

УДК 577.29:575.224.46

Достижения, проблемы и перспективы получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом

© 2019 Д.Н. МИРОШНИЧЕНКО^{1,2,3}, О.А. ШУЛЬГА², В.Р. ТИМЕРБАЕВ^{1,2}, С.В. ДОЛГОВ^{1,2,3,*}

¹Филиал Института биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пуцино, 142290

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550

³ООО «Дока-генные технологии» Московская обл., Рогачёво, 141880

*e-mail: dolgov@bibch.ru

Поступила 03.10.2018 г.

После доработки 11.12.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Обсуждаются проблемы, достижения и перспективы использования различных подходов к доставке компонентов систем редактирования ДНК в растительные клетки, регенерации из них полноценных растений с отредактированным геномом и получению новых форм, которые, в итоге, не содержат чужеродных последовательностей. Кроме того, сделана попытка систематизировать результаты исследований по использованию нуклеазных систем редактирования ДНК (ZFN, TALEN и CRISPR/Cas) для получения полноценных растений с различными модификациями/мутациями генома и отразить основные направления развития нуклеазных технологий геномного редактирования растений для получения свободных от трансгенных последовательностей форм культурных растений.

Ключевые слова: редактирование генома; генетическая инженерия растений, гидовая РНК, нуклеаза, транзиентная экспрессия, биобаллистика, плазмиды, трансфекция протопластов.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26

Последние пять лет биотехнология растений переживает новый всплеск развития и вызывает повышенный интерес, связанный с появлением и внедрением нуклеазных систем редактирования генома. После публикации в 2013 г. научных работ посвященных использованию системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома арабидопсиса [1], риса [2] и табака [3], исследователи получили в свое распоряжение простой и высокоэффективный инструмент, позволяющий направленно изменять гены растений. Благодаря этому стало возможным целенаправленно вносить точечные или протяженные мутации, включать или выключать определенные гены, специфически менять отдельные нуклеотиды или даже целые последовательности. Дальнейшее развитие методов,

основанных на применении систем CRISPR/Cas, не только подстегнуло научный и практический интерес к направленному редактированию генома с.-х. культур, но и стимулировало обсуждение проблем, связанных с регулированием генно-инженерных подходов при создании биотехкультур.

До появления систем CRISPR/Cas9, основными средствами редактирования генома растений являлись технологии ZFN (Zink-Finger Nucleases) [4] на основе использования нуклеаз, содержащих так называемые «цинковые пальцы», и TALEN-технологии на основе белков TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) [5]. Обе эти нуклеазы представляют собой химерные белки, состоящие из искусственно сконструированного ДНК-связывающего домена и домена

Список сокращений: ГМО – генно-модифицированный организм; ГР – геномно-редактированный; РНП – рибонуклеопротеиновый; с.-х. – сельскохозяйственный; CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; GFP – зеленый флуоресцентный белок; GUS – глюкуронидаза; TALEN – Transcription Activator Like Effector Nuclease; TRV – Tobacco Rattle Virus; ZFN – Zink-Finger Nuclease.

неспецифической нуклеазы из рестриктазы FokI. ZFN- и TALEN-технологии редактирования генома не получили широкого распространения в биотехнологии растений, вследствие высокой стоимости, сложности и трудоемкости процесса сборки специфичных ДНК-связывающих белков для каждого целевого гена.

Геномное редактирование по технологии CRISPR/Cas осуществляется с помощью ДНК-нуклеазы, направляемой посредством РНК, которая должна присоединиться комплементарно к участку молекулы ДНК протяженностью около 20 нуклеотидов. Поскольку для обеспечения специфичности действия нуклеазы достаточно лишь одной гидовой РНК, системы CRISPR/Cas (как правило, CRISPR/Cas9) оказались достаточно простыми, эффективными и универсальными как для модельных, так и для культурных видов растений. Особенности работы системы CRISPR/Cas, связанные со сборкой, тестированием и ее использованием для внесения мутаций в геном растений,

подробно рассмотрены в различных обзорных статьях [6–9]. Благодаря CRISPR/Cas9-технологии за прошедшие пять лет стало возможным направленные редактирование генома большинства основных с.-х. культур, включая пшеницу, рис, кукурузу, ячмень, сою, рапс, томат, картофель и др. (табл. 1).

Методами геномного редактирования показана возможность приобретения новых хозяйственно-ценных признаков путем изменения различных целевых генов. Этому посвящены многочисленные научные исследования и обзорные статьи [8, 10–13]. Благодаря интересу со стороны биотехнологических компаний и селекционных фирм к технологиям геномного редактирования уже получены новые формы культурных ГР-растений, перспективные с коммерческой точки зрения. В частности, начиная с 2018 г, в странах северной Америки разрешен к выращиванию сорт рыжика посевного (*Camelina sativa*), в семенах которого с помощью технологии CRISPR/Cas9 увеличено

Таблица 1

Хронология успешного использования нуклеазных систем редактирования ДНК для получения ГР-растений различных видов

Timeline of first publications reporting the successful generation of genome edited plants using various nuclease editing tools

Год	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas
2005	Арабидопсис [18]		
2009	Кукуруза [93], табак [94]		
2010	Петуния [75]		
2012		Рис [35]	
2013		Кукуруза [95], рапс [96], ячмень [97]	Арабидопсис [1], рис [2], табак [3]
2014		Арабидопсис [98], пшеница [31], соя [99], томат [100]	Кукуруза [27], томат [101]
2015	Инжир [102], яблоня [102]	Картофель [36]	Грейпфрут [103], картофель [104], латук [38], рапс [28], соя [105], ячмень [28]
2016	Томат [106]	Табак [37]	Арбуз [107], виноград [108], лен [39], люцерна [109], лядвинец [110], мак [111], одуванчик [87], петуния [112], пшеница [67], рыжик [14], сорго [29], яблоня [113]
2017		Люцерна [32], сахарный тростник [114]	Апельсин [115], банан [116], вьюнок [117], дендробиум [118], маниок [119], просо [120], тополь [121], хлопок [56], хризантема [122]
2018	Пшеница [52]	Арахис [123]	Диоскорея [124], земляника [125], киви [126], кофе [127], ятрофа [128]

содержание ω 3-масла [14]. При этом для посева ГР-рыжика и продажи полученного из него растительного масла в США не требуется никаких специальных разрешений [15]. Поскольку указанная ГР-форма не содержит привнесенных чужеродных последовательностей, она не рассматривается регулирующими органами США как ГМО. Еще одна культура, которой дан зеленый свет для промышленного выращивания в Северной Америке в 2018 г., – соле- и засухоустойчивый сорт сои, полученный в результате направленной мутации генов *Drb2a* и *Drb2b* с помощью технологии CRISPR/Cas9 [15]. В конце 2015 г. в Швеции было выдано разрешение на свободное выращивание листовой капусты, полученной исследователями из Университета Ульмео в результате геномного редактирования. И хотя данный сорт капусты, содержащий точечную мутацию, привнесенную благодаря CRISPR/Cas9, выращивался с 2016 г. лишь в нескольких частных садах Швеции [16], тем не менее, факт беспрепятственного (на тот момент) со стороны регулирующих государственных органов выхода ГР-культуры к потребителю в одной из стран ЕС позволял надеяться на возможность широкого использования этой технологии в промышленном растениеводстве. Однако в августе 2018 г. высший судебный орган ЕС, вынес решение о том, что все новые формы, полученные в результате геномного редактирования, и в случае, если они не содержат вспомогательных чужеродных последовательностей, должны рассматриваться как ГМО, а продукция, полученная из них, должна маркироваться аналогично ГМ-продуктам (<https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>). Такое решение чувствительно отразилось на работе компаний и лабораторий Европы, связывающих свою деятельность с внедрением систем редактирования генома с.-х. культур в селекционную практику [17].

На наш взгляд, помимо различных социальных, политических и экономических аспектов, причиной принятого решения являются методы генетической инженерии и трансгеноза растений, используемые при получении ГР-растений. Анализ научной литературы показывает, что подавляющее большинство описанных ГР-растений, полученных с помощью ZFN, TALEN и CRISPR/Cas технологий, является одновременно и генно-модифицированными организмами. Этот недостаток, тем не менее, преодолим с помощью технологий, которые позволяют получать ГР-растения, не содержащие последовательностей «инструментов» геномного редактирования.

Современное состояние геномного редактирования растений с использованием систем ZFN, TALEN и CRISPR/Cas

Редактирование геномов растений достигло значительного прогресса с момента публикации первого сообщения о применении системы редактирования ZFN для арабидопсиса в 2005 г. [18]. При этом следует отметить, что не во всех опубликованных работах описывается получение и анализ полноценных растений с модифицированным геномом. В ряде исследований, сообщается лишь о возможности редактирования генома отдельных клеток, протопластов или каллусных тканей, особенно это касается пилотных работ.

Обзорные статьи последних лет обращают внимание на увеличение публикационной активности, связанной с геномным редактированием растений [19]. Число публикаций лишь частично отражает реальное состояние дел в области получения полноценных ГР-растений. Значительная часть, действительно, посвящена успешной регенерации ГР-растений одного из видов растений по одному (единственному) гену-мишени. В то же время, опубликованы работы, в которых авторы приводят примеры успешного использования нуклеазных систем редактирования для направленного мутагенеза 32 генов-мишеней в растениях арабидопсиса [20], 11 – в растениях риса [21] или 7 – в растениях кукурузы [22]. Более того, в некоторых публикациях описывается получение ГР-растений двух и даже трех видов растений, по гомологичным и негомологичным генам-мишеням [23–29]. Также опубликованы работы, в которых для получения ГР-растений одновременно использовали различные системы редактирования, например TALEN и CRISPR/Cas9 [30–32] или ZFN и CRISPR/Cas9 [33]. Поэтому в представленном обзоре главное внимание уделено индивидуальным (независимым) событиям геномного редактирования растений, которые представляют собой сочетание «вид растений–система редактирования–индивидуальный ген-мишень», с обязательным получением полноценных растений. В число таких событий не включали геномное редактирование отдельных клеток или тканей. Были проанализированы доступные исследования, опубликованные за период с 2005 г. по июнь (включительно) 2018 г. и представленные в международных базах данных Scopus, Web of Science, PubMed, издательства Springer, Wiley, Nature, Frontiers и др. Чтобы избежать разночтений по времени публикации между печатными

и электронными источниками, для печатных изданий учитывали дату online-публикации статьи. Проведенный анализ позволил обнаружить свидетельства более 650 независимых событий успешного редактирования генов с последующим получением полноценных растений.

Несмотря на то, что ZFN-технология редактирования геномов растений известна уже 10 лет, за это время с ее помощью получено лишь 25 независимых событий геномного редактирования, что составляет 3,5% от их общего числа (рис. 1). К настоящему времени ZFN-технологии уже использовались для получения ГР-растений арабидопсиса, петунии, кукурузы, томата, табака, яблони и инжира (см. табл. 1).

Первое сообщение о возможности редактирования генома с помощью системы TALEN появилось в марте 2011 г., однако, тогда исследование было выполнено на протопластах арабидопсиса, без регенерации полноценных растений [34]. Спустя год вышла публикация об успешной регенерации растений риса, в которые, благодаря использованию TALEN-системы, были внесены мутации в ген *Os11N3c*, что увеличило устойчивость к бактериальному ожогу [35]. С тех пор TALEN-технология редактирования ДНК позволила получить 51 независимое событие геномного редактирования (около 7,5% от общего числа)

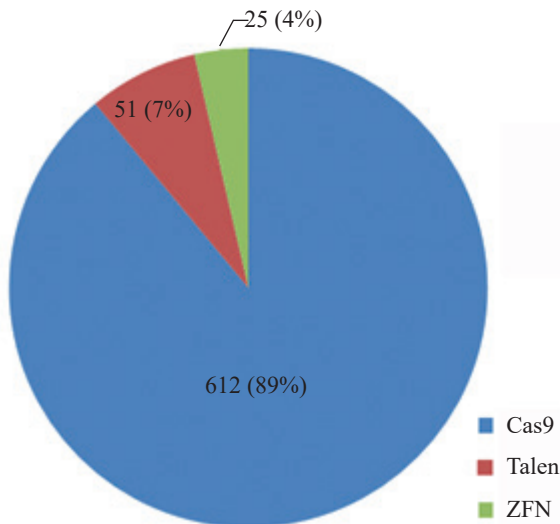


Рис. 1. Количество (доля, %) независимых событий ГР-растений, полученных с использованием различных нуклеазных систем редактирования ДНК (суммарные данные за период с 2009 г. по июнь 2018 г.)

Fig. 1. The number and proportion of independent genome editing events produced with the use of nucleic acid editing systems (summary data for the period from 2009 to June 2018)

на 13 видах растений: арабидопсисе, арахисе, картофеле, кукурузе, люцерне, пшенице, рапсе, рисе, сахарном тростнике, сое, табаке, томате и ячмене (см. табл. 1).

Несмотря на то, что первое сообщение об успешном применении системы редактирования CRISPR/Cas появилось лишь в 2013 г., благодаря ее простоте и относительно высокой эффективности большинство актуальных ГР-растений, а именно 612 независимых событий (89% от их общего числа), получено с помощью этой технологии (см. рис. 1). По состоянию на июнь 2018 г., перечень культур, для которых описано геномное редактирование посредством различных вариантов CRISPR/Cas, включал 37 видов высших растений (см. табл. 1).

Анализ исследований показывает, что геномное редактирование генома риса является наиболее востребованным на настоящий момент. На долю риса приходится около трети (227 из 688) независимых событий ГР (рис. 2).

На втором месте по популярности находится арабидопсис – основной «модельный» вид для изучения различных аспектов системной биологии и генетики двудольных видов растений. Остальные виды растений, значительно уступают рису и арабидопсису. Тем не менее, ощутимое число независимых событий ГР приходится на три вида, а именно: томат (9,7% общего числа событий ГР), кукурузу (5,1%) и табак (4,7%). На долю остальных с.-х. культур приходится не более 0,1–2,5% от общего числа событий ГР (см. рис. 2). Это связано с трудностями переноса компонентов систем редактирования в клетки большинства с.-х. культур, проблемами корректной работы переносимых компонентов, с невозможностью регенерации полноценных растений и отсутствием проявления признаков у полиплоидных видов, которыми является большинство культурных растений.

Способы получения полноценных растений с отредактированным геномом

Доставка компонентов систем редактирования генома с последующим получением «настоящих» ГР-растений – важный этап практического применения технологий редактирования генома с.-х. культур. Известные методы доставки компонентов редактирования ДНК в растительные клетки с последующей регенерацией из этих клеток растений по-прежнему сортоспецифичны, трудоемки и затратны для многих видов. Не удивительно, что в ряде работ описывается редактирование

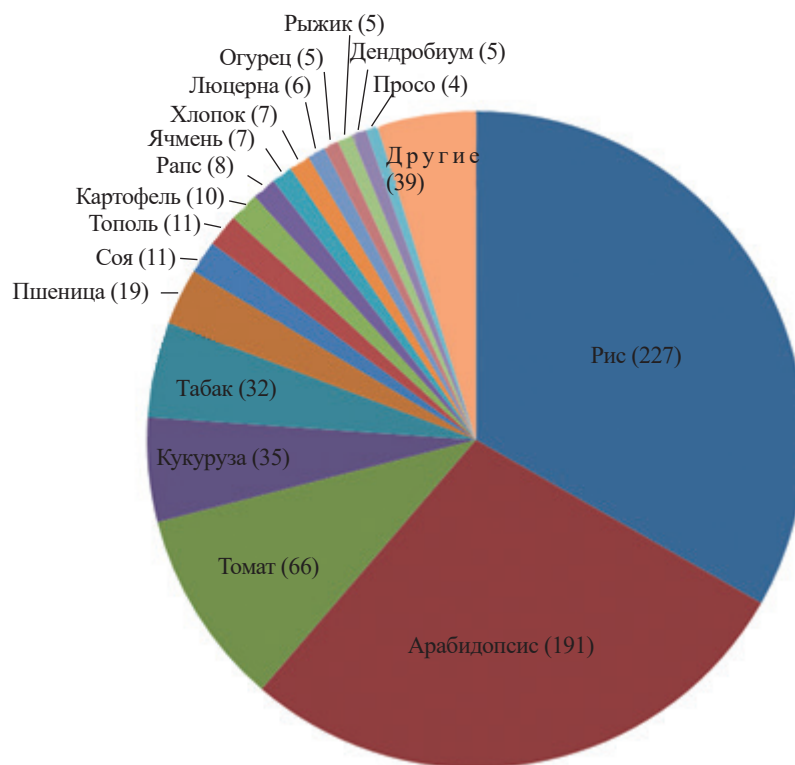


Рис. 2. Распределение независимых событий (в скобках указано количество) ГР-растений с.-х. культур, полученных с использованием нуклеазных систем редактирования генома (ZFN, TALEN и CRISPR/Cas) (суммарные данные за период с 2009 г. по июнь 2018 г.)

Fig. 2. The number of independent editing events of various crops produced using ZFN, TALEN and CRISPR/Cas DNA editing technologies (summary data for the period from 2009 to June 2018)

генома лишь отдельных клеток или популяции клеток, тогда как полноценные растения получить не удастся.

Подавляющее большинство индивидуальных ГР-растений (90%) получены с помощью агробактериального способа, путем доставки компонентов систем редактирования геномов в виде плазмид (рис. 3), в результате чего последовательности этих компонентов стабильно встраиваются в геном растений, а их постоянная экспрессия способна эффективно модифицировать целевые последовательности.

Вторым по популярности является баллистический способ переноса «инструментов» геномного редактирования с помощью генных пушек (см. рис. 3). Генные пушки обычно используют в тех случаях, когда агробактериальный способ не позволяет эффективно переносить последовательности ДНК в геном отдельных видов растений.

Еще один способ – трансфекция протопластов плазмидной ДНК или рибонуклеопротеиновыми комплексами с последующим получением полноценных растений (см. рис. 3). Этот способ

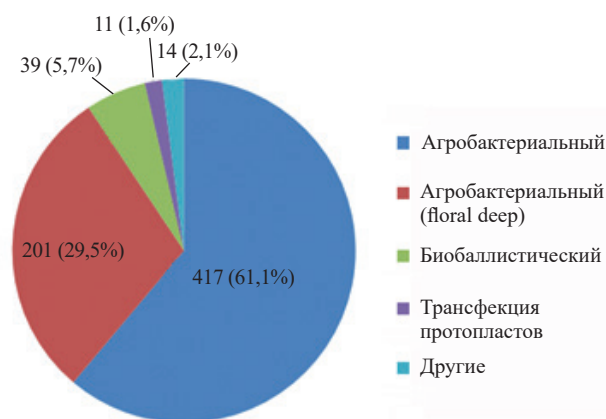


Рис. 3. Количество и доля независимых событий ГР-растений, полученных с использованием различных способов доставки нуклеазных систем редактирования генома (суммарные данные за период с 2009 г. по июнь 2018 г.)

Fig. 3. The number and proportion of independent genome editing events generated using various delivery methods of components of genome editing systems (summary data for the period from 2009 to June 2018)

успешно использовали для геномного редактирования картофеля [36], табака [37], латука [38] и льна [39]. Однако для большинства с.-х. культур такой подход практически не реализуем, в силу низкой эффективности регенерации из протопластов, высокой генотипической специфичности этого процесса и наличия большого числа самоклональных вариаций в растениях-регенерантах.

Одним из преимуществ агробактериального и биобаллистического методов является высокая эффективность и относительная простота отбора ГР-растений. Более того, благодаря активной работе систем редактирования ДНК уже в первичных трансгенных растениях можно добиться редактирования всех аллелей гена-мишени, т.е. получаемые растения оказываются биаллельны или гомозиготны. Однако постоянное присутствие и экспрессия «инструментов» редактирования в геномах получаемых растений могут вызывать редактирование различных нецелевых последовательностей (off-targets), особенно в последующих поколениях [40–42].

Стратегии создания новых форм культурных растений, не содержащих трансгенные последовательности

Успешное применение технологий геномного редактирования в селекции с целью получения новых высокопродуктивных с.-х. культур ограничивается тем, что в геноме ГР-растений, получаемых агробактериальным и биобаллистическим методами, присутствуют последовательности кодирующие компоненты систем ZFN, TALEN и CRISPR/Cas, из-за чего новые формы являются ГМО. Анализ научных публикаций, посвященных редактированию геномов различных видов растений, показывает, что в 96% случаях направленная модификация генов с.-х. культур достигается через трансгеноз, при этом первичные растения-регенеранты являются ГМО (рис. 4).

Практическое применение трансгенных культур в значительной степени сдерживается их негативным восприятием со стороны общества, а также ограничениями, действующими в отношении ГМО в разных странах. Чтобы эти ограничения не затронули ГР-растения, начиная с первых работ, исследователи предлагают различные стратегии и подходы. В целом, эти подходы можно разделить на две группы. Первая группа – это подходы, позволяющие избавиться от вспомогательных трансгенных вставок в последующем семенном поколении путем независимого наследования. Такой подход применим для с.-х. культур,

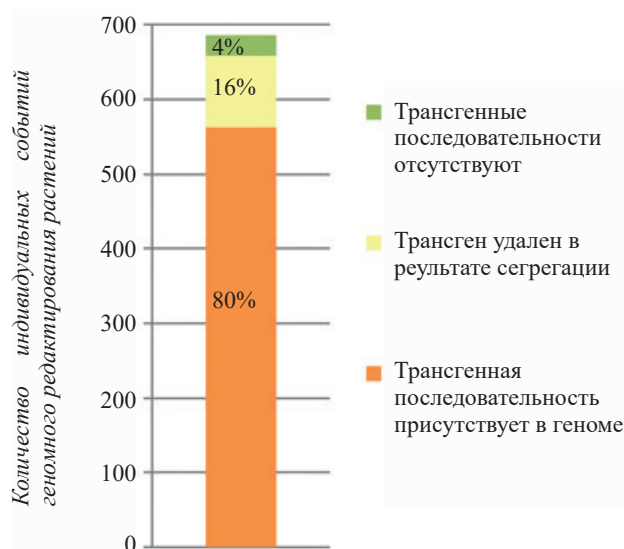


Рис. 4. Доля трансгенных/нетрансгенных событий геномного редактирования растений с использованием технологий ZFN, TALEN и CRISPR/Cas (суммарные данные за период с 2009 г. по июнь 2018 г.)

Fig. 4. The percentage of transgenic / non-transgenic independent editing events produced using ZFN, TALEN and CRISPR / Cas editing technologies (summary data for the period from 2009 to June 2018)

размножаемых семенами, и зачастую называется в научной литературе «transgene-clean» (очищение от трансгенов). Вторая группа методов – прямое получение нетрансгенных («transgene-free») ГР-растений без внедрения в их геном последовательностей, кодирующих компоненты систем редактирования ДНК. Данный подход представляет особый интерес для вегетативно размножаемых культур, у которых метод «очищения от трансгенов» не применим из-за потери сортовых особенностей при семенном размножении.

Удаление трансгенных последовательностей в результате сегрегации («transgene-clean»)

Анализ публикаций, посвященных использованию нуклеазных систем редактирования ДНК на основе ZFN, TALEN и CRISPR/Cas показал, что из 688 независимых событий ГР различных видов растений в 102 случаях исследователям удалось успешно избавиться в последующих поколениях от функциональных трансгенных вставок, кодирующих компоненты систем редактирования (см. рис. 4). Достичь этого можно было при условии, что трансгенная вставка с работающей системой геномного редактирования (например, кодирующая гидовую РНК и белок Cas9) и целевой ген-мишень находились в различных

ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ НЕТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

хромосомах первичных растений. В дальнейшем, в результате самоопыления или скрещивания с нетрансгенным образцом в последующих поколениях (T₁-T₃ или F₁-F₂) можно было отобрать семена, у которых при сохранении отредактированного целевого гена-мишени, чужеродная последовательность не наследуется.

Чаще всего этот подход использовали при редактировании генома арабидопсиса, на долю ко-

торого приходится треть всех независимых случаев успешного удаления трансгенных вставок и получения «transgene-clean» ГР-растений (табл. 2).

Это в большей мере связано с тем, что основным способом получения ГР-растений арабидопсиса является агробактериальная трансформация по методу «floral dip» (погружение цветков). Этот метод подразумевает погружение в суспензию *Agrobacterium* цветочных почек с дальнейшим

Таблица 2

Данные об успешном «очищении» нетрансгенных («transgene-clean») растений с отредактированным геномом от трансгенных вставок в последующих поколениях

The summary of reports for genome editing (GE) in various crops by the application of transgene-clean strategy

Система редактирования	Измененная последовательность	Контролируемый признак	Источник
Арабидопсис			
ZFN	Преинтегрированная последовательность	Разработка метода ГР	[44]
То же	<i>AtPPO</i>	Разработка метода	[129]
» »	<i>AtFWA, AtCACTA1</i>	Изменение метилирования промоторов	[33]
TALEN + CRISPR/Cas	<i>AtBR11</i>	Изменение фенотипа	[57]
TALEN	<i>AtADF10</i>	Изучение функций гена, роль в организации филаментов актина	[130]
CRISPR/Cas	<i>AtETC2</i>	Разработка метода ГР	[27]
То же	<i>AtFT</i>	Задержка цветения	[131]
» »	<i>AtBR11</i>	Изменение фенотипа	[132]
» »	<i>AtABP1</i>	Развитие растения	[46]
» »	<i>AtEIF(iso)4E</i>	Устойчивость к вирусам	[133]
» »	<i>AtABP1</i>	Отработка метода ГР	[59]
» »	<i>Atcbf1, Atcbf2, Atcbf3</i>	Устойчивость и акклиматизация к низким температурам	[134]
» »	<i>AtCWIN1</i>	Транспорт сахарозы в корнях	[135]
» »	<i>AtDM2c, AtDM2h, AtEDS1</i>	Разработка метода ГР	[136]
» »	<i>Atadh1</i>	Разработка метода ГР	[58]
» »	<i>AtCLV3, Atcle40, Atcle41, Atcle44</i>	Изменение морфологии клеток	[20]
» »	<i>AtADH1</i>	Разработка метода ГР	[137]
» »	<i>AtGL1</i>	Изменение морфологии листа	[138]
» »	<i>AtGGAT1</i>	Изменение фотодыхания	[139]
» »	<i>AtBZR1</i>	Регуляция дифференциации клеток ксилемы и флоэмы	[140]
» »	<i>AtISU1</i>	Разработка метода ГР	[141]
» »	<i>AtTRY, AtCPC</i>	Изменение морфологии растений	[40]
» »	<i>AtGLB3</i>	Разработка метода ГР	[142]
» »	<i>AtALS</i>	Разработка метода ГР	[143]
Ячмень			
» »	<i>HvPM19</i>	Период покоя семян	[28]
» »	<i>HvENGase</i>	Разработка метода ГР	[144]
TALEN + CRISPR/Cas	<i>HvPAPhy_a</i>	Изменение потребления кислорода	[30]
CRISPR/Cas	<i>HvMORC1</i>	Устойчивость к грибковым болезням	[145]

Система редактирования	Измененная последовательность	Контролируемый признак	Источник
Огурец			
CRISPR/Cas	<i>CseIF4E</i>	Устойчивость к вирусам	[45]
CRISPR/Cas9	<i>Cswip1</i>	Изменение морфологии плодов	[60]
Вьюнок			
То же	<i>DFR-B</i>	Изменение состава антоцианов	[117]
CRISPR/Cas	<i>EPH1</i>	Регуляция старения цветов	[146]
Люцерна			
TALEN	<i>Gmdcl2</i>	Изменение фенотипа	[32]
CRISPR/Cas9	<i>GmDrb2ab</i>	То же	То же
Кукуруза			
То же	<i>ZmPSY1</i>	Изменение фенотипа початка	[147]
» »	<i>ZmARGOS8</i>	Устойчивость к засухе	[47]
» »	<i>ZmAgo18a, ZmAgo18b</i>	Разработка метода геномного редактирования	[148]
Рапс			
» »	<i>BnBolC.GA4.a</i>	Модификация пути биосинтеза гиббереллинов	[28]
» »	<i>BnaA.FAD2.a</i>	Изменение качества масла	[48]
» »	<i>BnCLV3</i>	Изменение морфологии	[149]
Соя			
TALEN	<i>GmFAD2-1A, GmFAD2-1B</i>	Изменение качества масла	[99]
То же	<i>GmFAD3A</i>	То же	[150]
CRISPR/Cas9	<i>FLOWER LOCUS T, GmFT2a</i>	Изменение сроков цветения	[151]
То же	<i>GmPPD</i>	Изменение морфологии растений	[152]
Табак			
» »	<i>NtCCD8</i>	Изменение морфологии растений	[153]
Томат			
TALEN	<i>SIPRO</i>	Модификация пути биосинтеза гиббереллинов	[100]
CRISPR/Cas9	<i>SIRIN</i>	Изменение сроков созревания плодов	[154]
То же	<i>SIPIF4</i>	Отработка метода ГР	[155]
» »	<i>SIAGL6</i>	Морфология плодов и устойчивость к температурному стрессу	[49]
» »	<i>SIAlc</i>	Изменение сроков лежкости	[156]
» »	<i>SIMlo</i>	Устойчивость к мучнистой росе	[157]
» »	<i>SICLV3</i> промотор	Разработка метода ГР	[50]
» »	<i>DELLA</i>	То же	[158]
» »	<i>LRR-XII, Fls2</i>	Регуляция устойчивости к бактериальным болезням	[88]
» »	<i>SIR2R3, SIMYB12</i>	Изменение окраски плодов	[159]
Пшеница			
TALEN	<i>TaMLO</i>	Устойчивость к мучнистой росе	[31]
ZFN	<i>TaAHAS</i>	Устойчивость к гербициду	[52]
CRISPR/Cas9	<i>TaGli-2</i>	Снижение глютена и иммунореактивности	[51]
Рис			
TALEN	<i>Os11N3</i>	Устойчивость к бактериальным заболеваниям	[35]

Система редактирования	Измененная последовательность	Контролируемый признак	Источник
TALEN	<i>OsEPSPS</i>	Изменение чувствительности к гербициду	[160]
То же	<i>OsBADH2</i>	Изменение запаха	[161]
» »	<i>OsALS</i>	Устойчивость к гербициду	[53]
» »	<i>OsSWEET14</i>	Устойчивость к бактериальным заболеваниям	[54]
CRISPR/Cas9	<i>OsAOX1a, OsAOX1b, OsAOX1c, OsBEL</i>	Разработка метода геномного редактирования	[42]
То же	<i>OsERF922</i>	Устойчивость к грибковым заболеваниям	[162]
» »	<i>OsTMS5</i>	Изменение фертильности пыльцы в стрессовых условиях	[163]
» »	<i>OsTGW6, OsGW2, OsGW5</i>	Изменение урожайности	[164]
CRISPR/ Cpf1	<i>OsPDS, OsBEL</i>	Разработка метода геномного редактирования	[165]
CRISPR/Cas9	<i>OsEPFL9</i>	Раннее развитие растения	[166]
То же	<i>OsMPK1, OsMPK6</i>	Анализ функций гена	[167]
» »	<i>OsSBEI, OsSBEIb</i>	Изменение содержания амилозы и устойчивого крахмала	[168]
» »	<i>OsNramp5</i>	Снижение содержания кадмия	[169]
» »	<i>OsSaF, OsSaM</i>	Восстановление фертильности	[170]
» »	<i>OsLAZY1, OsDWARF3</i>	Изменение морфологии	[62]
» »	<i>OsBADH2, OsLCT1</i>	Разработка метода ГР	[61]
» »	<i>OsALS</i>	Устойчивость к гербициду	[171]
» »	<i>OsSND2</i>	Модификация содержания целлюлозы	[172]
Рыжик			
» »	<i>CsFAD2</i>	Изменение состава масла в семенах	[14]

анализом образующихся семян T_1 на присутствие трансгенной вставки [43]. Поскольку без семенного размножения опытных форм арабидопсиса невозможно провести дальнейшее изучение полученных модификаций, преобладание этого модельного вида растений в работах по очищению от трансгенов вполне предсказуемо. Впервые «очищение» от трансгенной вставки было описано в 2009 г. после геномного редактирования методом ZFN преинтегрированной целевой последовательности [44]. Позже возможность освобождения от трансгенных вставок в T_1 – T_3 -семенном поколении арабидопсиса было неоднократно описано как при использовании систем ZFN, так и при использовании систем TALEN и CRISPR/Cas (см. табл. 2).

В настоящий момент возможность удаления трансгенных функциональных вставок успешно опробована не только на модельных видах растений, таких как арабидопсис и табак, но и на таких важных с.-х. культурах, как томат, рис, рапс, огурец, соя, кукуруза, ячмень и люцерна (см. табл. 2).

Более того, если в первичных трансгенных растениях произошло редактирование всех аллелей гена-мишени, то уже в первом поколении удавалось получить стабильные формы, пригодные для широкого использования в селекционных программах. Чаще всего для освобождения от служебных трансгенных вставок проводили самоопыление первичных растений и молекулярный анализ последующих поколений. В некоторых случаях, например после редактирования генов *CseIF4E* огурца [45] и *AtAPB1* арабидопсиса [46], более эффективным оказывалось опыление с нетрансгенным образцом. Более сложные схемы поиска «transgene-clean» поколений, например возвратное скрещивание с нетрансгенным образцом с последующим самоопылением полученных F_1 растений, успешно опробованы при редактировании различных генов-мишеней кукурузы [47], рапса [48] и томата [49, 50]. Экспериментальные данные говорят о том, что удаление «инструментов» редактирования возможно как при использовании

агробактериального метода их доставки, так и при использовании метода биобаллистики. Хотя во втором случае таких работ немного, и выполнены они лишь на нескольких культурах, таких как пшеница [31, 51, 52], рис [53, 54], кукуруза [47] и соя [27].

Необходимо отметить, что успешно освободиться от вставок систем редактирования ДНК удается не всегда. Например, при редактировании гена *Gmdrb2ab* люцерны «transgene-clean»-поколения удалось получить только в случае единичной вставки; в случае множественных вставок, когда наследование признаков не соответствует простым моделям наследования, этого достичь не удалось [32]. Так же не увенчались успехом попытки получить нетрансгенные поколения, наследующие целевые изменения в генах *SIPsy1* томата [55], *GmHen1* люцерны [32] и *GhCLA1* хлопка [56].

Анализ опубликованных исследований показывает, что «очищение» от трансгенных вставок достаточно сложный, трудоемкий и длительный процесс, требующий тщательного молекулярного анализа индивидуальных сеянцев, число которых с каждым поколением возрастает. Присутствие генов устойчивости к антибиотикам или гербицидам в Т-ДНК бинарных векторов, упрощает отбор трансгенных мутантных форм. Однако напрямую использовать эти гены для обнаружения «transgene-clean» поколений не представляется возможным, поскольку после обработки выживают только растения несущие трансгенную последовательность. Не удивительно, что в исследованиях, где проводили геномное редактирование по нескольким генам-мишеням, трансгенная вставка была удалена не всегда. Например, в работе по редактированию восьми различных генов-мишеней арабидопсиса (*AtCHL1*, *AtCHL2*, *AtTT4*, *AtAPI*, *AtGUUS*, *AtJAZ1*, *AtBR11*, *GAI*) очищение от трансгенной вставки в последующем поколении было продемонстрировано только растениями с мутантным геном *AtBR11* [57].

Как показывает опыт некоторых исследований, облегчить поиск нетрансгенных растений можно путем добавления в Т-ДНК неструктивных репортерных генов, например *GFP* или *RFP*. Отсутствие их экспрессии позволяет выявить индивидуальные ГР-растения T_1 – T_3 поколения непосредственно на стадии семян или на ранних стадиях развития растений. В частности, по отсутствию экспрессии *RFP* или *GFP* в семенах успешно осуществлен поиск «transgene-clean» поколений арабидопсиса [58, 59] и огурца [60]. К сожалению, не у всех культурных растений можно обеспечить высокую активность репортерного гена в семенах

по причине естественной автофлуоресценции, а также по причине морфологических особенностей семян, например наличия омертвевших покровных тканей (скорлупы, шелухи и т.п.).

Несколько иной подход был опробован в работе исследователей [61], предложивших добавить в CRISPR конструкцию РНК-интерференционный элемент, который нацелен на инактивацию гена *OsCYP81A6*, кодирующего фитохромный белок P450, обеспечивающий устойчивость к гербицидам. Экспрессия *CYP81A6*–hpRNAi конструкции в трансгенных ГР-растениях риса привела к деградации *OsCYP81A6* транскриптов, в результате чего они стали чувствительны к обработке бентазоном, при этом растения, не наследовавшие трансгенные последовательности, сохранили гербицидную устойчивость [61]. Как и при использовании репортерных генов *GFP* и *RFP*, предложенная стратегия позволяет на 75% сократить число анализируемых растений T_1 – T_2 при условии одиночной трансгенной вставки в первичных растениях T_0 . Ее применение, однако, ограничено наличием генов устойчивости, подобных *OsCYP81A6*, в геномах с.-х. культур.

Еще один способ сократить время и снизить затраты на выявление «transgene-clean» растений в последующих поколениях ГР-растений риса недавно предложил Lu с соавт. [62], обозначив его как «CRISPR-убивающий трансген» (Transgene Killer CRISPR, ТКК). Этот метод позволяет элиминировать растения, содержащие трансгенную вставку благодаря дополнительному включению в вектор для геномного редактирования последовательностей генов *BARNASE* и *CMS2* под контролем тканеспецифичных промоторов. Токсичные белки, кодируемые указанными генами, накапливались только на репродуктивной стадии развития, не оказывая влияние на рост первичных растений и на работу компонентов CRISPR/Cas9. В результате гибели трансгенной пыльцы и зародышей у первичных растений T_0 формировались только семена T_1 , не содержащие трансгенную вставку *CRISPR* + *gRNA* + *BARNASE* + *CMS2*. Такой способ позволил избавиться от трансген-содержащих семян со 100% эффективностью, при этом все развившиеся растения T_1 риса содержали целевые мутации в редактируемом гене-мишени *OsDWARF3* [62]. Несмотря на то, что при использовании подхода «CRISPR-убивающий трансген» число семян/растений T_1 , задействованных в молекулярно-биологическом анализе, сокращается на 75% (при условии однокопийной трансгенной вставки), его применение, как и предыдущих, пока ограничено одной с.-х. культурой.

Общий недостаток описанных выше способов получения «transgene-clean»-растений заключается в неизбежном увеличении размера переносимой Т-ДНК, что значительно осложняет работу генных инженеров по сборке мега-векторов. Кроме того, необходимо отобрать изрядное количество независимых ГР-растений с полноценной вставкой, желательной одиночной, чтобы в последующих поколениях обеспечить выбраковку семян, содержащих трансгены, в соответствии с классическими законами Менделя, а это не всегда удается даже при работе с диплоидными с.-х. культурами.

Получение нетрансгенных («transgene-free») ГР-растений

В настоящее время получены многочисленные подтверждения того, что редактирование генома растений можно успешно проводить без внедрения в растительный геном последовательностей, кодирующих компоненты систем редактирования ДНК. Для этого достаточно обеспечить транзientную экспрессию «инструментов» геномного редактирования в клетках, обладающих хорошей регенерационной способностью [63]. В процессе регенерации целого растения из отредактированной клетки происходит деградация комплекса, использующегося для редактирования генома. Поскольку растение, образовавшееся из такой клетки, не несет чужеродных функциональных вставок, оно больше уже не относится к ГМО. Несмотря на кажущуюся простоту данного способа, осуществить его не просто, поскольку возникает проблема поиска среди огромного числа растений-регенерантов тех, у которых произошло целевое изменение генома. При таком подходе, отсутствуют вспомогательные гены, селективные маркеры, использующиеся при трансгенозе, поэтому необходимы значительные затраты на генотипирование каждого отдельного растения для обнаружения ГР-событий.

Способ доставки компонентов геномного редактирования и обеспечение их эффективной транзientной экспрессии также имеют немаловажное значение. В настоящий момент наибольший прогресс достигнут благодаря прямому переносу «инструментов» геномного редактирования с помощью трансфекции протопластов или путем биобаллистики (табл. 3).

Помимо этого, для транзientной работы компонентов геномного редактирования можно использовать плазмидные и вирусные векторы, которые переносятся в растительные клетки в результате

инокуляции/инфильтрации растений агробактериями. Для получения полноценных ГР-растений каждый из этих способов имеет свои преимущества и недостатки, которые рассмотрим далее.

Прямой способ переноса последовательностей, кодирующих компоненты систем редактирования генома растений

Прямой перенос «инструментов» редактирования в растительные клетки – достаточно универсальный способ, поскольку позволяет доставлять двухкомпонентные нуклеазные системы редактирования в виде ДНК, РНК или рибонуклеопротеиновых комплексов. В случае ДНК обычно используются плазмидные векторы или линейные молекулы. РНК может быть наработана в системе *in vitro* или синтезирована химическим путем, а нуклеаза может быть получена в *E. coli* с помощью экспрессионного вектора или приобретена из коммерческих источников, как в случае белка Cas9.

Прямой перенос компонентов систем редактирования генома в виде ДНК

Плазмидные векторы, содержащие последовательности систем редактирования ДНК, наиболее часто используются для транзientной экспрессии в протопластах и клетках растений. Они позволяют достаточно быстро оценить эффективность использования различных вариантов компонентов редактирования (чаще всего различных гидовых РНК) перед тем, как начинать более сложные эксперименты по получению полноценных ГР-растений. Трансфекция протопластов плазмидными векторами (с помощью ПЭГ или электропорацией) является наиболее распространенным методом для достижения пиковой транзientной экспрессии в клетках растений. Именно благодаря транзientной экспрессии в протопластах впервые была показана принципиальная возможность редактирования генома различных видов растений с помощью систем TALEN [34] и CRISPR/Cas [64]. В настоящий момент возможность использования изолированных протопластов для быстрой оценки эффективности различных вариантов систем редактирования генов в виде плазмидной ДНК продемонстрирована на более чем 30 двудольных и однодольных видах растений [65].

Несмотря на высокую эффективность мутагенеза в протопластах различных видов, успешная регенерация нетрансгенных ГР-растений после трансфекции плазмидными ДНК, кодирующими последовательности «инструментов» геномного редактирования, описана только для трех культур –

Использование транзientной экспрессии нуклеазных систем редактирования ДНК для получения нетрансгенных («transgene-free») растений с отредактированным геномом

The summary of transgene-free events produced through the transient expression of components of genome editing (GE) tools

Культура	Метод доставки	Система редактирования	Модифицированная последовательность (контролируемый признак)	Источник
Транзientная экспрессия ДНК				
Пшеница	Биобаллистический	CRISPR/Cas9	<i>TaGASR7</i> , <i>TaDEP1</i> , <i>TaNAC2</i> , <i>TaPIN1</i> , <i>TaLOX2</i> (изменение морфологии растений, контроль длины и массы зерновок, урожайности)	[67]
		То же	<i>TaDEP1</i> , <i>TaGW2</i> (оптимизация метода ГР)	[69]
		» »	<i>TaLOX2</i> (оптимизация метода ГР)	[68]
Картофель	Трансфекция протопластов	TALEN	<i>StVlnv</i> (изменение состава сахаров)	[36]
		CRISPR/Cas9	<i>StGBSS</i> (изменение синтеза амилозы)	[66]
Лен	То же	То же	<i>EPSPS</i> (устойчивость к гербициду)	[39]
Табак	» »	» »	<i>NtPDS</i> (альбиносный фенотип)	[65]
Транзientная экспрессия РНК				
Пшеница	Биобаллистический	CRISPR/Cas9	<i>TaGASR7</i> (контроль размера зерновок)	[67]
Транзientная экспрессия рибонуклеиновых комплексов (нуклеаза+РНК)				
Пшеница	Биобаллистический	CRISPR/Cas9	<i>TaGW2</i> , <i>TaGASR7</i> (контроль размера зерновок)	[73]
		То же	<i>TaLOX2</i> (оптимизация метода ГР)	[68]
		TALEN	<i>TaGW2</i> (контроль размера зерновок)	[173]
Кукуруза	То же	CRISPR/Cas9	<i>LIG</i> , <i>MS26</i> , <i>MS45</i> (оптимизация метода ГР)	[72]
Латук	Трансфекция протопластов	То же	<i>LsBIN2</i> (регуляция биосинтеза брассиностероидов)	[38]
Картофель	Наночастицы	» »	<i>StPDS</i> (альбиносный фенотип)	[91]
Использование вирусных векторов				
Томат	Репликон джеминивируса VeYDV	TALEN+ CRISPR/Cas9	<i>SlANTI</i> (изменение синтеза антоцианов)	[80]
Транзientная экспрессия в составе плазмидных векторов после ко-культивации с <i>Agrobacterium</i>				
Одуванчик	Ri плазида	CRISPR/Cas9	<i>1-FFT</i> (изменение состава млечного сока)	[87]
Томат	Ti-плазида	То же	<i>LRR-XII</i> (абберантный фенотип)	[88]
Табак	То же	» »	<i>StPDS</i> (альбиносный фенотип)	[89]
Маниок	Ti-плазида + репликон джеминивируса VeYDV	» »	Замена промотора гена <i>EPSPS</i> (усиление устойчивости к гербициду)	[81]

картофеля, льна и табака (см. табл. 3). В 2015 г. благодаря транзientной экспрессии компонентов TALEN+гидовая РНК были получены полноценные растения тетраплоидного картофеля, несущие целевые модификации гена вакуолярной инвертазы *Vlnv*, что позволило сократить уровень акриламида в картофельных чипсах [36]. Эффективность отбора нокаутных растений составила 3% (18 из 600 растений-регенерантов), при этом 39% ГР-растений (7 из 18) не содержали в геноме чужеродных TALEN-последовательностей [36]. Позже, в результате тран-

зientной экспрессии системы CRISPR/Cas9 в протопластах картофеля, были получены растения нокаутные по гену *GBSS* гранул-связанной синтазы крахмала, благодаря чему увеличилось содержание амилопектина в клубнях [66]. В отличие от результатов работы [36], 90% *GBSS*-мутантных растений-регенерантов не содержали стабильную трансгенную вставку, при этом мутации во всех четырех аллелях гена были обнаружены приблизительно у 2% независимых линий [66]. После трансфекции протопластов льна вектором, кодирующим

последовательности CRISPR/Cas9+гидовая РНК, была достигнута направленная модификация чувствительных к глифосату аллелей гена *EPSPS*, благодаря чему нетрансгенные растения «transgene-free» проявляли повышенную устойчивость к гербициду [39]. Транзиентная экспрессия плазмид, несущих последовательности CRISPR/Cas9 и гидовых РНК для нокаута двух генов фитоендесатуразы PDS, позволила получить альбиносные растения табака *Nicotiana benthamiana*, в которых оба гена были выключены [65]. Эффективность образования нокаутных «белых» каллусов из протопластов составила в среднем 29,1%, при этом 83% растений-альбиносов не содержали трансгенную вставку. Интересно отметить, что в случае неполного нокаута аллелей PDS-генов, когда регенеранты сохраняли способность к образованию хлорофилла, доля растений с функциональной вставкой Cas9 оказалась существенно меньшей (2,2%) [65].

Для транзиентной экспрессии плазмидной ДНК в клетках однодольных видов растений так же хорошо подходит биобаллистический метод доставки. С помощью генных пушек на металлических носителях можно переносить компоненты систем редактирования в соматические ткани (листья) или зиготические зародыши, после чего на 1–3-и сутки проводить оценку эффективности направленной сайт-специфической модификации. Аналогично трансфекции протопластов, из-за отсутствия селективного давления после внесения генными пушками компонентов систем редактирования, происходит образование растений с целевыми мутациями, не содержащими трансгенные вставки. Так, в ряде исследований по редактированию гексаплоидных сортов пшеницы доля нетрансгенных растений среди первичных мутантов T₀ достигла 53,8% (*TaDEP1*), 75,0% (*TaNAC2*), 62,5% (*TaPIN1*), 60% (*TaGW2*) и 87–100% (*TaLOX2*) [67–69]. Биобаллистический метод доставки ДНК позволил не только осуществить внесение небольших инсерций или делеций в различные аллели генов-мишеней пшеницы, но и обеспечил точечное изменение единичных нуклеотидов (C→T, A→G, T→C) после того, как к последовательности нуклеазы Cas9 в плазмидных векторах была добавлена последовательность цитидиндеаминазы для работы в клетках слитого белка [69].

Доставка компонентов систем редактирования генома в виде РНК-транскриптов

Возможность использования гидовых РНК, наработанных в системе *in vitro*, для успешного редактирования геномов растений была впер-

вые продемонстрирована при редактировании нескольких генов кукурузы [70]. Эффективность отбора мутантных линий по четырем генам-мишеням кукурузы составила 2,4–9,7%. К сожалению, ГР-растения, полученные в этом исследовании, по-прежнему представляли собой ГМО, поскольку в геном кукурузы была заранее интродуцирована функциональная последовательность нуклеазы Cas9. Вскоре на пшенице было показано, что Cas9 можно успешно экспрессировать путем доставки в клетки информационной РНК, транскрибированной и очищенной *in vitro*. Так, Zhang с соавт. [67] показали, что транзиентная экспрессия РНК транскриптов CRISPR/Cas9, привнесенных в клетки зиготических зародышей пшеницы методом биобаллистики, обеспечивает успешное редактирование гена *TaGW2*, отвечающего за урожайность зерна. Хотя эффективность отбора мутантных «transgene-free» форм была не высокой (1,1%), важно отметить, что треть из них содержала гомозиготные целевые мутации во всех трех элементарных геномах А, В и D гексаплоидной пшеницы [67].

Доставка компонентов систем редактирования генома в виде рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов

Основная идея использования РНП комплексов заключается в том, что один из компонентов систем редактирования, а именно нуклеаза, переносится в клетки непосредственно в виде очищенного функционального белка в смеси с молекулами гидовой РНК. В 2015 г. американской группой исследователей [71] путем трансфекции протопластов двумя мономерами TALEN-белка для направленной модификации гена *NbALS2* ацетолактатсинтазы табака была продемонстрирована возможность его изменения с частотой 1,4%. В том же году исследователи из Кореи [38] осуществили трансфекцию протопластов арабидопсиса, табака, риса и салата-латука предварительно собранным комплексом из белка Cas9 (использовали коммерческий вариант для ядерной локализации) и транскрибированных *in vitro* гидовых РНК, что позволило индуцировать делеции в шести генах-мишенях с частотой 8–44%. Так как целевые изменения обнаруживались уже спустя 24 ч, стало ясно, что РНП комплексы начинают модифицировать последовательность ДНК сразу же после их доставки в протопласты, т.е. еще до того, как начинаются процессы активного клеточного деления. Это открытие позволило исследователям в дальнейшем получить из протопластов латука каллусы, которые

сформировали «transgene-free» растения с моно- и биаллельными мутациями по гену *BIN2* [38].

Группы исследователей из Китая и США для получения нетрансгенных растений использовали баллистический метод доставки РНП комплексов в эмбрионные ткани пшеницы и кукурузы. Так, при использовании очищенной нуклеазы Cas9 в смеси с гидовой РНК были успешно отредактированы гены *LIG*, *MS26* и *MS45* кукурузы [72]. Эффективность отбора ГР-линий оказалась на удивление высокой (от 2,4% до 9,7%), однако большинство регенерированных растений кукурузы (~90%) содержали только моноаллельные мутации. Схожие проблемы возникли при редактировании генома гексаплоидной пшеницы. Направленная модификация по гену *TaGW2* с помощью РНП комплексов не смогла обеспечить индукцию мутаций в одном из трех элементарных геномов (AA) гексаплоидной пшеницы, тогда как в параллельных экспериментах с плазмидной ДНК, доля *TaGW2*-А мутантов достигла 3,8%. В целом, эффективность отбора нетрансгенных мутантных растений пшеницы была высокой, составив 4,4% при редактировании гена *TaGW2*, и 1,4–1,8% – при редактировании гена *TaGASR7* [73].

В своей недавней работе исследователи из Кореи доказали, что для успешной работы РНП комплексов в клетках растений можно использовать гидовые РНК разного происхождения, т.е. они могут быть не только наработаны *in vitro*, но и синтезированы химически [74]. Это стало возможно после того, как нуклеаза Cas9 была заменена на нуклеазу Cpf1, для нормальной работы которой достаточно иметь более короткую последовательность гидовой РНК (40–60 пн против 100 пн). Несмотря на то, что по результатам транзientной экспрессии комплексов Cpf1–gRNA, в протопластах табака и сои не были получены полноценные мутантные растения по целевым генам мишеням *NbAOC* и *GmFAD2*, авторы уверены, что предложенный РНП-вариант будет более востребован, так как позволит осуществлять крупные делеции в целевых последовательностях, трудно достижимые в случае Cas9, и обеспечит более широкий спектр направленной модификации генома растений благодаря механизму гомологичной рекомбинации [74].

Использование вирусных векторов и вирусных репликонов для доставки и работы «инструментов» редактирования генома растений

Еще в 2010 г., до активного распространения технологий CRISPR/Cas, исследовательской группой из Израиля и США было предложено исполь-

зовать вирусные векторы для редактирования растительных геномов с помощью системы ZFN [75]. Расчет был основан на том, что транзientная экспрессия векторов на основе вируса погрешности табака TRV (Tobacco Rattle Virus), содержащих последовательности «инструментов» редактирования генома, обеспечит эффективное редактирование целевых генов в клетках растений. Для подтверждения этого, в геномы табака и петунии была заранее интродуцирована нефункциональная последовательность репортерного гена *GUS*, редактирование которой после внесения TRV–ZFN-вектора через агроинфильтрацию, восстановило его функциональность в соматических клетках. Более того, из тканей этих растений можно было регенерировать полноценные растения, сохраняющие экспрессию гена *GUS*, восстановленного в результате геномного редактирования. Несмотря на то, что в этой работе все растения оставались трансгенными, была впервые продемонстрирована возможность использования вирусных векторов для транзientного геномного редактирования растений [75].

Еще с середины 90-х гг. вирусные векторы стали активно использовать для вирус-индуцибельного замалчивания генов в растениях [76]. Векторы двухцепочечных РНК-вирусов, например TRV, можно доставлять в клетки растений путем инфильтрации смесью двух агробактерий, каждая из которых несет одну из комплементарных однонитчатых молекул РНК генома вируса, называемых RNA1 и RNA2. В работе, описанной выше, именно замена последовательности молекулы RNA2 на последовательность Zif268:FokI ZFN позволила восстановить работу трансгена *GUS*. Позже, вирусный вектор на основе TRV успешно использовали для транзientной экспрессии гидовых РНК, подобранных для редактирования генов *PDS* и *PCNA* трансгенного табака, в который предварительно была перенесена последовательность нуклеазы Cas9 [77]. В листьях трансгенного табака через две недели после агроинфильтрации были обнаружены клетки с целевыми модификациями в генах-мишенях [77]. Несмотря на преимущество вирусных РНК-векторов для нетрансгенного редактирования растительных геномов, с их помощью до сих пор так и не получены полноценные ГР-растения. Причина – ограничение длины гетерологичных последовательностей, которые могут доставлять вирусные векторы. Использование более протяженных последовательностей, например Cas9, приведет к потере рекомбинационных способностей

вирусного вектора и ограничит возможности его системного распространения в растениях.

Векторы на основе ДНК-вирусов, например джеминивирусов, более популярны для осуществления направленной модификации генома растений [78]. Вирусы из этого семейства реплицируются по механизму «катящегося кольца» (rolling circle replication), поэтому способны синтезировать множественные копии репликонов в течение короткого времени, обеспечивая таким образом высокую транзистную экспрессию в растительных клетках. Замена генов, отвечающих за системное распространение вируса, на гетерологичные последовательности «инструментов» геномного редактирования позволяет использовать вирусные репликоны для целевой модификации растений. Благодаря тому, что вирусные репликоны способны обеспечить репарацию молекул ДНК по механизму гомологичной рекомбинации, их можно использовать как для репарации, так и для замены эндогенных последовательностей на экзогенные.

Например, генно-инженерные репликоны на основе VeYDV (Bean Yellow Dwarf Virus) обеспечили в клетках табака достаточную экспрессию ZFNs транскриптов для восстановления прерванной последовательности репортерного гена [79]. VeYDV-репликон успешно использовали для замены эндогенного промотора гена *SLANTI* томата на экзогенный промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV35S promoter), благодаря чему произошло многократное увеличение синтеза антоцианов, что позволило легко отобрать мутантные каллусы и растения [80]. Аналогичным образом наличие модифицированного репликона VeYDV в составе интродуцируемой Т-ДНК повысило устойчивость маниоки к глифосату после замены слабого эндогенного промотора гена *EPSPS* на конститутивный 2×35S промотор [81]. В известных нам работах вирусные репликоны использовали в составе Т-ДНК плазмидных векторов для стабильной интеграции в геном или переносили в растения, уже содержащие функциональные последовательности нуклеаз. Так, будучи частью Т-ДНК плазмид агробактерий, репликоны вирусного вектора VeYDV обеспечили наработку ДНК-матриц для внесения точечных мутаций в ген ацетолататсинтазы картофеля ALS1 [82], а также генов каротиноид изомеразы CRTISO и фитоен синтазы PSY1 томата [83]. Модифицированный вектор CaLCuV (Cabbage Leaf Curl Virus) использовали для экспрессии гидовых РНК, нацеленных на модификацию генов

NbPDS3 и *NbIspH* в трансгенном табаке, стабильно экспрессирующем Cas9 [84]. Транзистная экспрессия репликонов вируса WDV в каллусах пшеницы и риса обеспечила изменение экспрессии репортерных генов *GFP/GUS* [85, 86]. Пока преждевременно говорить о том, что вирусные векторы или их репликоны позволили получить полноценные нетрансгенные растения. С некоторой натяжкой можно признать таковыми растения с измененной экспрессией гена *SLANTI*, однако привнесенная в геном томата последовательность промотора 35S все же является чужеродной [80].

Транзистная экспрессия векторов с использованием Ti- и Ri-плазмид агробактерий

Как известно, бинарные векторы с использованием Ti- и Ri-плазмид *A. tumefaciense* и *A. rhizogenes* являются наиболее распространенным носителем «инструментов» редактирования для получения ГР-растений (см. табл. 3). Помимо этого, они уже более 35 лет рутинно используются с целью получения трансгенных растений для различных фундаментальных и прикладных исследований. Важным условием успешной генетической трансформации является наличие достаточного количества восприимчивых к агробактериям клеток/тканей растений, демонстрирующих транзистную экспрессию переносимых в составе Т-ДНК конструкций. Общепринято, что чем больше таких клеток, тем выше вероятность селективного отбора растений-регенерантов со стабильной вставкой. Поскольку нуклеазные системы могут обеспечить редактирование ДНК клетки в течение короткого времени, в ряде публикаций последних лет уже показана возможность применения агробактериальных векторных систем для получения ГР-растений без стабильной вставки Т-ДНК. Так, в 2016 г. были получены полноценные нетрансгенные ГР-растения одуванчика, нокаутные по гену биосинтеза инулина 1-FFT, в результате регенерации из бородатых корней, образовавшихся после транзистной экспрессии Ri-плазмиды *A. rhizogenes* [87]. Несмотря на то, что в указанном исследовании не приводятся данные об эффективности регенерации растений, в этой работе впервые была продемонстрирована возможность получения нетрансгенных ГР-растений в результате использования стандартных подходов агробактериальной трансформации в отсутствие селективного давления. Нетрансгенные растения были также получены в результате геномного редактирования гена *EPSPS* маниоки [81] и гена

LRR-XII томата [88]. В этих работах отбор растений после агробактериальной трансформации велся без использования генов селективных маркеров, непосредственно по проявлению мутантных признаков (устойчивости к гербициду или абберрантному фенотипу). В результате, некоторые из первичных растений-регенерантов оказались свободными от последовательностей компонентов геномного редактирования, переносимых в Т-ДНК вектора. В недавней работе, целенаправленно посвященной регенерации нетрансгенных растений табака без селективного давления, после агробактериальной трансформации вектором, несущим компоненты системы CRISPR/Cas для редактирования гена *PDS*, доля мутантных растений, не содержащих функциональных чужеродных вставок, составила 17,2% [89].

Перспективы развития нетрансгенных биотехнологий геномного редактирования

Несмотря на то, что технологии геномного редактирования постоянно совершенствуются, проблема получения нетрансгенных ГР-растений различных сортов сельскохозяйственных культур по-прежнему остро стоит перед исследователями, работающими в этой области. В большинстве случаев геномное редактирование является частью трансгенных технологий, поскольку технически достигается с помощью хорошо зарекомендовавших себя методов генетической трансформации.

Анализ научных публикаций последних десяти лет показывает, что, несмотря на расширение арсенала способов получения ГР-форм, не содержащих трансгенные вставки, доля таких растений по-прежнему не велика (см. рис. 4). С одной стороны, в исследованиях, которые посвящены разработке и оптимизации «инструментов» геномного редактирования или поиску/изучению функций генов растений, нет острой необходимости в получении нетрансгенных растений. С другой стороны, чтобы получить нетрансгенные ГР-растения, приходится выбирать между двумя альтернативными путями: получать стабильные трансгенные образцы и «очищать» их тем или иным способом в последующих поколениях, либо использовать безселективные методы прямого переноса «компонентов» редактирования ДНК и проводить масштабное и затратное генотипирование большого числа первичных растений.

Получение «*transgene-clean*» растений целесообразно в тех случаях, когда модификация генома имеет перспективу дальнейшего практического использования в селекционных программах.

Напомним, что в подавляющем большинстве работ исследователи проводили выбраковку трансгенных растений по результатам молекулярного анализа на присутствие последовательностей Т-ДНК, кодирующих компоненты редактирования генома или генов селективных маркеров. Недавнее исследование на рапсе [90] показало, что этого может быть недостаточно. Геномное секвенирование растений рапса освобожденных от последовательностей Т-ДНК обнаружило в некоторых из них присутствие нецелевых фрагментов плазмиды, а именно регионов кодирующих бактериальный сайт репликации, необходимый для наработки вектора в агробактериях. Таким образом, чтобы гарантировать полное очищение генома растений от вспомогательных последовательностей, необходимо проверять не только наличие кодирующих компонентов редактирования генома и вспомогательных последовательностей Т-ДНК, но и других участков векторов. Это, в свою очередь, существенно усложняет поиск «*transgene-clean*» растений, а также снижает их количество, особенно у полиплоидных видов растений.

Существует мнение, что прямой перенос РНП-комплексов в клетки растений позволит упростить подготовительные процедуры геномного редактирования, поскольку сократится количество генно-инженерных манипуляций, необходимых для создания плазмидных векторов, обеспечивающих высокую экспрессию нуклеаз и гидовых РНК в клетках определенного вида растений (подбор промотора, терминатора, спейсеров, интронов и т.д.) [19]. Вместо этого, достаточно заранее приобрести нуклеазу, наработать *in vitro* гидовую РНК (коммерческие наборы уже доступны на рынке) или синтезировать ее химически, сформировать на их основе РНП-комплекс и доставить в регенерирующие клетки растений. К сожалению, проблема прямой доставки «инструментов» редактирования ДНК в растительные клетки и обеспечение после этого полноценной регенерации пока еще не решена. Подходы, основанные на трансфекции изолированных протопластов и доставки с помощью генных пушек, хороши для проверки работоспособности компонентов редактирования, но ограничены небольшим числом с.-х. культур, способных регенерировать растения. Помимо этого, в исследованиях, описывающих баллистический перенос «инструментов» редактирования генома, авторы не всегда корректно оценивают эффективность, указывая частоту отбора мутантных форм (от 1 до 10%) в расчете на количество эксплантов [67, 68, 73].

На самом деле, при отсутствии селективного давления, один морфогенный эксплант кукурузы или пшеницы способен образовать от 5 до 20 растений-регенерантов, таким образом, реальная эффективность отбора мутантных форм оказывается значительно ниже. С учетом того, что прямой перенос требует хорошего технического обеспечения для выполнения манипуляций с протопластами и генными пушками, не удивительно, что доля нетрансгенных ГР-растений, полученных таким способом, крайне мала (см. рис. 4, табл. 3). В качестве перспективного и технически более простого инструмента для прямой доставки РНП в клетки растений можно рассмотреть полимерные системы, например наночастицы и нанокапсулы. В частности, в недавней работе показана возможность редактирования гена *StPDS* путем инфильтрации меристем картофеля смесью наночастиц хитозана с макромолекулами элементов системы CRISPR/Cas9 [91].

Методология использования вирусных векторов и/или их репликонов для получения полноценных нетрансгенных растений пока также далека от широкого практического использования. Необходимо найти способы увеличения размера последовательностей вирусных векторов, в особенности РНК-вирусов, которые более всего подходят для непосредственного получения нетрансгенных растений.

Несмотря на то, что вирусные ДНК-векторы, в частности на основе джеминивирусов, могут нести более длинные последовательности, их транзистная экспрессия, например через агроинфильтрацию, также имеет ряд ограничений. Во-первых, агроинфильтрация применима к ограниченному числу видов растений, в которые не входят многие с.-х. культуры, включая зерновые. Во-вторых, при транзистной экспрессии обезруженных векторов джеминивирусов, их работа ограничивается только локальными очагами инфицированных тканей. Дальнейшее распространение белков от клетки к клетке, включая необходимые для геномного редактирования белки Cas9 или TALEN, ограничивается отсутствием вирусных компонентов, ответственных за системное заражение. С другой стороны, без удаления этих вирусных последовательностей невозможно сконструировать вектор, содержащий полную последовательность двухкомпонентных систем редактирования генома. При этом следует помнить, что ткани, подвергнутые заражению штаммами, несущими гены системного распространения, регенерируют растения с низкой эффективностью [78].

Транзистная экспрессия «инструментов» редактирования в составе плазмидных Ti- или Ri-векторов, переносимых в клетки растений в результате ко-культивации с агробактериями, в ближайшее время, возможно, станет одним из самых простых и доступных способов получения нетрансгенных мутантных форм. Уже ведутся активные генно-инженерные работы, направленные на модификацию *VirD2* генов Ti-плазмид агробактериальных штаммов, ответственных за встраивание T-ДНК в ядро растительных клеток [92]. В случае успеха этих работ, исследователям будут доступны агробактериальные штаммы, которые смогут доставлять в растительные клетки плазмидную ДНК, кодирующую последовательности «инструментов» геномного редактирования без последующей их интеграции в геном растений. В дальнейшем использование таких агробактериальных штаммов в сочетании со стандартными методами регенерации значительно расширит возможности получения нетрансгенных биотехформ культурных растений с различными улучшенными характеристиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 16-16-04019).

ЛИТЕРАТУРА

1. Feng Z.Y., Zhang B.T., Ding W.N., et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.*, 2013, 23, 1229–32. doi: 10.1038/cr.2013.114
2. Shan Q., Wang Y., Li J., et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(8), 686–688. doi: 10.1038/nbt.2650
3. Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(8), 691–693. doi: 10.1038/nbt.2655
4. Davies J.P., Kumar S., Sastry-Dent L. Use of Zinc-finger nucleases for crop improvement. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2017, 149, 47–63. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.006
5. Khan Z., Khan S.H., Mubarak M.S., et al. Use of TALEs and TALEN technology for genetic improvement of plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2017, 35(1), 1–19. doi: 10.1007/s11105-016-0997-8
6. Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., et al. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol.*, 2015, 32, 76–84. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.007
7. Scheben A., Wolter F., Batley J., et al. Towards CRISPR/Cas crops - bringing together genomics and genome editing. *New Phytologist*, 2017, 216, 682–698. doi: 10.1111/nph.14702

8. Jaganathan D., Ramasamy K., Sellamuthu G., et al. CRISPR for crop improvement: an update review. *Front. Plant Sci.*, 2018, 9, 985. doi: 10.3389/fpls.2018.00985
9. Schindele P., Wolter F., Puchta H. Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS Lett.*, 2018, 592(12), 1954–1967. doi: 10.1002/1873-3468.13073.
10. Romay G., Bragard C. Antiviral defenses in plants through genome editing. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 47. doi: 10.3389/fmicb.2017.00047
11. Zhang H., Zhang J., Lang Z., et al. Genome editing—principles and applications for functional genomics research and crop improvement. *Critical Rev. in Plant Sci.*, 2017, 36(4), 291–309. doi: 10.1080/07352689.2017.1402989
12. Arora L., Narula A. Gene Editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8, 1932. doi: 10.3389/fpls.2017.01932
13. Mushtaq M., Bhat J.A., Mir Z.A., et al. CRISPR/Cas approach: A new way of looking at plant-abiotic interactions. *J. Plant Physiol.*, 2018, (224–225), 156–162. doi: 10.1016/j.jplph.2018.04.001.
14. Jiang W.Z., Henry I.M., Lynagh P.G., et al. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 159(5), 648–657. doi: 10.1111/pbi.12663
15. Walts E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(1), 6–7. doi: 10.1038/nbt0118-6b
16. Jansson S. Gene-edited plants on the plate: the ‘CRISPR cabbage story’. *Physiol. Plant.*, 2018, 164(4), 396–495. doi: 10.1111/ppl.12754
17. Callaway E. CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. *Nature.*, 2018, 560(7716), 16. doi: 10.1038/d41586-018-05814-6
18. Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D., Drews, G.N. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 2232–2237. doi: 10.1073/pnas.0409339102
19. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., и др. CRISPR/Cas редактирование геномов растений. *Биомика*, 2017, 9(3), 155–182.
20. Yamaguchi Y.L., Ishida T., Yoshimura M., et al. A collection of mutants for CLE-peptide-encoding genes in *Arabidopsis* generated by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Plant Cell Physiol.*, 2017, 58(11), 1848–1856. doi: 10.1093/pcp/pcx13
21. Zhang H., Zhang J.S., Wei P.L., et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J.*, 2014, 12, 797–807. doi: 10.1111/pbi.12200
22. Qi W., Zhu T., Tian Z., et al. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.*, 2016, 16(1), 58. doi: 10.1186/s12896-016-0289-2
23. Kaya H., Mikami M., Endo A., et al. Highly specific targeted mutagenesis in plants using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 26871. doi: 10.1038/srep26871
24. Ma X.L., Zhang Q.Y., Zhu Q.L., et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant*, 2015, 8(8), 1274–1284. doi: 10.1016/j.molp.2015.04.007
25. Lowder L.G., Zhang D.W., Baltes N.J., et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol.*, 2015, 169, 971–985. doi: 10.1104/pp.15.00636
26. Shan Q.W., Wang Y.P., Li J., Gao C.X. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.*, 2014, 9, 2340–2395. doi: 10.1038/nprot.2014.157
27. Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.*, 2014, 14, 327. doi: 10.1186/s12870-014-0327-y
28. Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., et al. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.*, 2015, 16, 258. doi: 10.1186/s13059-015-0826-7
29. Cigan A.M., Singh M., Benn G., et al. Targeted mutagenesis of a conserved anther-expressed P450 gene confers male sterility in monocots. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15, 379–389. doi: 10.1111/pbi.12633
30. Holme I.B., Wendt T., Gil-Humanes J., et al. Evaluation of the mature grain phytase candidate HvPAPHy_a gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol. Biol.*, 2017, 95(1–2), 111–121. doi: 10.1007/s11103-017-0640-6
31. Wang Y., Cheng X., Shan Q., et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32, 947–951. doi: 10.1038/nbt.2969
32. Curtin S.J., Xiong Y., Michno J.M., et al. CRISPR/Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(6), 1125–1137. doi: 10.1111/pbi.12857
33. Gallego-Bartolomé J., Gardiner J., Liu W., et al. Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain. *PNAS*, 2018, 115(9), 2125–2134. doi: 10.1073/pnas.1716945115
34. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(11), e82. doi: 10.1093/nar/gkr218
35. Li T., Liu B., Spalding M.H., et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistance. *Nat. Biotechnol.*, 2012, 30, 390–392. doi: 10.1038/nbt.2199
36. Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.*, 2016, 14, 169–176. doi: 10.1111/pbi.12370

37. Li J., Stoddard T.J., Demorest Z.L., et al. Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. *Plant Biotechnol. J.*, 2016, 14, 533–542. doi: 10.1111/pbi.12403
38. Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33(11), 1162–1164. doi: 10.1038/nbt.3389
39. Sauer N.J., Narváez-Vásquez J., Mozoruk J., et al. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiol.*, 2016, 170(4), 1917–1928. doi: 10.1104/pp.15.01696
40. Zhang Q., Xing H.L., Wang Z.P., et al. Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. *Plant Mol. Biol.*, 2018, 96, 445–456. doi: 10.1007/s11103-018-0709-x
41. Zhang H.Y., Wang X.H., Dong L., et al. MISSA 2.0: an updated synthetic biology toolbox for assembly of orthogonal CRISPR/Cas systems. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 41993. doi: 10.1038/srep41993
42. Xu R.F., Li H., Qin R.Y., et al. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 11491. doi: 10.1038/srep11491
43. Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 1998, 16, 735–743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
44. de Pater S., Neuteboom L.W., Pinas J.E., et al. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotech. J.*, 2009, 7, 821–835. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00446.x
45. Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.*, 2016, 17(7), 1140–1153. doi: 10.1111/mpp.12375
46. Gao Y., Zhang Y., Zhang D., et al. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112(7), 2275–2280. doi: 10.1073/pnas.1500365112
47. Shi J., Gao H., Wang H., et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR/Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(2), 207–216. doi: 10.1111/pbi.12603
48. Okuzaki A., Ogawa T., Koizuka C., et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 2018, 131, 63–69. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.025
49. Klap C., Yeshayahou E., Bolger A.M., et al. Tomato facultative parthenocarpy results from SI *AGAMOUS-LIKE 6* loss of function. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(5), 634–647. doi: 10.1111/pbi.12662
50. Rodríguez-Leal D., Lemmon Z.H., Man J., et al. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 2017, 171(2), 470–480. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.030
51. Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant. Biotechnol. J.*, 2018, 16(4), 902–910. doi: 10.1111/pbi.12837
52. Ran Y., Patron N., Kay P., et al. Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant. Biotechnol. J.*, 2018, 16(12), 2088–2101. doi: 10.1111/pbi.12941
53. Li T., Liu B., Chen C.Y., Yang B. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. *J. Genet. Genomics*, 2016, 43, 297–305. doi: 10.1016/j.jgg.2016.03
54. Blanvillain-Baufumé S., Reschke M., Solé M., et al. Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(3), 306–317. doi: 10.1111/pbi.12613
55. D’Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G. CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Res.*, 2018, 27(4), 367–378. doi: 10.1007/s11248-018-0079-9
56. Wang P., Zhang J., Sun L., et al. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(1), 137–150. doi: 10.1111/pbi.12755
57. Feng Z., Mao Y., Xu N., et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 25, 111(12), 4632–4637. doi: 10.1073/pnas.1400822111
58. Tsutsui H., Higashiyama T. pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 2017, 58(1), 46–56. doi: 10.1093/pcp/pcw191
59. Gao X., Chen J., Dai X., et al. An effective strategy for reliably isolating heritable and *Cas9*-free *Arabidopsis* mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Physiol.*, 2016, 171(3), 1794–1800. doi: 10.1104/pp.16.00663
60. Hu B., Li D., Liu X., et al. Engineering non-transgenic gynoecious cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.*, 2017, 10(12), 1575–1578. doi: 10.1016/j.molp.2017.09.005
61. Lu H.P., Liu S.M., Xu S.L., et al. CRISPR-S: an active interference element for a rapid and inexpensive selection of genome-edited, transgene-free rice plants. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(11), 1371–1373. doi: 10.1111/pbi.12788
62. He Y., Zhu M., Wang L., Wu J., et al. Programmed self-elimination of the CRISPR/Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants. *Mol. Plant.*, 2018, 11(9), 1210–1213. doi: 10.1016/j.molp.2018.05.005

63. Ran Y., Liang Z., Gao C. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. *Sci. China Life Sci.*, 2017, 60(5), 490–505. doi: 10.1007/s11427-017-9022-1
64. Jiang W., Zhou H., Bi H., et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41(20), e188. doi: 10.1093/nar/gkt780
65. Lin C.S., Hsu C.T., Yang L.H., et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(7), 1295–1310. doi: 10.1111/pbi.12870
66. Andersson M., Turesson H., Nicolia A., et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2017, 36(1), 117–128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3
67. Zhang Y., Liang Z., Zong Y., et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 12617. doi: 10.1038/ncomms12617
68. Zong Y., Wang Y., Li C., et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9- cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(5), 438–440. doi: 10.1038/nbt.3811
69. Li C., Zong Y., Wang Y., et al. 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
70. Svitashv S., Young J.K., Schwartz C., et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.*, 2015, 169(2), 931–945. doi: 10.1104/pp.15.00793
71. Luo S., Li J., Stoddard T.J., et al. Non-transgenic plant genome editing using purified sequence-specific nucleases. *Mol. Plant*, 2015, 8(9), 1425–1427. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.012
72. Svitashv S., Schwartz C., Lenderts B., et al. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 13274. doi: 10.1038/ncomms13274
73. Liang Z., Chen K., Li T., et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 14261. doi: 10.1038/ncomms14261
74. Kim H., Kim S.T., Ryu J., et al. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat. Commun.*, 2017, 16(8), 14406. doi: 10.1038/ncomms14406
75. Marton I., Zuker A., Shklarman E.A. Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol.*, 2010, 154(3), 1079–1087. doi: 10.1104/pp.110.164806
76. Kumagai M.H., Donson J., della-Cioppa G., et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 1679–1683.
77. Ali Z., Abul-faraj A., Li L., et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant*, 2015, 8(8), 1288–1291. doi: 10.1016/j.molp.2015.02.011
78. Zaidi S.S., Mansoor S. Viral vectors for plant genome engineering. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8, 539. doi: 10.3389/fpls.2017.00539
79. Baltes N.J., Gil-Humanes J., Cermak T., et al. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 2014, 26, 151–163. doi: 10.1105/tpc.113.119792
80. Cermak T., Baltes N.J., Cegan R., et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.*, 2015, 16, 232. doi: 10.1186/s13059-015-0796-9
81. Hummel A.W., Chauhan R.D., Cermak T., et al. Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16, 1275–1282. doi: 10.1111/pbi.12868
82. Butler N.M., Baltes N.J., Voytas DF., Douches D.S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7, 1045. doi: 10.3389/fpls.2016.01045
83. Dahan-Meir T., Filler-Hayut S., Melamed-Bessudo C., et al. Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *Plant J.*, 2018, 95(1), 5–16. doi: 10.1111/tpj.13932.
84. Yin K., Han T., Liu G., et al. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 14926. doi: 10.1038/srep14926
85. Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J.*, 2017, 89, 1251–1262. doi: 10.1111/tpj.13446
86. Wang M., Lu Y., Botella J., et al. Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant*, 2017, 10(7), 1007–1010. doi: 10.1016/j.molp.2017.03.002
87. Iaffaldano B., Zhang Y., Cornish K. CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection. *Ind. Crops Prod.*, 2016, 89, 356–362. doi: 10.1016/j.inderop.2016.05.029
88. Jacobs T.B., Zhang N., Patel D., Martin G.B. Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries. *Plant. Physiol.*, 2017, 174(4), 2023–2037. doi: 10.1104/pp.17.00489
89. Chen L., Li W., Katin-Grazzini L., et al. A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants. *Hortic. Res.*, 2018, 5, 13. doi: 10.1038/s41438-018-0023-4
90. Braatz J., Harloff H.J., Mascher M., et al. CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol.*, 2017, 174(2), 935–942. doi: 10.1104/pp.17.00426

91. Хромов А.В., Махотенко А.В., Снигирь Е.А., и др. Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum*. *Биотехнология*, 2018, 34(6), 51–58. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-51-58
92. Lee L.Y., Mysore K., Gelvin S. Generation of Agrobacterium strains that efficiently introduce but don't integrate T-DNA into the plant genome. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant*, 2018, 54 (Suppl. 1), S88. doi: 10.1007/s11627-018-9923-0
93. Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245), 437–441. doi: 10.1038/nature07992
94. Cai C.Q., Doyon Y., Ainley W.M., et al. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol. Biol.*, 2009, 69(9), 699–709. doi: 10.1007/s11103-008-9449-7
95. Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J. Genet Genomics*, 2014, 41(2), 63–68. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001
96. Sun Z., Li N., Huang G., et al. Site-specific gene targeting using transcription activator-like effector (TALE)-based nuclease in *Brassica oleracea*. *J. Integr. Plant Biol.*, 2013, 55(11), 1092–1103. doi: 10.1111/jipb.12091
97. Wendt T., Holm P.B., Starker C.G., et al. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol. Biol.*, 2013, 83(3), 279–285. doi: 10.1007/s11103-013-0078-4
98. Johnson R.A., Gurevich V., Filler S., et al. Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta. *Plant Mol. Biol.*, 2015, 87(1–2), 143–56. doi: 10.1007/s11103-014-0266-x
99. Haun W., Coffman A., Clasen B.M., et al. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol. J.*, 2014, 12(7), 934–940. doi: 10.1111/pbi.12201
100. Lor V.S., Starker C.G., Voytas D.F., et al. Targeted mutagenesis of the tomato PROCERA gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiol.*, 2014, 166(3), 1288–1291. doi: 10.1104/pp.114.247593
101. Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z.B., et al. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol.*, 2014, 166(3), 1292–1297. doi: 10.1104/pp.114.247577
102. Peer R., Rivlin G., Golobovitch S., et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta*, 2015, 241(4), 941–951. doi: 10.1007/s00425-014-2224-x
103. Jia H., Orbovic V., Jones J.B., Wang N. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4:dCsLOB1.3 infection. *Plant Biotechnol. J.*, 2016, 14, 1291–1301. doi: 10.1111/pbi.12495
104. Butler N.M., Atkins P.A., Voytas D.F., Douches D.S. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS One*, 2015, 10(12), e0144591. doi: 10.1371/journal.pone.0144591
105. Li Z.S., Liu Z.B., Xing A.Q., et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.*, 2015, 169, 960–70. doi: 10.1104/pp.15.00783
106. Hilioti Z., Ganopoulos I., Ajith S., et al. A novel arrangement of zinc finger nuclease system for *in vivo* targeted genome engineering: the tomato LEC1-LIKE4 gene case. *Plant Cell Rep.*, 2016, 35(11), 2241–2255. doi: 10.1007/s00299-016-2031-x
107. Tian S., Jiang L., Gao Q., et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep.*, 2017, 36(3), 399–406. doi: 10.1007/s00299-016-2089-5
108. Ren C., Liu X., Zhang Z., et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Rep.*, 2016, 6, 32289. doi: 10.1038/srep32289
109. Meng Y., Hou Y., Wang H., et al. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.*, 2017, 36(2), 371–374. doi: 10.1007/s00299-016-2069-9
110. Wang L., Wang L., Tan Q., et al. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in lotus japonicus using CRISPR-Cas9. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7, 1333. doi: 10.3389/fpls.2016.013
111. Alagoz Y., Gurkok T., Zhang B., Unver T. Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 30910. doi: 10.1038/srep30910
112. Zhang B., Yang X., Yang C., et al. Exploiting the CRISPR/Cas9 System for targeted genome mutagenesis in petunia. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 20315. doi: 10.1038/srep20315
113. Nishitani C., Hirai N., Komori S., et al. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 31481. doi: 10.1038/srep31481
114. Jung J.H., Altpeter F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant Molecular Biology*. 2016, 92(1), 131–142. doi: 10.1007/s11103-016-0499-y
115. Peng A., Chen S., Lei T., et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(12), 1509–1519. doi: 10.1111/pbi.12733
116. Kaur N., Alok A., Shivani, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in *phytoene desaturase* (*PDS*) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. *Funct. Integr. Genomics*, 2018, 18, 89. doi: 10.1007/s10142-017-0577-5

117. Watanabe K., Kobayashi A., Endo M., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B* (DFR-B) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis)* nil. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 10028. doi: 10.1038/s41598-017-10715-1
118. Kui L., Chen H., Zhang W., et al. Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale*. *Front. Plant Sci.*, 2017, 7, 2036. doi: 10.3389/fpls.2016.02036
119. Odipio J., Alicai T., Ingelbrecht I., et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in cassava. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8, 1780. doi: 10.3389/fpls.2017.01780
120. Liu Y., Merrick P., Zhang Z., et al. Targeted mutagenesis in tetraploid switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 2018, 16(2), 381–393. doi: 10.1111/pbi.12778
121. Zhou X., Jacobs T. B., Xue L. J., et al. Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol.*, 2015, 208, 298–301. doi: 10.1111/nph.13470
122. Kishi-Kaboshi M., Aida R., Sasaki K. Generation of gene-edited *Chrysanthemum morifolium* using multiplex transgenes as targets and markers. *Plant Cell Physiol.*, 2017, 58(2), 216–226, doi: 10.1093/pcp/pcw222
123. Wen, S., Liu, H., Li, X. et al. TALEN-mediated targeted mutagenesis of fatty acid desaturase 2 (FAD2) in peanut (*Arachis hypogaea* L.) promotes the accumulation of oleic acid. *Plant Mol. Biol.*, 2018, 97, 177. doi: 10.1007/s11103-018-0731-z
124. Feng S., Song W., Fu R., et al. Application of the CRISPR/Cas9 system in *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2018, 135(1), 133–141. doi: 10.1007/s11240-018-1450-5
125. Zhou J., Wang G., Liu Z. Efficient genome editing of wild strawberry genes, vector development and validation. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(11), 1868–1877. doi: 10.1111/pbi.12922
126. Wang Z., Wang S., Li D., et al. Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in kiwifruit. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(8), 1424–1433. doi: 10.1111/pbi.12884
127. Breitler J.C., Dechamp E., Campa C., et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2018, 134(3), 383–394. doi: 10.1007/s11240-018-1429-2
128. Cai L., Zhang L., Fu Q., Xu Z.F. Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes *IPTs*, *CYP735A* and *CKXs* in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Peer J.* 2018, 6:e4812. doi: 10.7717/peerj.4812
129. de Pater S., Pinas J.E., Hooykaas P.J.J., van der Zaal B.J. ZFN mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol. J.*, 2013, 11, 510–515. doi: 10.1111/pbi.12040
130. Jiang Y., Juan Wang J., Xie Y. ADF10 shapes the overall organization of apical actin filaments by promoting their turnover and ordering in pollen tubes. *J. Cell Sci.*, 2017, 130, 3988–4001. doi:10.1242/jcs.207738
131. Hyun Y., Kim J., Cho S.W., et al. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*, 2015, 241, 271–284. doi: 10.1007/s00425-014-2180-5
132. Yan L.H., Wei S.W., Wu Y.R., et al. High efficiency genome editing in *Arabidopsis* using Yao promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.*, 2015, 8, 1820–1823. doi: 10.1016/j.molp.2015.10.00
133. Pyott D.E., Sheehan E., Molnar A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant Pathology*. 2016, 17(8), 1276–1288. doi: 10.1111/mpp.12417
134. Jia Y., Ding Y., Shi Y., et al. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 2016, 212, 345–353. doi: 10.1111/nph.14088
135. Veillet F., Gaillard C., Coutos-Thévenot P., La Camera S. Targeting the AtCWIN1 gene to explore the role of invertases in sucrose transport in roots and during *Botrytis cinerea* infection. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7, 1899. doi: 10.3389/fpls.2016.01899
136. Ordon J., Gantner J., Kemna J., et al. Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *Plant J.*, 2017, 89(1), 155–168. doi: 10.1111/tpj.13319
137. Steinert J., Schmidt C., Puchta H. Use of the Cas9 orthologs from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus* for non-homologous end-joining mediated site-specific mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol.*, 2017, 1669, 365–376. doi: 10.1007/978-1-4939-7286-9_27
138. Hahn F., Mantegazza O., Greiner A., et al. An efficient visual screen for CRISPR/Cas9 activity in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.*, 2017, 8, 39. doi: 10.3389/fpls.2017.00039
139. Liang Y., Zeng X., Peng X., et al. *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase 1 (Ler) mutants generated by CRISPR/Cas9 and their characteristics. *Transgenic Res.*, 2018, 27(1), 61–79. doi: 10.1007/s11248-017-0052-z
140. Saito M., Kondo Y., Fukuda H. BES1 and BZR1 redundantly promote phloem and xylem differentiation. *Plant Cell Physiol.*, 2018, 59(3), 590–600. doi: 10.1093/pcp/pcy012

141. Durr J., Papareddy R., Nakajima K., Gutierrez-Marcos J. Highly efficient heritable targeted deletions of gene clusters and non-coding regulatory regions in *Arabidopsis* using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.*, 2018, 8, 4443. doi: 10.1038/s41598-018-22667-1
142. Pauwels L., De Clercq R., Goossens J., et al. A dual sgRNA approach for functional genomics in *Arabidopsis thaliana*. *G3*, 2018, 8(8), 2603–2615. doi: 10.1534/g3.118.200046
143. Wolter F., Klemm J., Puchta H. Efficient in planta gene targeting in *Arabidopsis* using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. *Plant J.*, 2018, 94(4), 735–746. doi: 10.1111/tpj.13893
144. Kapusi E., Corcuera-Gómez M., Melnik S., Stoger E. Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENCase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Front Plant Sci.*, 2017, 8, 540. doi: 10.3389/fpls.2017.00540
145. Kumar N., Galli M., Ordon J., et al. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnol J.*, 2018, 16(11), 1892–1903. doi: 10.1111/pbi.12924
146. Shibuya K., Watanabe K., Ono M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the EPHEMERAL1 locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiol. Biochem.*, 2018, 131, 53–57. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.036
147. Zhu J., Song N., Sun S., et al. Efficiency and inheritance of targeted mutagenesis in maize using CRISPR-Cas9. *J. Genet. Genomics*, 2016, 43(1), 25–36. doi: 10.1016/j.jgg.2015.10.006
148. Char S.N., Neelakandan A.K., Nahampun H., et al. An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(2), 257–268. doi: 10.1111/pbi.12611
149. Yang Y., Zhu K., Li H., et al. Precise editing of CLAVATA genes in *Brassica napus* L. regulates multilocular silique development. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(7), 1322–1335. doi: 10.1111/pbi.12872
150. Demorest Z.L., Coffman A., Baltus N.J., et al. Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil. *BMC Plant Biology*, 2016, 16, 225. doi: 10.1186/s12870-016-0906-1
151. Cai Y., Chen L., Liu X., et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(1), 176–185. doi: 10.1111/pbi.12758
152. Kanazashi Y., Hirose A., Takahashi I., et al. Simultaneous site-directed mutagenesis of duplicated loci in soybean using a single guide RNA. *Plant Cell Rep.*, 2018, 37(3), 553–563. doi: 10.1007/s00299-018-2251-3
153. Gao J., Zhang T., Xu B., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage Dioxygenase 8 (CCD8) in tobacco affects shoot and root architecture. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(4). doi: 10.3390/ijms19041062
154. Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, 467(1), 76–82. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.117
155. Pan C., Ye L., Qin L., et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 24765. doi: 10.1038/srep24765
156. Yu Q.H., Wang B., Li N., et al. CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 11874. doi: 10.1038/s41598-017-12262-1
157. Nekrasov V., Wang C., Win J., Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 482. doi: 10.1038/s41598-017-00578-x
158. Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M., et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(5), 441–443. doi: 10.1038/nbt.3833
159. Deng L., Wang H., Sun C., et al. Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *J. Genet. Genomics*, 2018, 45(1), 51–54. doi: 10.1016/j.jgg.2017.10.002
160. Wang M., Liu Y., Zhang C., et al. Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice *OsEPSPS* gene and the inheritance of mutations. *PLoS ONE*, 2015, 10(4), e0122755. doi: 10.1371/journal.pone.0122755
161. Shan Q., Zhang Y., Chen K., et al. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol. J.*, 2015, 13, 791–800. doi: 10.1111/pbi.12312
162. Wang F., Wang C., Liu P., et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS ONE*, 2016, 11(4), e0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027
163. Zhou H., He M., Li J., et al. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated *TMS5* editing system. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 37395. doi: 10.1038/srep37395
164. Xu R., Yang Y., Qin R., et al. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genomics*, 2016, 43(8), 529–532. doi: 10.1016/j.jgg.2016.07.003
165. Xu R., Qin R., Li H., et al. Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15, 713–717 doi: 10.1111/pbi.12669

166. Yin X., Biswal A.K., Dionora J., et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice. *Plant. Cell Rep.*, 2017, 36(5), 745–757. doi: 0.1007/s00299-017-2118-z
167. Minkenberg B., Xie K., Yang Y. Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. *Plant J.*, 2017, 89(3), 636–648. doi: 10.1111/tpj.13399
168. Sun Y., Jiao G., Liu Z., et al. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8, 298. doi: 10.3389/fpls.2017.00298
169. Tang L., Mao B., Li Y., et al. Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 14438. doi: 10.1038/s41598-017-14832-9
170. Li D.D., Guan H., Li F., et al. *Arabidopsis* shaker pollen inward K⁺ channel SPIK functions in SnRK1 complex-regulated pollen hydration on the stigma. *J. Integr. Plant Biol.*, 2017, 59(9), 604–611. doi: 10.1111/jipb.12563
171. Shimatani Z., Fujikura U., Ishii H., et al. Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant Physiol. Biochem.*, 2018, 131, 78–83. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.028
172. Ye Y., Wu K., Chen J., et al. OsSND2, a NAC family transcription factor, is involved in secondary cell wall biosynthesis through regulating MYBs expression in rice. *Rice (NY)*, 2018, 11(1), 36. doi: 10.1186/s12284-018-0228-z
173. Liang Z., Chen K., Yan Y., et al. Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(12), 2053–2062. doi: 10.1111/pbi.12938

Generation of Non-transgenic Genome-edited Plants: Achievements, Challenges and Prospects

D.N. MIROSHNICHENKO^{1,2,3}, O.A. SHULGA², V.R. TIMERBAEV^{1,2}, and S.V. DOLGOV^{1,2,3,*}

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch, 142290, Pushchino, Moskovskaya Oblast Russia*

²*All Russian Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 127550, Moscow Russia*

³*Doka-Gene Technology Ltd, 141880, Rogachevo, Moskovskaya Oblast Russia*

*e-mail: dolgov@bibch.ru

Received October 3, 2018

Revised December 11, 2018

Accepted January 15, 2019

Abstract—The review summarizes the problems, achievements and prospects for using various approaches related to the delivery of components of DNA editing systems into plant cells, the regeneration of whole plants with the edited genome and the development of transgene-free or transgene-clean crops. An attempt was made here to systematize the results of various studies describing the successful production of genome edited plants with various genome modifications/mutations by application of the nuclease DNA editing systems (ZFN, TALEN and CRISPR/Cas). We will discuss the main directions for the development of nuclease-based genome editing methods to obtain GE plants which are free from foreign sequences of genome editing tools.

Key words: genome editing, plant gene engineering, guide RNA, nuclease, transient expression, bioballistics, plasmids, protoplast transfection.

Acknowledgement—This work was supported by the Russian Science Foundation, Grant number: 16-16-04019

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26