3(12):2233-2238. DOI: 10.1534/g3.113.008847
- Wang B., Zhu L., Zhao B., Zhao Y., Xie Y., Zheng Z., Li Y., Sun J., Wang H. Development of a Haploid-Inducer Mediated Genome Editing System for Accelerating Maize Breeding. *Molecular Plant*. 2019a;12(4):597-602. DOI: 10.1016/j.molp.2019.03.006
- Wang H., Yan S., Xin H., Huang W., Zhang H., Teng S., Yu Y.C., Fernie A.R., Lu X., Li P., Li S., Zhang C., Ruan Y.L., Chen L.Q., Lang Z. A subsidiary cell-localized glucose transporter promotes stomatal conductance and photosynthesis. *Plant Cell*. 2019b;31(6):1328-1343. DOI: 10.1105/tpc.18.00736
- Wang W., Pan Q., Tian B., He F., Chen Y., Bai G., Akhunova A., Trick H.N., Akhunov E. Gene editing of the wheat homologs of TONNEAU1-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *Plant Journal*. 2019c;100(2):251-264. DOI: 10.1111/tpj.14440
- Wang W., Simmonds J., Pan Q., Davidson D., He F., Battal A., Akhunova A., Trick H.N., Uauy C., Akhunov E. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of TaGW2 homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131(11):2463-2475. DOI: 10.1007/s00122-018-3166-7
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*. 2014;32(9):947-951. DOI: 10.1038/nbt.2969
- Wolter F., Edelmann S., Kadri A., Scholten S. Characterization of paired Cas9 nickases induced mutations in maize mesophyll protoplasts. *Maydica*. 2017;62(2):1-11.
- Wu G., Zhao Y., Shen R., Wang B., Xie Y., Ma X., Zheng Z., Wang H. Characterization of Maize Phytochrome-Interacting Factors in Light Signaling and Photomorphogenesis. *Plant Physiology*. 2019;181(2):789-803. DOI: 10.1104/pp.19.00239
- Xie K., Wu S., Li Z., Zhou Y., Zhang D., Dong Z., An X., Zhu T., Zhang S., Liu S., Li J., Wan X. Map-based cloning and characterization of *Zea mays* male sterility33 (*ZmMs33*) gene, encoding a glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131(6):1363-78. DOI: 10.1007/s00122-018-3083-9
- Xing H.-L., Dong L., Wang Z.-P., Zhang H.-Y., Han C.-Y., Liu B., Wang X.-C., Chen Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*. 2014;14(1):327. DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y
- Young J., Zastrow-Hayes G., Deschamps S., Svitashev S., Zaremba M., Acharya A., Paulraj S., Peterson-Burch B., Schwartz C., Djukanovic V., Lenderts B., Feigenbutz L., Wang L., Alarcon C., Siksnys V., May G., Chilcoat N.D., Kumar S. CRISPR-Cas9 Editing in Maize: Systematic Evaluation of Off-target Activity and Its Relevance in Crop Improvement. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-11. DOI: 10.1038/s41598-019-43141-6
- Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N., Zhu J.K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*. 2014;12(6):797-807. DOI: 10.1111/pbi.12200
- Zhang Q., Zhang Y., Lu M.H., Chai Y.P., Jiang Y.Y., Zhou Y., Wang X.C., Chen Q.J. A novel ternary vector system united with morphogenic genes enhances CRISPR/Cas delivery in maize. *Plant Physiology*. 2019a;181(4):1441-1448. DOI: 10.1104/pp.19.00767
- Zhang S., Zhang R., Gao J., Gu T., Song G. Highly Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Wheat via the Agrobacterium tumefaciens-Mediated CRISPR/Cas9 System. *International Journal of Molecular Sciences Article*. 2019b;20(17):4257. DOI: 10.3390/ijms20174257
- Zhang S., Zhang R., Song G., Gao J., Li W., Han X., Chen M., Li Y., Li G. Targeted mutagenesis using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biology*. 2018;18(1):1-12. DOI: 10.1186/s12870-018-1496-x
- Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant Journal*. 2017;91(4):714-724. DOI: 10.1111/tpj.13599
- Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J.L., Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*. 2016;7:1-8. DOI: 10.1038/ncomms12617
- Zhang Z., Guo J., Zhao Y., Chen J. Identification and characterization of maize ACD6-like gene reveal ZmACD6 as the maize orthologue conferring resistance to *Ustilago maydis*. *Plant Signaling and Behavior*. 2019c;14(10):e1651604. DOI: 10.1080/15592324.2019.1651604
- Zhang Z., Hua L., Gupta A., Tricoli D., Edwards K.J., Yang B., Li W. Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnology Journal*. 2019d;17(8):1623-1635. DOI: 10.1111/pbi.13088
- Zhong Y., Blennow A., Kofoed-Enevoldsen O., Jiang D., Hebelstrup K.H. Protein Targeting to Starch 1 is essential for starchy endosperm development in barley. *Journal of Experimental Botany*. 2019;70(2):485-496. DOI: 10.1093/jxb/ery398
- Zhou H., Liu B., Weeks D.P., Spalding M.H., Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(17):10903-10914. DOI: 10.1093/nar/gku806
- Zhu J., Song N., Sun S., Yang W., Zhao H., Song W., Lai J. Efficiency and Inheritance of Targeted Mutagenesis in Maize Using CRISPR-Cas9. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(1):25-36. DOI: 10.1016/j.jgg.2015.10.006
- Zong Y., Wang Y., Li C., Zhang R., Chen K., Ran Y., Qiu J.L., Wang D., Gao C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*. 2017;35(5):438-440. DOI: 10.1038/nbt.3811
- Zuo Y., Feng F., Qi W., Song R. Dek42 encodes an RNA-binding protein that affects alternative pre-mRNA splicing and maize kernel development. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2019;61(6):728-748. DOI: 10.1111/jipb.12798