

<https://doi.org/10.15407/irg2021.01.29>

УДК 633.11+575.224.46+581.1

ІНДУКОВАНИЙ МУТАГЕНЕЗ ПШЕНИЦІ: ВІД РАДІОАКТИВНОГО ОПРОМІНЕННЯ ДО СПЕЦИФІЧНОГО РЕДАГУВАННЯ ГЕНІВ

О. КІЩЕНКО^{1,2}, А. СТЕПАНЕНКО^{1,2}, М. БОРИСЮК¹

¹Хуаїньський університет загальної освіти, Факультет наук про життя
111 Вест Чанджіанг Роуд, Хуа'ян, 223300, Китай
e-mail: nborisjuk@hytc.edu.cn

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії
наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

Пшениця (*Triticum aestivum* L.) займає найбільші посівні площі серед сільськогосподарських культур і є важливим джерелом енергії, поживних речовин, клітковини й білка в раціоні людини. Незважаючи на значний ріст урожайності пшениці за часів «зеленої революції», продовольчі потреби людства також зростають. Створення високопродуктивних сортів із поліпшеними характеристиками стає дедалі актуальнішим зі збільшенням чисельності населення планети. Із початку ХХ ст. для збільшення різноманітності рослинного матеріалу в селекційну роботу почали впроваджувати штучний мутагенез із використанням радіоактивного опромінення і різноманітних хімічних сполук. Ці методи виявились ефективними інструментами індукування широкого спектра мутацій, однак переважна їх більшість небажана і потребує нейтралізації шляхом копіткої роботи із застосуванням зворотних схрещувань. Натомість редагування геному за допомогою сайтспецифічних ендонуклеаз забезпечує точні, ефективні й цільові модифікації в обраних локусах. Розглянуто історичні аспекти розвитку технологій індукованого мутагенезу та редагування геному за допомогою керованих ендонуклеаз. Серед систем, придатних для редагування геному, найширше використовують CRISPR/Cas-технологію через її простоту та відносну легкість спрямованого редагування генів різних організмів, у тому числі й пшениці з її складним гексаплоїдним геномом. Детально описано напрями застосування системи CRISPR/Cas для надання пшениці нових поліпшених властивостей. Особливу увагу приділено розробці новітніх технологій на основі існуючих систем редагування геному для створення гібридів пшениці. Узагальнено перспективи подальшого використання редагування геному пшениці для поліпшення її продуктивності і харчової цінності. Обговорено регуляторну законодавчу базу щодо виробництва та використання організмів, отриманих із залученням методів цілеспрямованого мутагенезу.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., пшениця, індукований мутагенез, редагування геному, CRISPR/Cas9.

Цитування: Кіщенко О., Степаненко А., Борисюк М. Індукований мутагенез пшениці: від радіоактивного опромінення до специфічного редагування генів. *Фізіологія рослин і генетика*. 2021. 53, № 1. С. 29–54.
<https://doi.org/10.15407/irg2021.01.29>

Пшениця належить до основних культур, які споживає людина, задовольняючи близько 20 % енергетичних потреб людства, і є важливим джерелом харчового білка. Вона займає найбільші посівні площі в світі — понад 220 млн га, згідно з даними праці [1], з яких 6,57 млн га припадає на Україну (за даними Державної служби статистики України за 2020 рік [2]). Для того щоб прогодувати 9 мільярдів людей, а саме таку чисельність населення прогнозують на 2050 р. на планеті, врожайність пшениці має зрости більш як на 60 % за збереження або навіть поліпшення її харчових характеристик. Для досягнення такої амбітної мети слід значно поліпшити ключові показники цієї культури, які визначають продуктивність та адаптацію до несприятливих умов [3, 4]. Хоча під час «зеленої революції» середня врожайність пшениці в усьому світі зросла майже втричі внаслідок збільшення зрошуваних площ, інтенсивного використання добрив і досягнень селекції [5], на сьогодні середній світовий урожай пшениці становить ~3 т/га, що значно нижче за потенціал цієї культури [6].

Успіхи в розумінні функціонування генів і розвиток методів генетичної трансформації у 1990-х роках дали можливість у подальшому вносити корисні модифікації перенесенням генів (включаючи наші власні дослідження із трансформації пшениці [7–9]). Однак, виходячи з вимог охорони здоров'я та екологічної безпеки, реалізація цих нових можливостей генетично модифікованих організмів (ГМО) у сільському господарстві виявилась обмеженою невеликою кількістю культур, які безпосередньо не використовуються для споживання людиною в їжу. Урядові організації, які займаються питаннями біобезпеки, особливо в Європі, наклали значні регуляторні та фінансові бар'єри на виробництво і використання ГМО з новими ознаками [10].

Нещодавній прогрес у розвитку технології редагування генів за допомогою сайтспецифічних керованих нуклеаз [11] у поєднанні із секвенуванням геномів багатьох сільськогосподарських культур [12, 13], включаючи пшеницю [14], підносить концепцію поліпшення основних культур на новий методологічний рівень [9, 15, 16]. Редагування геному визначають як сукупність новітніх методів молекулярної біології, які забезпечують точні, ефективні та цільові модифікації в геномних локусах [17]. Для редагування геному рослин використовують чотири платформи на основі спеціалізованих нуклеаз: мегануклеази, нуклеази «цинкових пальців» (zinc-finger nucleases, ZFNs), нуклеази, подібні до активаторів транскрипції (transcription activator-like effector nucleases, TALENs), та керовані за допомогою спрямовальної РНК-системи CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein) [18]. Дорозі та складні у виконанні системи ZNF і TALEN використовують у поодиноких лабораторіях уже близько 20 років, але редагування геномів потрапило в центр уваги широкого загалу дослідників унаслідок розробки саме CRISPR/Cas-системи [19], яка забезпечує простоту і відносну легкість направленої редагування генів.

Швидке впровадження цієї технології для фундаментальних і прикладних досліджень найважливіших культур добре ілюструє кількість зареєстрованих NCBI публікацій, отриманих у результаті

пошуку з використанням назви культури та CRISPR як запиту: станом на кінець 2020 р. цей запит давав 577 посилань для рису (*Oryza sativa*), 173 — для кукурудзи (*Zea mays*) і 138 — для пшениці (*Triticum aestivum*) [20]. Геном пшениці набагато складніший, ніж в інших сільськогосподарських культур, він містить три набори генів-гомологів (рис. 1). Це означає, що для отримання бажаного фенотипу треба вносити мутації в усі три гомологи гена. Незважаючи на це, а також на технічні ускладнення при регенерації рослин у культурі тканин [21], вражаючий прогрес був досягнутий у спрямованому мутагенезі пшениці, що відображено в останніх оглядах [9, 22–24]. Отже, швидкий розвиток і застосування системи CRISPR/Cas в редагуванні геномів та вирішенні інших завдань наочно свідчать про її революційну роль у біологічних дослідженнях.

Здебільшого зміни геному, які створюють керовані нуклеази, подібні до змін, виявлених у популяціях, що трапляються в природі або отримані звичайним хімічним мутагенезом [29]. Це є основною відмінністю технологій керованих нуклеаз від ГМО (де нова ознака асоціюється з привнесенням чужорідної послідовності ДНК), що полегшує їх позитивне сприйняття агенціями з біобезпеки багатьох країн [30, 31]. Відповідно публічне прийняття та впровадження редагування геномів у сучасні селекційні програми, треба сподіватися, значно сприятиме швидкому та ефективному підвищенню врожайності.

У цьому огляді ми розглянемо історичні аспекти розвитку технологій мутагенезу та генетичних модифікацій рослин, які схематично наведено на рис. 3, підсумуємо інформацію про доступні інструменти для редагування геному, узагальнимо способи їх застосування з використанням керованих ендонуклеаз для пшениці та обговоримо сучасні тенденції щодо подальшого розвитку цієї технології.

Індукований мутагенез рослин до впровадження CRISPR/Cas технології. Частота корисних природних мутацій у геномах рослин є занадто низькою для пришвидшення процесу створення нових сортів методами традиційної селекції. Для збільшення генетичного різноманіття в 1920-х роках були відкриті методи штучного індукування

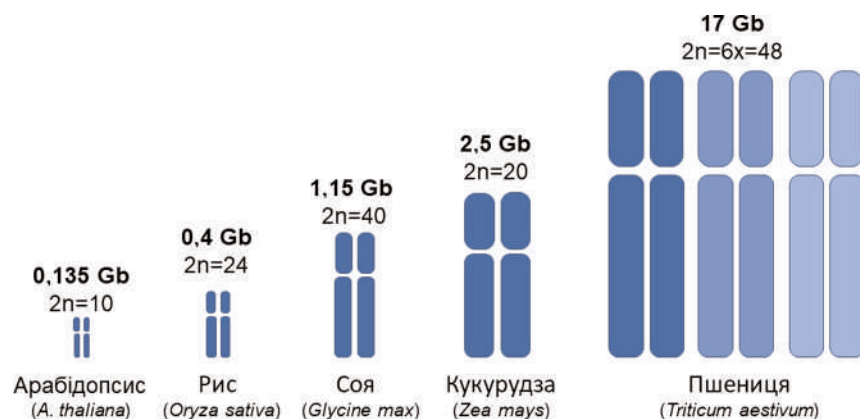


Рис. 1. Схематичне порівняння розмірів геномів основних сільськогосподарських культур відносно геному арабідопсису. Наведено розміри геномів арабідопсису [25], рису [26], сої [27], кукурудзи [28] і м'якої пшениці [14]

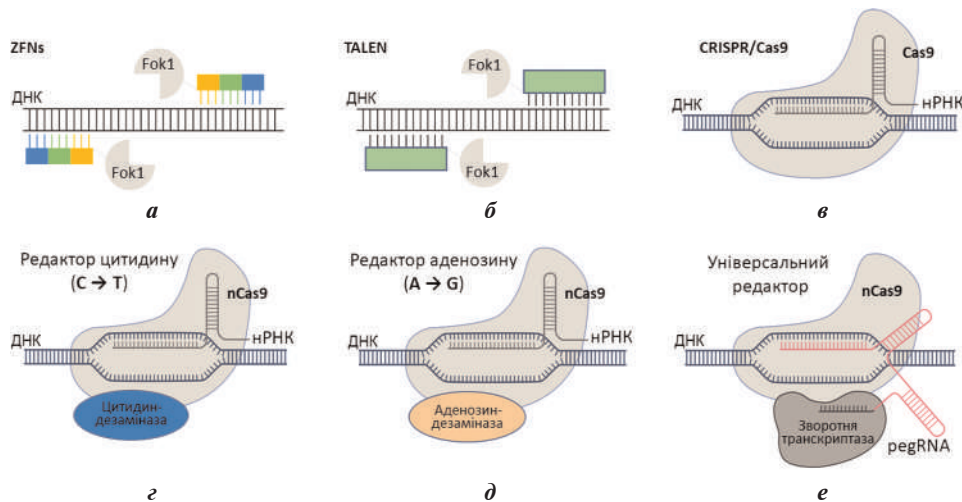


Рис. 2. Основні класи нуклеаз, які використовують для редагування геномів

Домен специфічного зв'язування з ДНК, створені на основі ZFN (а) та TALEN (б), працюють у парі з нуклеазою Fok1. У системі CRISPR/Cas9 послідовність ДНК розпізнається внаслідок уотсон-кріковських взаємодій з нРНК (в). З'єднання нікази nCas9 із цитидиндезаміназою (г) або з аденозиндезаміназою (д) забезпечує редагування основ у цільовій ділянці ДНК без вставок або дилецій. Основою методу універсального редагування (е) є nCas9, з'єднана зі зворотною транскриптазою; цей протеїновий комплекс спрямовує специфічна РНК, pegRNA (prime editing guide RNA)

мутацій іонізуючим випромінюванням [32, 33], за що в 1946 р. його винахідник Н.І. Muller був удостоєний Нобелівської премії в галузі фізіології та медицини [34]. Це відкриття разом із хімічним мутагенезом (використанням як мутагенних агентів різних хімічних сполук), починаючи із 1940-х років [35–37], проклали шлях до успішного застосування мутаційної селекції в наступні десятиліття і до наших часів. Використання хімічного та радіаційного мутагенезу уможливило створення великого пулу мутантних рослин, які в подальшому мали включатися у селекцію рослин із бажаними поліпшеними характеристиками [38–40]. У багатьох країнах були започатковані спеціалізовані селекційні програми [41], які втілились у створення понад 3000 ліній різноманітних сільськогосподарських культур із використанням штучного мутагенезу [42]. Проте крім корисних ознак, частота виникнення яких є досить низькою, ця технологія викликає тисячі випадкових, переважно небажаних мутацій у геномі рослини, які необхідно усувати за допомогою трудомістких процедур зворотного схрещування [43].

Оскільки генетичний аналіз пшениці є копіткою справою через складний алогексаплоїдний геном, постала необхідність розробки нових технологій підвищення продуктивності оцінки мутантних популяцій. Вдалою відповіддю на цей запит стала розробка процедури TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes), яка розширила можливості класичного мутагенезу, пришвидшила добір мутантів і спростила опис молекулярної природи індукованих мутацій [44]. В основу TILLING покладено отримання мутантної популяції з використанням індукованого мутагенезу, переважно хімічних мутагенів,

таких як етилметансульфонат, із наступною ідентифікацією отриманих мутацій за допомогою методів молекулярної біології, які базуються на капілярному та гель-електрофорезі, секвенуванні і спрямованій дії специфічних ферментів, які здатні впізнавати місця змін у ДНК [45, 46]. Цю технологію застосовано для отримання та опису популяцій мутантів м'якої й твердої пшениці [47, 48], а також родичів пшениці, таких як *Aegilops tauschii* [49], *Triticum monoccum* [50]. Із використанням TILLING було створено лінії пшениці, стійкі до борошнистої роси [51, 52], з підвищеним вмістом β -каротину в зерні [53], зменшеним розміром крохмальних гранул [54] і високим вмістом амілози в зернівках [55]. Отже, технологія TILLING значно розширила можливості індукованого мутагенезу як у галузі прикладної селекції, так і в функціональній генетиці пшениці [49, 56], але не вирішила питання вибіркового внесення бажаних мутацій, що стало метою і мрією для кількох поколінь дослідників [34].

Першою спробою спрямованого редагування геному було використання олігонуклеотидспрямованого мутагенезу [57], який базувався на гібридизації специфічних до цільового гена олігонуклеотидів з одиначною нуклеотидною заміною. Проте, незважаючи на всі зусилля, цей підхід не приніс помітних успіхів. Нині для локуспецифічного редагування геному найпоширенішими є методики, засновані на використанні специфічних ендонуклеаз: 1) мегануклеаз; 2) нуклеаз, які містять «цинкові пальці» ZFN; 3) ендонуклеаз TAL (TALEN); 4) CRISPR-асоційованих ендонуклеаз (рис. 2).

Мегануклеази були відкриті в *Saccharomyces cerevisiae* [58, 59]. Ці ферменти розпізнають довгі (понад 12 пн) послідовності ДНК і здатні індукувати розриви подвійної ДНК у рослин. Незважаючи на точність та ефективність цього класу ендонуклеаз, їх великим недоліком є складність редизайнінгу для нових цільових послідовностей, тому мегануклеази переважно використовують у фундаментальних дослідженнях процесів репарації ДНК [60].

Нуклеази ZFN — це гібридні білки з доменом розпізнавання ДНК, що складається щонайменше з трьох «цинкових пальців», з'єднаних із доменом ендонуклеази рестрикції FokI (див. рис. 2). Кожен «цинковий палець» впізнає і зв'язується з ДНК послідовністю в три нуклеотиди [61, 62]. ZFN виявились ефективним інструментом для редагування геномів злакових [63, 64], хоча через недостатню точність розпізнавання цільових послідовностей і технічні складнощі під час створення нових гібридних білків вони не набули значного поширення для редагування геному рослин.

TALEN були відкриті в бактеріях *Xanthomonas*, де вони виконують функцію ефективних молекулярних інструментів бактеріальних клітин для зміни експресії генів рослини-хазяїна через взаємодію із промоторами рослинних генів [65]. Поєднанням бактеріальних TALEN, в яких кожен нуклеотид цільової послідовності ДНК розпізнається певним поліпептидом із 12—13 амінокислот [66, 67], з ендонуклеазним доменом FokI було сконструйовано TALENs [68, 69]. На основі TALENs розроблено ефективні підходи для редагування геному пшениці [70, 71], зокрема для створення ліній, стійких до



Рис. 3. Основні хронологічні етапи розвитку методів індукованого мутагенезу

борошністої роси. Однак цей метод потребує великих затрат висококваліфікованої праці і часу, бо для кожного нового локусу необхідно розробляти нову пару поліпептидів для взаємодії зі специфічними послідовностями нуклеотидів.

Системи редагування геному на основі CRISPR/Cas. *Структура та функціонування ендонуклеазного комплексу CRISPR/Cas.* Впровадження методу індукування специфічних мутацій на основі ендонуклеазного комплексу CRISPR/Cas9, специфічність якого зумовлена взаємодією короткої асоційованої РНК з комплементарною послідовністю в геномі [19], здійснило справжню революцію в сучасних біологічних дослідженнях.

Природна CRISPR/Cas система, яка складається з кластеризованих регулярно перемежованих коротких паліндромних повторів CRISPR та CRISPR-асоційованого білка Cas, функціонує як форма адаптивного імунітету в прокариотах, захищаючи їх від чужої ДНК (плазмід і фагів). Хоча багато різних CRISPR/Cas систем було відкрито в еубактерій та археобактерій [74], найширше використовують для різноманітних цілей CRISPR/Cas9 із *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). SpCas9 має два каталітичних домени (HNH та RuvC), які спричинюють дволанцюгові розриви (DNA double-strand breaks, DSBs) на відстані 3 пн з 5' кінця від мотиву, що межує з цільовою ДНК (protospacer-adjacent motif, PAM, 5'-NGG-3') або протоспейсером [19]. Для роботи ферменту Cas9 необхідні також дві короткі РНК: 1) CRISPR RNA (crRNA), яка транскрибується з послідовності спейсеру і містить 20 нуклеотидів, тотожних протоспейсеру; 2) трансактивуюча CRISPR РНК (trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA), яка стабілізує структуру рибонуклеопротеїну (РНП). Єдина направляюча РНК (нРНК, single-guide RNA, sgRNA), створена злиттям tracrRNA і crRNA, здатна спрямовувати Cas9 до цільової ДНК [19] і є основою функціонування сучасних систем редагування еукаріотичних геномів (рис. 3). Індуковані дволанцюгові розриви в клітині підлягають репарації двома шляхами: 1) негомологічним об'єднанням кінців (non-homologous end joining, NHEJ), що призводить до інсерцій або делецій (InDels) у місці розриву і як наслідок до втрати функції нокаутованого гена; 2) високоточною гомологічною рекомбінацією (homologous recombination, HR).

Модифіковані та альтернативні варіанти ендонуклеази Cas із розширеними можливостями застосування. Заміною кількох амінокислотних залишків природної ендонуклеази SpCas9 було сконструйовано високоточні похідні (eSpCas9 (1.0), eSpCas9 (1.1) та SpCas9-HF1) з

вищою специфічністю до цільової ДНК, які не виявляють активності поза протоспейсером [75, 76]. Сконструйовано також ендонуклеазу SpCas9-NGv1, яка впізнає коротший ПAM 5'-NG-3' й ефективно розрізає цільову ДНК [77]. Нещодавно з'явилось повідомлення про створення варіанта Cas нуклеази SpRY зі ще меншими обмеженнями у доборі сайтів для редагування [78].

Каталітично неактивна «мертва» Cas9 (dCas9) через наявність мутацій в обох доменах HNH та RuvC або ніказа Cas9 (nCas9), яка має мутацію лише в одному з доменів і робить одноланцюговий розріз ДНК замість дволанцюгового, здатні впізнавати цільову ДНК. Їх широко застосовують в багатьох напрямках: для регуляції генів, редагування основ, епігенетичного редагування та топології хроматину [79, 80]. Злиття dCas9 із транскрипційним активатором (VP64, EDLL або TAL) чи репресором SRDX дає змогу регулювати рівень транскрипції ендогенних генів [81, 82], злиття з ацетилтрансферазою або деметилазою гістонів — регулювати експресію генів на епігенетичному рівні [83]. У результаті злиття нікази nCas9 із цитидиндезаміназою [84, 85] або аденозиндезаміназою [86, 87] C перетворюється на T або A на G, й мутагенез відбувається внаслідок редагування основ у цільовій ділянці ДНК без вставок та делецій (див. рис. 2, з, д).

Метод універсального редагування (prime editing, див. рис. 2, е), який дає змогу безпосередньо вставляти нову генетичну послідовність в обрану ділянку ДНК, вперше був застосований для клітин людини [73]. За цим методом, nCas9, злита зі зворотною транскриптазою, керується pegRNA (prime editing guide RNA), яка визначає цільовий сайт геному і кодує бажане редагування [88, 89]. Методом універсального редагування у пшениці та рису вдалося генерувати всі типи нуклеотидних замін, що привело до делецій до 40 пн та вбудовування послідовностей до 15 пн [90].

Деякі Cas9 ендонуклеази, відкриті в інших видів бактерій, менші за розміром, ніж SpCas9, яка складається з 1368 амінокислот. Так, CjCas9 із *Campylobacter jejuni* містить 984 амінокислотних залишки [91], NmCas9 із *Neisseria meningitidis* — 1082 [92], SaCas9 із *Staphylococcus aureus* — 1053 [93], проте всі вони потребують складніших ПAM: 5'-NNNNACAC-3' для CjCas9, 5'-NNNNGATT-3' для NmCas9, 5'-NNGRRT-3' для SaCas9, що накладає певні обмеження для пошуку цільової ДНК, проте зменшує вірогідність редагування нецільової ДНК.

Крім Cas9 застосовують ще кілька ендонуклеаз: Cas12a (раніше відома як Cpf1 з *Acidaminococcus* sp., *Lachnospiraceae bacterium* і *Francisella novicida*) [94], Cas13a (або C2c2 із *Leptotrichia wadei*) [95], Cas13b (C2c6 із *Prevotella* sp.) [96], EsCas13d із *Eubacterium siraeum* [97]. AsCas12a та LbCas12a мають лише один каталітичний домен RuvC із ДНКазною активністю, для своєї роботи потребують лише однієї crRNA, впізнають ПAM 5'-TTTV (A/C/G) -3' і розрізають ДНК з 3' кінця від ПAM, формуючи «липкі» кінці. Така специфічність Cas12a на відміну Cas9, що потребує наявності G + C ділянок для впізнавання, може бути корисною при необхідності редагування регуляторних, збагачених A + T ділянок геному [98]. Родина Cas13 нуклеаз — це РНКази, які неспецифічно деградують РНК після специ-

фічного зв'язування з послідовністю цільової РНК. Cas13 нуклеази можна використовувати для замовчування генів на посттранскрипційному рівні [95, 96] або для боротьби з РНК-вірусами [99].

Експресія і доставка компонентів CRISPR/Cas9 та підтвердження отриманих мутацій. Для редагування геному пшениці використовують кодоноптимальований Cas9, який містить ядерний сигнал локалізації. Для транскрипції гена ендонуклеази Cas9 РНК-полімеразою II найчастіше використовують промотори *CaMV35S* або *ZmUbi*, тоді як нРНК експресується РНК-полімеразою III (переважно під контролем *U6* або *U3* промоторів). мРНК SpCas9 та нРНК можуть також транскрибуватися як єдиний продукт, єдина РНК за допомогою промотора РНК полімерази II. Після трансляції білок SpCas9 зв'язується з цією РНК і «зайві» послідовності РНК відрізаються системою дозрівання РНК, в результаті чого формується дієздатний рибонуклеопротеїновий комплекс SpCas9-sgRNA [100, 101].

CRISPR/Cas може одночасно редагувати кілька цільових послідовностей, використовуючи одну векторну конструкцію. Кілька нРНК можуть бути закодовані у векторі як окремі транскрипційні одиниці або в поліцистронній формі [102]. Індивідуальні нРНК з поліцистронної РНК можна отримати за допомогою ферментів, що розрізають РНК, наприклад таких, як: 1) ферменти процесингу тРНК, які містяться і функціонують у рослинній клітині [103]; 2) CRISPR-асоційована ендорибонуклеаза Csy4 із *Pseudomonas aeruginosa*, яку треба експресувати одночасно з нРНК в клітині [104]; 3) рибозими, які мають бути частиною поліцистронної РНК [105]. Індивідуальні нРНК у складі поліцистронної форми відокремлюють одну від одної сайтами для розпізнавання цими ендорибонуклеазами (20–28 н для Csy4 нуклеази [106], 15 н для рибозимів або 77 н для ферментів процесингу пре-тРНК [102]). Функціональність нРНК, отриманих із поліцистронної РНК за допомогою Csy4 рибонуклеази або ендогенної системи процесингу пре-тРНК, була доведена в досліджах із редагування геному пшениці [107]. Іншим підходом для отримання функціональної нРНК з поліцистронної РНК є клонування її як інтрону в гені *Cas9* [108].

Перші успішні дослідження із використанням технології CRISPR/Cas9 для редагування геному пшениці були проведені на протопластах способом ПЕГ-опосередкованої трансфекції. Застосування культури протопластів залишається основним методом для підтвердження функціонування CRISPR/Cas9-системи та тестування й порівняння ефективності різних нРНК [101, 109–113]. Для доставки CRISPR/Cas9-системи також використовували електропорацію мікроспор [114], *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію клітин суспензійної культури [115] та бомбардування мікрочасточками апікальних меристем [116]. Проте для отримання мутантів пшениці найчастіше використовують незрілі зародки або отриманий з них калюс через їх високий регенераційний потенціал. Рослини пшениці з редагованим геномом отримано як із використанням *Agrobacterium* [117, 119], так і біолістичним методом [85, 101, 107, 112, 118].

Gil-Humanes та співавтори [101] створили реплікативні вектори для редагування геному зернових із використанням елементів геному

вірусу карликовості пшениці (Geminiviridae). Експресія репортерного гена при застосуванні такого реплікативного вектора в 110 разів вища, ніж при використанні нереплікативного контрольного вектора. Показано також, що реплікативні вектори із CRISPR/Cas-системою збільшують ефективність редагування генів у клітинах калюсу і протопластах пшениці більш як у 12 разів.

Однією з переваг CRISPR/Cas-системи є можливість отримання рослин із мутацією, що успадковується, в цільовому гені без інтеграції векторної ДНК у геном [111, 112]. Таке спрямоване редагування геному забезпечується транзиторною експресією Cas та нРНК при бомбардуванні ДНК векторами без подальшої селекції трансгенних клітин. CRISPR/Cas9-система може доставлятися біолістичним методом не лише у вигляді ДНК векторів, а й у вигляді рибонуклеопротеїнового комплексу (РНП) або як суміш мРНК для трансляції Cas9 та нРНК, що призводить до утворення мутантних рослин без трансгенів [112, 120]. Застосування РНП-комплексу для редагування дає змогу значно знизити частоту мутацій поза цільовою послідовністю [112].

CRISPR/Cas-індукований мутагенез зазвичай призводить до виникнення інсерцій і делецій у цільовому сайті, які детектують розрізанням ПЛР-продукту ферментами рестрикції, T7E1-тест, секвенуванням за Сангером, секвенуванням нового покоління, аналізом кривих плавлення з високою роздільною здатністю (high resolution melting analysis), капілярним гель-електрофорезом, флуоресцентною ПЛР (fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis) та кількісною ПЛР [121].

Застосування системи CRISPR/Cas для редагування геному пшениці. Першими генами, які редагували в геномі пшениці за допомогою CRISPR/Cas9-системи, були гени фітоендесатурази та дигідрофлаванол-4-десатурази через легкість детекції мутації в них, оскільки вони призводять до формування альбіносних рослин [109, 110, 115, 118]. Подальші зусилля були спрямовані на пошук і блокування генів, експресія яких негативно впливає на важливі агрономічні ознаки, такі як урожайність, харчова цінність, стійкість до патогенів і абіотичних стресів (рис. 4).

Підвищення врожайності. Щоб збільшити розмір і масу зерна, які є вирішальними складовими врожайності пшениці, систему CRISPR/Cas9 застосували до генів, експресія яких впливає на ці показники: *TaGW2* [107, 111, 122], *TaGW7* [123], *TaGASR7* [111, 112, 116], *TaDEC1*, *TaNAC2*, *TaPIN1* [111].

Після редагування гена *TaGW2*, що кодує убіквітинліазу E3 [107, 111, 122], T1 рослини з мутаціями в усіх трьох алелях гена *TaGW2* й генотипом *aabdd* дали зерно зі значно більшими масою і розміром порівняно з вихідним сортом [107]. При редагуванні *TaGW7-B* і *TaGW7-D* гомологів збільшувалися ширина і маса зерен, але зменшувалася їх довжина [123].

TaGASR7 — представник родини *Snakin/GASA*, пов'язаний із ростом зерна у довжину. Після біолістичної трансформації апікальних меристем вектором з CRISPR/Cas9 для редагування гена *TaGASR7* було отримано рослини з мутантними алелями [116]. Транзиторна експресія вектора з CRISPR/Cas9 та використання РНП-комплексу



Рис. 4. Схематичне зображення найважливіших напрямків застосування системи CRISPR/Cas для надання пшениці нових поліпшених властивостей редагуванням геному

CRISPR/Cas9 виявилися також високоефективними для редагування гена *TaGASR7* [111, 112].

Ген *DEP1* (*dense and erect panicle 1*) кодує один із варіантів гамма-субодиниці гетеротримерного білка G, який бере участь у регулюванні архітектури рослин, кількості зерен у волоті, поглинанні азоту та стійкості до стресу [124]. Використання системи CRISPR/Cas9 у рисі для редагування *DEP1* призвело до зменшення висоти рослин, вкорочення волоті та збільшення кількості зерен у ній [125]. Для редагування гена *TaDEP1* пшениці використовували систему CRISPR/Cas9 [111] та аденозиндезаміназу, злику з ніказою *SpCas9* [86], в результаті чого отримали мутантні рослини з частотою 2 і 1 % відповідно.

При редагуванні системою CRISPR/Cas9 гена транскрипційного фактора *TaNAC2* та гена *TaPIN1* (*PINFORMED1*), який кодує трансмембранний білок, задіяний у ембріогенезі та розвитку ендосперму, отримали гетерозиготні мутантні рослини з частотою 2 та 1 % відповідно [111].

Оптимізація харчової цінності. Целиакія — аутоімунне захворювання, що викликає хронічне запалення тонкої кишки, поширене у 1–2 % людства, спричинюється імуногенними епітопами, які містяться в α -, γ - та ω -гліадинах пшениці. Гліадини пшениці кодуються родиною споріднених генів, які налічують десятки членів, що значно ускладнює завдання їх нейтралізації. Застосуванням технології CRISPR/Cas9 отримано пшеницю зі зниженим рівнем імуногенності [126, 127]. В роботі [126] автори внесли мутації в 35 генів α -гліадинів, унаслідок чого імунореактивність борошна для споживачів із целиацією знизилась на 85 %. В роботі [127] одночасно виключено групи генів, що кодують α - і γ -гліадини. Незважаючи на помітний прогрес, редагування родини гліадинових генів поки що веде до створення ліній пшениці, які містять суміш пошкоджених, видалених та інтактних генів, тому в світі триває інтенсивна робота зі створення сортів пшениці без імуногенних епітопів, у яких збережені хлібопекарські

якості, і технології редагування геномів відіграють ключову роль у цьому процесі [128].

Ще одним прикладом поліпшення харчової цінності озимої та ярої пшениці є редагування гена *TaSBEIIa* за допомогою CRISPR/Cas-системи. Отримано серію мутантів [129] без послідовностей трансгенів, проте з мутаціями *TaSBEIIa* в одному чи всіх трьох субгеномах пшениці. В зерні таких мутантів значно збільшений вміст амілози, стійкого крохмалю, білка та пентозану, які позитивно впливають на здоров'я людини [3], а борошно ліній пшениці з індукованими мутаціями в гені *TaSBEIIa* мало поліпшені хлібопекарські властивості [129].

Стійкість до патогенів і шкідників. Рослини постійно контактують та інфікуються різноманітними патогенами, такими як віруси, бактерії, гриби, нематоди. Хвороби, збудниками яких вони є, спричинюють значні втрати якості та кількості врожаю, тому стійкість рослин до патогенів і шкідників є їх важливою агрономічною ознакою.

«Вимкнення» гена *TaMLO* (mildew-resistance locus, що кодує трансмембранний білок, локалізований у плазмалемі) редагуванням приводить до захисту від борошнистої роси, зумовленої *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Описано редагування CRISPR/Cas9-системою алеля *TaMLO-A1* в рослинах пшениці з частотою 5,6 % [119]. Гени ліпоксигеназ *TaLpx1* та *TaLox2* були також обрані як ціль для редагування [85, 107, 110, 111, 114, 130]. Ліпоксигенази гідролізують поліненасичені жирні кислоти і розпочинають біосинтез оксиліпінів, які відіграють помітну роль в активації захисних реакцій рослин, опосередкованих жасмоновою кислотою. Блокування експресії гена *TaLpx-1* забезпечує стійкість пшениці до *Fusarium graminearum* [131]. Мутантні рослини пшениці по гену *TaLOX2* отримані із частотою 9,5 %, серед них гомозиготні мутанти становили 44,7 % [111]. Технологію CRISPR/Cas9 також успішно застосовано для отримання рослин пшениці *Taedr1* одночасною модифікацією трьох гомологічних генів пшениці *EDR1* (*enhanced disease resistance 1*). *EDR1* — Raf-подібна мітогенактивована протеїнкіназа (МАРК3) — дуже висококонсервативна в межах рослинного царства і виконує негативну регуляцію в захисних реакціях [132]. Отримані мутантні *Taedr1* рослини стійкі до борошнистої роси і не виявляли загибелі клітин, індукованої патогеном [133]. Інший приклад редагування гена МАРК3, а саме гена *TraesCS4A02G110300*, описали Каміуа та співавтори у 2020 р. [130].

Поліпшення агротехнологічних характеристик. Стійкість до гербіцидів є важливою ознакою для сучасних агротехнологій. Ацетолактатсинтаза (ALS) — перший фермент біосинтезу розгалужених амінокислот у пластидах — мішень для гербіцидів п'яти класів (імідазоліонів, сульфонілсечовин, триазолопіримідинів, піримідинілтіобензоатів та сульфоніламінокарбонілтриазоліонів). Точкові заміни у ферменті можуть забезпечити формування стійкості до цих гербіцидів. Так, при заміні амінокислоти проліну на серин у положенні 174 (*ALS-P174S*) виникає стійкість до гербіцидів класу сульфонілсечовин. Редактор основ, який складався з нікази Cas9, зливої з цитидиндезаміназою людини АРОВЕС3А та інгібітором урацилглікозилази, було використано для редагування *TaALS* [85, 87]. Рослини пшениці

з мутацією в гені *TaALS-P174S* отримано з високою частотою (22,5 %). Дві рослини мали редагованими всі шість алелів і виявляли стійкість до нікосульфурону [85]. Із використанням вектора з генами двох нРНК, які впізнавали *TaALS-P174S* та *TaALS-G631*, отримано мутантні рослини, стійкі як до сульфонілсечовин, так і до імідазолінонів [87]. Одночасне редагування *TaALS-P174* та *TaACCCase-A1992* приводило до формування стійкості до нікосульфурону і квізалофопу. Останній гербіцид є інгібітором ацетил-СоА-карбоксилази — ключового ферменту в біосинтезі ліпідів у рослин. Розпочато також роботу з редагування гена енолпірувілшикіматфосфатсинтетази (EPSPS) пшениці, мутантна форма EPSPS стійка до гербіцидів широкого спектра дії, які містять гліфосат [113].

Абіотичні стреси, такі як посуха, засоленість ґрунтів та екстремальні температури, призводять до зниження врожаю через вади росту і розвитку рослин. Крім того, через ці чинники з кожним роком зменшується площа орних земель. Систему CRISPR/Cas9 використовували для редагування гена *TaCer9* (*ECERIFERUM9*), що поліпшило посухостійкість та ефективність використання води рослинами пшениці [112]. У *A. thaliana* мутація гена *Cer9*, який кодує Е3 убіквітинлігазу, привела до підвищення кількості 18-вуглецевих мономерів у складі кутикули та довголанцюгових жирних кислот (С24, С26) у кутикулярному воску, що пов'язують з потовщенням кутикули та посухостійкістю [134].

Моделювання часу цвітіння і блокування передчасного проростання зерна в колосі також є предметом інтенсивних досліджень із використанням редагування генів у різних рослинних системах [135]. Яскравим прикладом редагування гена, що відіграє важливу роль у дозріванні насіння пшениці, є праці японських дослідників [130, 136]. У результаті блокування гена *TaQsd1* вони отримали рослини з мутаціями в усіх трьох субгеномах. При схрещуванні з вихідним генотипом *AABBDD* отримано мутантні гетерозиготи *AaBbDd*, які не містили ДНК векторної конструкції; при подальшому схрещуванні були отримані й досліджені всі гомозиготні варіанти (*aaBBDD*, *AAbbDD*, *AABBdd*, *aabbDD*, *aaBBdd*, *Aabbdd*, *aabbbdd*), серед яких *aabbbdd* мав значно довший період спокою насіння і не проростав передчасно у колосі.

Новітні технології для створення гібридів. Одним із найперспективніших способів підвищення врожайності є використання переваг гетерозису (гібридної сили) внаслідок виробництва гібридних культур. Гетерозис може підвищити врожай пшениці більш як на 10–20 % [137]. Використання всього потенціалу гетерозису ускладнюється через низку біологічних і технічних завад, насамперед це самозапліднення, оскільки пшениця є самозаплідною культурою. Самозапліднення можна уникнути при використанні в селекційному процесі рослин із чоловічою стерильністю.

Система CRISPR/Cas є унікальним інструментом для швидкого створення рослин із ядерною чоловічою стерильністю блокуванням генів, задіяних у розвитку пилку. Такими генами у пшениці виявилися *TaMs1* та *TaMs45*. Ген *Male sterile 45* (*Ms45*) кодує стриктозидинсинтазаподібний фермент, необхідний для формуван-

ня екзини та розвитку пилку. Генетичний аналіз рослин-мутантів, отриманих за технологією CRISPR/Cas9, показав, що тільки генотип *Tams45—aabdd* не має функціонального пилку і є чоловічостерильним [117]. Ген *TaMs1*, що кодує білок-переносник ліпідів, зв'язаний з глікозилфосфатидилінозитолом, також важливий для формування пилку [138]. Редагування системою CRISPR/Cas лише гена *TaMs-B* виявилось достатньо для досягнення повної ядерної чоловічої стерильності [139], оскільки *TaMs1-A* і *TaMs1-D* епігенетично блоковані [140]. Наявність чоловічостерильних ліній значно спрощує і пришвидшує процес створення гібридів і використання гетерозису у пшениці.

У сучасній селекції для виробництва гібридного насіння використовують також технологію подвійних гаплоїдів, яка включає індукцію гаплоїдів і процес подвоєння хромосом, що дає змогу скоротити час для створення гомозиготних інбредних ліній. Цю практику широко застосовують у селекції кукурудзи, пилки ліній якої утворює гаплоїди з материнськими хромосомами. У результаті картування таких гаплоіндукторів ідентифіковано ген пататиноподібної пилки-специфічної фосфоліпази A1 *MTL* (*MATRILINEAL*), мутації в цьому гені зумовлюють формування пилку, що індукує гаплоїди. Амінокислотна послідовність *MTL* дуже висококонсервативна серед представників *Lilopsida* [141], і внаслідок блокування гена *MTL* системою CRISPR/Cas9 призводить до створення рослин-гаплоіндукторів кукурудзи [142], рису [143] та пшениці [141, 144]. Іншим підходом до створення гаплоіндукторів є використання редактора основ Cas9-AROBES3A для редагування *TaMTL* [85]. У такий спосіб з частотою 16,7 % було отримано мутантні рослини пшениці зі зміненим *TaMTL*, третина з них була гомозиготною по всіх шести алелях (*TaMTL—aabdd*) без вставок та інсерцій.

Детальнішу інформацію про прогрес у застосуванні редагування генів у галузі селекції гібридів, таких як генерування ліній із ядерною чоловічою стерильністю, використання гаплоїдних технологій та застосування апоміксису для клонального розмноження елітних гібридних ліній, наведено в нашому огляді [23].

Висновки. За прогнозами експертів, до 2050 р. попит на пшеницю зростатиме зі швидкістю 1,6 % щорічно внаслідок збільшення чисельності населення. Отже, середня врожайність культури має зрости приблизно до 5 т/га відносно поточних ~3 т/га [6].

Протягом останніх десятиліть за допомогою традиційної селекції було створено багато високопродуктивних сортів пшениці на базі природної мінливості популяцій або мінливості, індукованої в результаті хімічного мутагенезу чи радіоактивного опромінення [42]. Однак корисні мутації є вкрай рідкісними у гексаплоїдній пшениці, і потрібні трудомісткі селекційні програми для перенесення бажаних алелів в елітні сорти. На противагу цьому редагування геному як інноваційна методика молекулярної біології, заснована на швидко накопичуваних знаннях про організацію та регулювання рослинних геномів [145], може давати точні цільові модифікації для багатьох культур, у тому числі й пшениці з її дуже великим і складним геномом [14].

Ми розглянули низку інструментів редагування геномів, включно мегануклеазами, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 та Cas-похідними редакторами нуклеотидів, їх застосування для редагування геному пшениці. Усі ці нуклеази мають свої плюси і мінуси при застосуванні, постійно з'являються нові форми Cas і нові варіанти дизайну для експресії нРНК [87, 146], що відображено в професійних Інтернет-ресурсах [147, 148]. Для подальшої інтеграції ресурсів та ліпшої координації зусиль у галузі досліджень було запропоновано створити онлайн-сховище рослин-мутантів із редагованими геномами, подібне до платформи інформаційного ресурсу для *Arabidopsis* (Arabidopsis Information Resource, TAIR) [149].

Успіх протоколів редагування геномів великою мірою ґрунтується на ефективній доставці компонентів у клітину та подальшій регенерації цілої рослини з цієї клітини. Регенерація пшениці в культурі *in vitro* і досі залишається непростю справою й обмежується кількома генотипами, навіть коли як вихідний матеріал використовують ізольовані незрілі зародки [9]. Отже, культура тканин залишається основним «вузьким місцем» для пришвидшення виробництва сортів пшениці з редагованим геномом і поліпшеними сільськогосподарськими ознаками [21]. У цих випадках може бути корисною розробка надійних методів генетичної трансформації *in planta*, що не потребують стадії регенерації, методик подібних до протоколу, розробленого для *Arabidopsis*, який широко застосовують [150]. Сподіваємось, що метод біолістичної трансформації апікальних меристем пшениці *in planta*, про успішність якого для редагування геному нещодавно було повідомлено [116], може бути адаптований до різних елітних сортів пшениці. Тода та співавтори [151] розробили систему редагування геному рису за допомогою прямої доставки РПН-комплексу Cas9—нРНК у рослинні зиготи, отримані заплідненням *in vitro* ізольованими гаметами; зиготи культивувались у рослинах за відсутності селекційних агентів, у результаті чого регенерували 14—64 % рослин рису із цільовими мутаціями. Розроблено також подібну систему для запліднення пшениці *in vitro* [152]. Використання генів регуляторів розвитку, таких як *Wuschel* (*Wus2*) кукурудзи або *Baby Boom* (*Bbm*), у процесі генетичної трансформації показало значне підвищення ефективності трансформації як у дводольних [153], так і однодольних рослинах — кукурудзі, сорго, цукровій тростині, рисі [154]. Ці нові підходи ще очікують на перевірку у пшениці.

Оскільки системи редагування, засновані на ендонуклеазах, не потребують інтеграції в геном хазяїна або постійної наявності активних елементів у клітинах, існує великий потенціал для використання носіїв транз'єнтно-вірусної експресії для доставки ДНК або РНК, що кодуєть ендонуклеази, і нРНК [155, 156], а також для перенесення безпосередньо в клітину комплексів РНП, що складаються з очищеного білка ендонуклеази Cas та синтезованої *in vitro* нРНК [111, 112].

Стрімкий прогрес у розробці підходів до редагування геномів засвідчив, що в майбутньому редагування геномів відіграватиме ключову роль у пришвидшенні селекційного процесу при створенні нових сортів сільськогосподарських культур для задоволення зростаючого світового попиту на якісні продукти харчування та сировину.

Запропонована технологія універсальна і доступна, її використання для поліпшення якості сільськогосподарських культур обмежується лише нашими знаннями та креативністю. Наведемо лише кілька показників якості пшениці, які можуть бути змінені в найближчому майбутньому.

Сайтспрямований мутагенез нокаутує гени і редагує окремі нуклеотиди. Здатність Cas-ендонуклеаз повністю вимикати гени особливо приваблива, якщо йдеться про вилучення із сільськогосподарських культур токсичних, алергенних або неприємних метаболітів. Потенціал такого застосування чітко продемонструвала група іспанських учених, яка займається селекцією пшениці без глютену [128]. У результаті внесення мутацій одночасно в 35 із 45 генів родини гліадинів імунореактивність борошна, виготовленого з такої пшениці, знизилась на 85 % [126]. Ці нетрансгенні лінії пшениці з низьким вмістом глютену є першим кроком до створення пшениці без гліадинів. Нині новим завданням є використання повного потенціалу технології CRISPR/Cas9 для точної модифікації генів гліадинів для ослаблення їх імуногенних властивостей зі збереженням харчової цінності та характеристики випічки. Редактори нуклеотидів, які здатні зв'язуватись зі специфічною послідовністю, модифікувати нуклеотиди і здійснювати перетворення С на Т й А на G, можна використати для специфічного мутагенезу імуногенних епітопів. Система подвійних цитозинових та аденінових редакторів, з'єднана з ніказою nCas9-NG, що впізнає короткий PAM 5'-NG-3', функціонування якої нещодавно показано для рису [157], особливо придатна для цього завдання.

Ще одне очевидне майбутнє застосування технології — створення сортів з модифікованим складом крохмалю, як нещодавно продемонстровано для пшениці [129] і рису [158]. Крохмаль зі зниженим вмістом амілопектину, так званий стійкий крохмаль, потенційно запобігає розвитку діабету 2-го типу.

Отже, можна констатувати, що створення технологій редагування генів, зокрема технологія на основі направляючої РНК ендонуклеазою Cas, є великим стрибком у галузі фундаментальних досліджень рослин і практичної селекції, який можна порівняти лише із внеском молекулярного клонування та технологій ПЛР. Недарма за відкриття системи CRISPR/Cas було присуджено Нобелівську премію [159] всього через 8 років після першої публікації [19].

Незважаючи на існуючі методологічні складнощі та регуляторні обмеження, найближче майбутнє обіцяє нові серйозні досягнення в цій галузі. Впровадження цієї технології для такої агрономічно важливої зернової культури, як пшениця, ймовірно, продовжить набирати обертів і, за очікуванням, сприятиме ефективному виробництву достатньої кількості продуктів харчування високої якості.

Україна — держава з тривалою та славною історією в різних аспектах селекції пшениці [3], має низку потужних центрів дослідження пшениці та завзятих дослідників з амбіціями і знаннями. Редагування геному — відносно проста технологія, яка не потребує захмарних вкладень, а лише відданості, навчання та підтримки нового покоління відкритих, творчих дослідників. Дедалі більше країн

усвідомлює потенціал цієї нової технології в революції біомедичних досліджень і селекції сільськогосподарських культур, а установи-регулятори біобезпеки в усьому світі все більше і більше схильні розглядати організми з редагованим геномом як не-ГМО [10, 30]. Зважаючи на цю світову тенденцію, прийняття і просування технологій редагування геномів в Україні жодним чином не змінить позицію держави як виробника та прихильника «чистих» органічних харчових продуктів, але дасть новий стимул молодим дослідникам й одночасно забезпечить технологічні переваги, посилить конкурентоспроможність країни на світовому ринку зернових.

REFERENCES

1. <http://www.fao.org/faostat>
2. <http://www.ukrstat.gov.ua>
3. Rubalka, O.I. Quality of wheat and its improvement. Kyiv: Logos, 2011. 496 p. [in Ukrainian].
4. Henry, R.J., Rangan, P. & Furtado, A. (2016). Functional cereals for production in new and variable climates. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 30, pp. 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.008>
5. Evenson, R.E. & Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science*, 300, No. 5620, pp. 758-762. <https://doi.org/10.1126/science.1078710>
6. Langridge, P. (2013). Wheat genomics and the ambitious targets for future wheat production. *Genome*, 56, No. 10, pp. 545-547. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0149>
7. Yadav, D., Shavrukov, Y., Bazanova, N., Chirkova, L., Borisjuk, N., Kovalchuk, N., Ismagul, A., Parent, B., Langridge, P., Hrmova, M. & Lopato, S. (2015). Constitutive overexpression of the TaNF-YB4 gene in transgenic wheat significantly improves grain yield. *J. Exp. Bot.*, 66, pp. 6635-6650. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv370>
8. Bi, H., Shi, J., Kovalchuk, N., Luang, S., Bazanova, N., Chirkova, L., Zhang, D., Shavrukov, Y., Stepanenko, A., Tricker, P., Langridge, P., Hrmova, M., Lopato, S. & Borisjuk, N. (2018). Overexpression of the TaSHN1 transcription factor in bread wheat leads to leaf surface modifications, improved drought tolerance, and no yield penalty under controlled growth conditions: Characterisation of TaSHN1 from wheat. *Plant Cell Environ.*, 41, pp. 2549-2566. <https://doi.org/10.1111/pce.13339>
9. Borisjuk, N., Kishchenko, O., Eliby, S., Schramm, C., Anderson, P., Jatayev, S., Kurishbayev, A. & Shavrukov, Y. (2019). Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. *Biomed Res. Int.*, Article ID 6216304, pp. 1-18. <https://doi.org/10.1155/2019/6216304>
10. Metje-Sprink, J., Sprink, T. & Hartung, F. (2020). Genome-edited plants in the field. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 61, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.007>
11. Zhang, Y., Malzahn, A.A., Sretenovic, S. & Qi, Y. (2019). The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. *Nat. Plants*, 5, pp. 778-794. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0461-5>
12. Bayer, P.E., Golicz, A.A., Scheben, A., Batley, J. & Edwards, D. (2020). Plant pan-genomes are the new reference. *Nat. Plants*, 6, pp. 914-920. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0733-0>
13. Henry, R.J. (2020). Cereal genomics databases and plant genetic resources in crop improvement. *Methods Mol. Biol.*, 2072, pp. 9-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9865-4_2
14. The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Pozniak, C.J., Choulet, F., Distelfeld, A., Poland, J., Ronen, G., Sharpe, A.G., Barad, O., Baruch, K., Keeble-Gagniere, G., Mascher, M., Ben-Zvi, G., Josselin, A.-A., Himmelbach, A., Balfourier, F., Gutierrez-Gonzalez, J., Hayden, M., Koh, C., Muehlbauer, G., Pasam, R.K., Paux, E., Rigault, P., Tibbits, J., Tiwari, V., Spannagl, M., Lang, D., Gundlach, H., Haberer, G., Mayer, K.F.X., Ormanbekova, D., Prade, V., Simkova, H., Wicker, T., Swarbreck, D., Rimbart, H., Felder, M., Guillhot, N., Kaithakottil, G., Keilwagen, J., Leroy, P.,

- Lux, T., Twardziok, S., Venturini, L., Juhasz, A., Abrouk, M., Fischer, I., Uauy, C., Borrill, P., Ramirez-Gonzalez, R.H., Arnaud, D., Chalabi, S., Chalhoub, B., Cory, A., Datla, R., Davey, M.W., Jacobs, J., Robinson, S.J., Steuernagel, B., van Ex, F., Wulff, B.B.H., Benhamed, M., Bendahmane, A., Concia, L., Latrasse, D., Bartos, J., Bellec, A., Berges, H., Dolezel, J., Frenkel, Z., Gill, B., Korol, A., Letellier, T., Olsen, O.-A., Singh, K., Valarik, M., van der Vossen, E., Vautrin, S., Weining, S., Fahima, T., Glikson, V., Raats, D., Čihalikova, J., Toegelova, H., Vrana, J., Sourdille, P., Darrier, B., Barabaschi, D., Cattivelli, L., Hernandez, P., Galvez, S., Budak, H., Jones, J.D.G., Witek, K., Yu, G., Small, I., Melonek, J., Zhou, R., Belova, T., Kanyuka, K., King, R., Nilsen, K., Walkowiak, S., Cuthbert, R., Knox, R., Wiebe, K., Xiang, D., Rohde, A., Golds, T., Čizkova, J., Akpinar, B.A., Biyiklioglu, S., Gao, L., N'Daiye, A., Kubalakova, M., Safar, J., Alfama, F., Adam-Blondon, A.-F., Flores, R., Guerche, C., Loaec, M., Quesneville, H., Condie, J., Ens, J., Maclachlan, R., Tan, Y., Alberti, A., Aury, J.-M., Barbe, V., Couloux, A., Cruaud, C., Labadie, K., Mangenot, S., Wincker, P., Kaur, G., Luo, M., Sehgal, S., Chhuneja, P., Gupta, O.P., Jindal, S., Kaur, P., Malik, P., Sharma, P., Yadav, B., Singh, N.K., Khurana, J.P., Chaudhary, C., Khurana, P., Kumar, V., Mahato, A., Mathur, S., Sevanthi, A., Sharma, N., Tomar, R.S., Holusova, K., Plihal, O., Clark, M.D., Heavens, D., Kettleborough, G., Wright, J., Balcarkova, B., Hu, Y., Salina, E., Ravin, N., Skryabin, K., Beletsky, A., Kadnikov, V., Mardanov, A., Nesterov, M., Rakitin, A., Sergeeva, E., Handa, H., Kanamori, H., Katagiri, S., Kobayashi, F., Nasuda, S., Tanaka, T., Wu, J., Cattonaro, F., Jiumeng, M., Kugler, K., Pfeifer, M., Sandve, S., Xun, X., Zhan, B., Batley, J., Bayer, P.E., Edwards, D., Hayashi, S., Tulpova, Z., Visendi, P., Cui, L., Du, X., Feng, K., Nie, X., Tong, W. & Wang, L. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361, Iss. 6403, eaar7191, pp. 1-16. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
15. Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Communications*, 9, No. 1911, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
 16. Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 70, pp. 667-697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
 17. Chen, K. & Gao, C. (2014). Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep.*, 33, pp. 575-583. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1539-6>
 18. Koepfel, I., Hertig, C., Hoffie, R. & Kumlehn, J. (2019). Cas endonuclease technology — a quantum leap in the advancement of barley and wheat genetic engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, Iss. 11, E2647, pp. 1-24. <https://doi.org/10.3390/ijms20112647>
 19. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, pp. 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
 20. Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A.E., Brutnell, T.P., Citovsky, V., Conrad, L.J., Gelvin, S.B., Jackson, D.P., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., Medford, J.I., Orozco-Córdenas, M.L., Tricoli, D.M., Van Eck, J., Voytas, D.F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z.J. & Stewart, C.N.Jr. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell.*, 28, No. 7, pp. 1510-1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
 21. Kumar, R., Kaur, A., Pandey, A., Mamrutha, H.M. & Singh, G.P. (2019). CRISPR-based genome editing in wheat: a comprehensive review and future prospects. *Mol. Biol. Reports*, 46, pp. 3557-3569. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04761-3>
 22. Chen, G., Zhou, Y., Kishchenko, O., Stepanenko, A., Jatayev, S., Zhang, D. & Borisjuk, N. (2020). Gene editing to facilitate hybrid crop production. *Biotechnology Advances*, In Press. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107676>
 23. Wang, K., Gong, Q. & Ye, X. (2020). Recent developments and applications of genetic transformation and genome editing technologies in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 133, pp. 1603-1622. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03464-4>
 24. Arabidopsis, Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, pp. 796-815. <https://doi.org/10.1038/35048692>

25. Sasaki, T. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436, pp. 793-800. <https://doi.org/10.1038/nature03895>
26. Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.-C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C. & Jackson, S.A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463, pp. 178-183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>
27. Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T.A., Minx, P., Reily, A.D., Courtney, L., Kruchowski, S.S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., Rock, S.M., Belter, E., Du, F., Kim, K., Abbott, R.M., Cotton, M., Levy, A., Marchetto, P., Ochoa, K., Jackson, S.M., Gillam, B., Chen, W., Yan, L., Higginbotham, J., Cardenas, M., Waligorski, J., Applebaum, E., Phelps, L., Falcone, J., Kanchi, K., Thane, T., Scimone, A., Thane, N., Henke, J., Wang, T., Ruppert, J., Shah, N., Rotter, K., Hodges, J., Ingenthron, E., Cordes, M., Kohlberg, S., Sgro, J., Delgado, B., Mead, K., Chinwalla, A., Leonard, S., Crouse, K., Collura, K., Kudrna, D., Currie, J., He, R., Angelova, A., Rajasekar, S., Mueller, T., Lomeli, R., Scara, G., Ko, A., Delaney, K., Wissotski, M., Lopez, G., Campos, D., Braidotti, M., Ashley, E., Golser, W., Kim, H., Lee, S., Lin, J., Dujmic, Z., Kim, W., Talag, J., Zuccolo, A., Fan, C., Sebastian, A., Kramer, M., Spiegel, L., Nascimento, L., Zutavern, T., Miller, B., Ambroise, C., Muller, S., Spooner, W., Narechania, A., Ren, L., Wei, S., Kumari, S., Faga, B., Levy, M.J., McMahan, L., Van Buren, P., Vaughn, M.W., Ying, K., Yeh, C.-T., Emrich, S.J., Jia, Y., Kalyanaraman, A., Hsia, A.-P., Barbazuk, W.B., Baucom, R.S., Brutnell, T.P., Carpita, N.C., Chaparro, C., Chia, J.-M., Deragon, J.-M., Estill, J.C., Fu, Y., Jeddeloh, J.A., Han, Y., Lee, H., Li, P., Lisch, D.R., Liu, S., Liu, Z., Nagel, D.H., McCann, M.C., SanMiguel, P., Myers, A.M., Nettleton, D., Nguyen, J., Penning, B.W., Ponnala, L., Schneider, K.L., Schwartz, D.C., Sharma, A., Soderlund, C., Springer, N.M., Sun, Q., Wang, H., Waterman, M., Westerman, R., Wolfgruber, T.K., Yang, L., Yu, Y., Zhang, L., Zhou, S., Zhu, Q., Bennetzen, J.L., Dawe, R.K., Jiang, J., Jiang, N., Presting, G.G., Wessler, S.R., Aluru, S., Martienssen, R.A., Clifton, S.W., McCombie, W.R., Wing, R.A. & Wilson, R.K. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326, pp. 1112-1115. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>
28. Voytas, D.F. & Gao, C. (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol.*, 12, e1001877, pp 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001877>
29. Dobrovidova, O. (2019). Russia joins in global gene-editing bonanza. *Nature*, 569, pp. 319-320. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01519-6>
30. Friedrichs, S., Takasu, Y., Kearns, P., Dagallier, B., Oshima, R., Schofield, J. & Moreddu, C. (2019). An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. *Biotech. Res. Innov.*, 3, pp. 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.07.001>
31. Muller, H.J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66, pp. 84-87. <https://doi.org/10.1126/science.66.1699.84>
32. Stadler, L.J. (1928). Genetic effects of X-rays in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 14, Iss. 1, pp. 69-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.14.1.69>
33. Pacher, M. & Puchta, H. (2017). From classical mutagenesis to nuclease-based breeding — directing natural DNA repair for a natural end-product. *Plant J.*, 90, pp. 819-833. <https://doi.org/10.1111/tpj.13469>
34. Rapoport, I.A. (1946). Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutations. *Dokl. USSR Academy of Sciences*, 54, No. 1, pp. 65-68 [in Russian].
35. Auerbach, C. & Robson, J. (1946). Chemical production of mutations. *Nature*, 157, p. 302. <https://doi.org/10.1038/157302a0>
36. Dhaliwal, A.K., Mohan, A., Sidhu, G., Maqbool, R. & Gill, K.S. (2015). An ethylmethane sulfonate mutant resource in pre-green revolution hexaploid wheat. *PLoS One*, 10, Iss. 12, e0145227, pp.1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145227>
37. Novak, F.J. & Brunner, H. (1992). Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bulletin*, pp. 25-33.

38. Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M. & Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135, pp. 187-204. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000014914.85465.4f>
39. Fitzgerald, T.L., Powell, J.J., Stiller, J., Weese, T.L., Abe, T., Zhao, G., Jia, J., McIntyre, C.L., Li, Z., Manners, J.M. & Kazan, K. (2015). An assessment of heavy ion irradiation mutagenesis for reverse genetics in wheat (*Triticum aestivum* L.) *PLoS One*, 10, Iss. 2, e0117369, pp. 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117369>
40. Kharkwal, M.C., Pandey, R.M. & Pawar, S.E. (2004). Mutation breeding in crop improvement. In *Plant Breeding — Mendelian to Molecular Approaches*. Jain, H.K., Kharkwal, M.C. (Eds). New Delhi: Narosa Publishing House, pp. 601-645
41. Sovova, T., Kerins, G., Demnerova, K. & Ovesna, J. (2017). Genome editing with engineered nucleases in economically important animals and plants: state of the art in the research pipeline. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 21, pp. 41-62. <https://doi.org/10.21775/cimb.021.041>
42. Parry, M.A.J., Madgwick, P.J., Bayon, C., Tearall, K., Hernandez-Lopez, A., Baudo, M., Rakszegi, M., Hamada, W., Al-Yassin, A., Ouabbou, H., Labhili, M. & Phillips, A.L. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J. Exp. Bot.*, 60, No. 10, pp. 2817-2825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp189>
43. McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. & Heniko, S. (2000). Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.*, 123, pp. 439-442. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.439>
44. Colbert, T., Till, B.J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M.N., Yeung, A.T., McCallum, C.M., Comai, L. & Henikoff, S. (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.*, 126, pp. 480-484. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.480>
45. Xiong, H., Zhou, C., Guo, H., Xie, Y., Zhao, L., Gu, J., Zhao, S., Ding, Y. & Liu, L. (2020). Transcriptome sequencing reveals hotspot mutation regions and dwarfing mechanisms in wheat mutants induced by γ -ray irradiation and EMS. *J. Radiat. Res.*, 61, pp. 44-57. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz075>
46. Uauy, C., Paraiso, F., Colasuonno, P., Tran, R.K., Tsai, H., Berardi, S., Comai, L. & Dubcovsky, J. (2009). A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biol.*, 9, pp. 115-129. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-115>
47. Krasileva, K.V., Vasquez-Gross, H.A., Howell, T., Bailey, P., Paraiso, F., Clissold, L., Simmonds, J., Ramirez-Gonzalez, R.H., Wang, X., Borrill, P., Fosker, C., Ayling, S., Phillips, A.L., Uauy, C. & Dubcovsky, J. (2017). Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, Iss. 6, pp. E913-E921. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619268114>
48. Rawat, N., Schoen, A., Singh, L., Mahlandt, A., Wilson, D.L., Liu, S., Lin, G., Gill, B.S. & Tiwari, V.K. (2018). TILL-D: an *Aegilops tauschii* TILLING resource for wheat improvement. *Front. Plant Sci.*, 9, No. 1665, pp. 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01665>
49. Rawat, N., Sehgal, S.K., Joshi, A., Rothe, N., Wilson, D.L., McGraw, N., Vadlani, P.V., Li, W. & Gill, B.S. (2012). A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics. *BMC Plant Biol.*, 12, No. 205, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-205>
50. Acevedo-Garcia, J., Spencer, D., Thieron, H., Reinstädler, A., Hammond-Kosack, K., Phillips, A.L. & Panstruga, R. (2017). mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnol. J.*, 15, pp. 367-378. <https://doi.org/10.1111/pbi.12631>
51. Ingvarsdson, C.R., Massange-Sanchez, J.A., Borum, F., Uauy, C. & Gregersen, P.L. (2019). Development of mlo-based resistance in tetraploid wheat against wheat powdery mildew. *Theor. Appl. Genet.*, 132, No. 11, pp. 3009-3022. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03402-4>
52. Sestili, F., Garcia-Molina, M.D., Gambacorta, G., Beleggia, R., Botticella, E., De Vita, P., Savatin, D.V., Masci, S. & Lafandra, D. (2019). Provitamin A biofortification of durum wheat through a TILLING approach. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, No. 5703, pp. 1-14. <https://doi.org/10.3390/ijms20225703>

53. Guo, H., Liu, Y., Li, X., Yan, Z., Xie, Y., Xiong, H., Zhao, L., Gu, J., Zhao, S. & Liu, L. (2017). Novel mutant alleles of the starch synthesis gene TaSSIVb-D result in the reduction of starch granule number per chloroplast in wheat. *BMC Genomics*, 18, No. 358, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3724-4>
54. Sestili, F., Palombieri, S., Botticella, E., Mantovani, P., Bovina, R. & Lafiandra, D. (2015). TILLING mutants of durum wheat result in a high amylose phenotype and provide information on alternative splicing mechanisms. *Plant Sci.*, 233, pp. 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.009>.
55. Chen, A. & Dubcovsky, J. (2012). Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene VRN1 down-regulates the flowering repressor VRN2 in leaves but is not essential for flowering. *PLoS Genet.*, 8, No. 12, e1003134, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003134>
56. Wallace, R.B., Schold, M., Johnson, M.J., Dembek, P. & Itakura, K. (1981). Oligonucleotide directed mutagenesis of the human β -globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA. *Nucleic Acids Res.*, 9, pp. 3647-3656. <https://doi.org/10.1093/nar/9.15.3647>
57. Puchta, H., Dujon, B. & Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 21, No. 22, pp. 5034-5040. <https://doi.org/10.1093/nar/21.22.5034>
58. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell Biol.*, 14, No. 12, pp. 8096-8106. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8096>
59. Vu, G.T.H., Cao, H.X., Watanabe, K., Hensel, G., Blattner, F.R., Kumlehn, J. & Schubert, I. (2014). Repair of site-specific DNA double-strand breaks in barley occurs via diverse pathways primarily involving the sister chromatid. *Plant Cell*, 26, pp. 2156-2167. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126607>
60. Kim, Y.G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, pp. 1156-1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
61. Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188, No. 4, pp. 773-782. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.131433>
62. Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKolver, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y.Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregor, P.D. & Urnov, F.D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459, No. 7245, pp. 437-441. <https://doi.org/10.1038/nature07992>.
63. Jung, Y.-J., Nogoy, F.M., Lee, S.-K., Cho, Y.-G. & Kang, K.-K. (2018). Application of ZFN for site directed mutagenesis of rice SSIVa gene. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 23, No. 1, pp. 108-115. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0420-9>.
64. Lahaye, T. & Bonas, U. (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.*, 6, pp. 479-485. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02083-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02083-0)
65. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, pp. 1509-1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
66. Pattanayak, V., Guilinger, J.P. & Liu, D.R. (2014). Determining the specificities of TALENs, Cas9, and other genome-editing enzymes. *Methods Enzymol.*, 546, pp. 47-78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00003-9>
67. Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, 39, e82, pp. 1-11, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr218>
68. Sprink, T., Metje, J. & Hartung, F. (2015). Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 32, pp. 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.010>

69. Wang, Y., Zong, Y. & Gao, C. (2017). Targeted mutagenesis in hexaploid bread wheat using the TALEN and CRISPR/Cas systems. *Methods Mol. Biol.*, 1679, pp. 169-185. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_11
70. Luo, M., Li, H., Chakraborty, S., Morbitzer, R., Rinaldo, A., Upadhyaya, N., Bhatt, D., Louis, S., Richardson, T., Lahaye, T. & Ayliffe, M. (2019). Efficient TALEN-mediated gene editing in wheat. *Plant Biotechnol. J.*, 17, pp. 2026-2028. <https://doi.org/10.1111/pbi.13169>
71. Chen, D.F. & Dale, P.J. (1992). A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems. *Transgenic Res.*, 1, pp. 93-100. <https://doi.org/10.1007/BF02513026>
72. Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A. & Liu, D.R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576, pp. 149-157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
73. Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J. & Koonin, E.V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9, pp. 467-477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
74. Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X. & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351, pp. 84-88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
75. Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. & Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529, Iss. 7587, pp. 490-495. doi: <https://doi.org/10.1038/nature16526>
76. Endo, M., Mikami, M., Endo, A., Kaya, H., Itoh, T., Nishimasu, H., Nureki, O. & Toki, S. (2019). Genome editing in plants by engineered CRISPR-Cas9 recognizing NG PAM. *Nat. Plants*, 5, pp. 14-17. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0321-8>
77. Walton, R.T., Christie, K.A., Whittaker, M.N. & Kleinstiver, B.P. (2020). Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, 368, pp. 290-296. <https://doi.org/10.1126/science.aba8853>
78. Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.*, 9, No. 1911, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
79. Xu, X. & Qi, L.S. (2019). A CRISPR-dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology. *J. Mol. Biol.*, 431, pp. 34-47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037>
80. Lowder, L.G., Zhang, D., Baltus, N.J., Paul, J.W., Tang, X., Zheng, X., Voytas, D.F., Hsieh, T.-F., Zhang, Y. & Qi, Y. (2015). A CRISPR-Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol.*, 169, pp. 971-985. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
81. Tang, X., Lowder, L.G., Zhang, T., Malzahn, A.A., Zheng, X., Voytas, D.F., Zhong, Z., Chen, Y., Ren, Q., Li, Q., Kirkland, E.R., Zhang, Y. & Qi, Y. (2017). A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat. Plants*, 3: 17018. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.18>
82. Hilton, I.B., D'Ippolito, A.M., Vockley, C.M., Thakore, P.I., Crawford, G.E., Reddy, T.E. & Gersbach, C.A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.*, 33, pp. 510-517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>
83. Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., Qiu, J.-L., Wang, D. & Gao, C. (2017). Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 35, pp. 438-440. <https://doi.org/10.1038/nbt.3811>
84. Zong, Y., Song, Q., Li, C., Jin, S., Zhang, D., Wang, Y., Qiu, J.-L. & Gao, C. (2018). Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nat. Biotechnol.*, 36, pp. 950-953. <https://doi.org/10.1038/nbt.4261>
85. Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., Zhang, R. & Gao, C. (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol.*, 19, No. 59, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1443-z>
86. Zhang, R., Liu, J., Chai, Z., Chen, S., Bai, Y., Zong, Y., Chen, K., Li, J., Jiang, L. & Gao, C. (2019). Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nat. Plants*, 5, pp. 480-485. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0405-0>

87. Anzalone, A.V., Koblan, L.W. & Liu, D.R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.*, 38, pp. 824-844. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>.
88. Marzec, M. & Hensel, G. (2020). Prime editing: game changer for modifying plant genomes. *Trends Plant Sci.*, 25, pp. 722-724. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.008>
89. Lin, Q., Zong, Y., Xue, C., Wang, S., Jin, S., Zhu, Z., Wang, Y., Anzalone, A.V., Raguram, A., Doman, J.L., Liu, D.R. & Gao, C. (2020). Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotechnol.*, 38, pp. 582-585. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0455-x>
90. Kim, E., Koo, T., Park, S.W., Kim, D., Kim, K., Cho, H.-Y., Song, D.W., Lee, K.J., Jung, M.H., Kim, S., Kim, J.H., Kim, J.H. & Kim, J.-S. (2017). In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun.*, 8, p. 14500. <https://doi.org/10.1038/ncomms14500>
91. Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N.E., Howden, S.E., Chu, L.-F., Sontheimer, E.J. & Thomson, J.A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, pp. 15644-15649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313587110>
92. Mojica, F.J.M., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155, pp. 733-740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
93. Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E.V. & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163, pp. 759-771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
94. Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J.J., Verdine, V., Cox, D.B.T., Kellner, M.J., Regev, A., Lander, E.S., Voytas, D.F., Ting, A.Y. & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550, pp. 280-284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
95. Cox, D.B.T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Franklin, B., Kellner, M.J., Joung, J. & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358, pp. 1019-1027. <https://doi.org/10.1126/science.aag0180>
96. Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N.J., Oki, J., Shokhirev, M.N. & Hsu, P.D. (2018). Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 173, pp. 665-676.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.033>
97. Komarnytsky, S. & Borisjuk, N. (2003). Functional analysis of promoter elements in plants. In: *Genetic Engineering. Genetic engineering: principles and methods*, 25, Setlow J.K. (Ed.) (pp. 113-141). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0073-5_6
98. Aman, R., Ali, Z., Butt, H., Mahas, A., Aljedaani, F., Khan, M.Z., Ding, S. & Mahfouz, M. (2018). RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol.*, 19, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1381-1>
99. Mikami, M., Toki, S. & Endo, M. (2017). In planta processing of the SpCas9-gRNA complex. *Plant Cell Physiol.*, 58, pp. 1857-1867. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx154>
100. Gil-Humanes, J., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C.V., Sanchez-Leon, S., Baltes, N.J., Starker, C., Barro, F., Gao, C. & Voytas, D.F. (2017). High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR-Cas9. *Plant J.*, 89, pp. 1251-1262. <https://doi.org/10.1111/tpj.13446>
101. Cermak, T., Curtin, S.J., Gil-Humanes, J., Cegan, R., Kono, T.J.Y., Konecna, E., Belanto, J.J., Starker, C.G., Mathre, J.W., Greenstein, R.L. & Voytas, D.F. (2017). A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell*, 29, pp. 1196-1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
102. Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR-Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, pp. 3570-3575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
103. Tsai, S.Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J.A., Thapar, V., Reyon, D., Goodwin, M.J., Aryee, M.J. & Joung, J.K. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 32, pp. 569-576. <https://doi.org/10.1038/nbt.2908>

104. Gao, Y. & Zhao, Y. (2014). Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.*, 56, pp. 343-349. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
105. Kurata, M., Wolf, N.K., Lahr, W.S., Weg, M.T., Kluesner, M.G., Lee, S., Hui, K., Shiraiwa, M., Webber, B.R. & Moriarity, B.S. (2018). Highly multiplexed genome engineering using CRISPR-Cas9 gRNA arrays. *PLOS One*, 13, e0198714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198714>
106. Wang, W., Pan, Q., He, F., Akhunova, A., Chao, S., Trick, H. & Akhunov, E. (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *CRISPR J.*, 1, pp. 65-74. <https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>
107. Ding, D., Chen, K., Chen, Y., Li, H. & Xie, K. (2018). Engineering introns to express RNA guides for Cas9- and Cpf1-mediated multiplex genome editing. *Mol. Plant*, 11, pp. 542-552. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.005>
108. Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.-L. & Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.*, 31, pp. 686-688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
109. Shan, Q., Wang, Y., Li J. & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protocols*, 9, No. 10, pp. 2395-2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
110. Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Qiu, J.-L. & Gao, C. (2016). Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR-Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.*, 7, No. 12617, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms12617>
111. Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., Ran, Y. & Gao, C. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.*, 8, No. 14261, pp. 1-5. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
112. Arndell, T., Sharma, N., Langridge, P., Baumann, U., Watson-Haigh, N.S. & Whitford, R. (2019). gRNA validation for wheat genome editing with the CRISPR-Cas9 system. *BMC Biotechnology*, 19, pp. 71-89. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0565-z>
113. Bhowmik, P., Ellison, E., Polley, B., Bollina, V., Kulkarni, M., Ghanbarnia, K., Song, H., Gao, C., Voytas, D.F. & Kagale, S. (2018). Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR-Cas9. *Sci. Rep.*, 8, No. 6502, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24690-8>
114. Upadhyay, S.K., Kumar, J., Alok, A. & Tuli, R. (2013). RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)*, 3, pp. 2233-2238. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008847>
115. Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N. & Imai, R. (2018). Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.*, 8, No. 14422, pp. 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32714-6>
116. Singh, M., Kumar, M., Albertsen, M.C., Young, J.K. & Cigan, A.M. (2018). Concurrent modifications in the three homeologs of Ms45 gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.*, 97, pp. 371-383. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0749-2>
117. Howells, R.M., Craze, M., Bowden, S. & Wallington, E.J. (2018). Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR-Cas9. *BMC Plant Biol.*, 18, No. 215, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1433-z>
118. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. & Qiu, J.-L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.*, 32, pp. 947-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
119. Svitashv, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K. & Cigan, M.A. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.*, 7, No. 13274, pp. 1-7. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>
120. Grohmann, L., Keilwagen, J., Duensing, N., Dagand, E., Hartung, F., Wilhelm, R., Bendiek, J. & Sprink, T. (2019). Detection and identification of genome editing in plants: challenges and opportunities. *Front. Plant Sci.*, 10, No. 236. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00236>

121. Liang, Z., Chen, K., Yan, Y., Zhang, Y. & Gao, C. (2018). Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol. J.*, 16, pp. 2053-2062. <https://doi.org/10.1111/pbi.12938>
122. Wang, W., Pan, Q., Tian, B., He, F., Chen, Y., Bai, G., Akhunova, A., Trick, H.N. & Akhunov, E. (2019). Gene editing of the wheat homologs of TONNEAU 1-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *Plant J.*, 100, pp. 251-264. <https://doi.org/10.1111/tpj.14440>
123. Xu, H., Zhao, M., Zhang, Q., Xu, Z. & Xu, Q. (2016). The DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP1) gene offering the potential in the breeding of high-yielding rice. *Breed. Sci.*, 66, pp. 659-667. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16120>
124. Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q., Luo, W., Wu, G. & Li, H. (2016). Reassessment of the four yield-related genes Gnl1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR-Cas9 system. *Front. Plant Sci.*, 7, pp. 377-377. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00377>
125. Sanchez-Leon, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C.V., Gimenez, M.J., Sousa, C., Voytas, D.F. & Barro, F. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR-Cas9. *Plant Biotechnol. J.*, 16, pp. 902-910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
126. Jouanin, A., Schaart, J.G., Boyd, L.A., Cockram, J., Leigh, F.J., Bates, R., Wallington, E.J., Visser, R.G.F. & Smulders, M.J.M. (2019). Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC Plant Biol.*, 19, No. 333, pp. 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1889-5>
127. Garcia-Molina, M.D., Giménez, M.J., Sanchez-León, S. & Barro, F. (2019). Gluten Free Wheat: Are We There? *Nutrients*, 11, No. 3, pp. 1-13. <https://doi.org/10.3390/nu11030487>
128. Li, J., Jiao, G., Sun, Y., Chen, J., Zhong, Y., Yan, L., Jiang, D., Ma, Y. & Xia, L. (2020). Modification of starch composition, structure and properties through editing of TaSBEIIa in both winter and spring wheat varieties by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.*, 5, pp. 1-15. doi: 10.1111/pbi.13519.
129. Kamiya, Y., Abe, F., Mikami, M., Endo, M. & Kawaura, K. (2020). A rapid method for detection of mutations induced by CRISPR/Cas9-based genome editing in common wheat. *Plant Biotechnol.*, 37, pp. 247-251. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0404b>
130. Nalam, V.J., Alam, S., Keereetawee, J., Venables, B., Burdan, D., Lee, H., Trick, H.N., Sarowar, S., Makandar, R. & Shah, J. (2015). Facilitation of *Fusarium graminearum* infection by 9-lipoxygenases in *Arabidopsis* and wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 28, pp. 1142-1152. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0096-R>
131. Frye, C.A., Tang, D. & Innes, R.W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, pp. 373-378. <https://doi.org/10.1073/pnas.011405198>
132. Zhang, Y., Bai, Y., Wu, G., Zou, S., Chen, Y., Gao, C. & Tang, D. (2017). Simultaneous modification of three homologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.*, 91, pp. 714-724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
133. Lu, S., Zhao, H., Des Marais, D.L., Parsons, E.P., Wen, X., Xu, X., Bangarusamy, D.K., Wang, G., Rowland, O., Juenger, T., Bressan, R.A. & Jenks, M.A. (2012). *Arabidopsis* ECERIFERUM9 involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiol.*, 159, pp. 930-944. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198697>
134. Kishchenko, O., Zhou, Y., Jatayev, S., Shavruk, Y. & Borisjuk, N. (2020). Gene editing applications to modulate crop flowering time and seed dormancy. *BIOTECH*, 1, pp. 233-245. <https://doi.org/10.1007/s42994-020-00032-z>
135. Abe, F., Haque, E., Hisano, H., Tanaka, T., Kamiya, Y., Mikami, M., Kawaura, K., Endo, M., Onishi, K., Hayashi, T. & Sato, K. (2019). Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. *Cell Rep.*, 28, pp. 1362-1369. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.090>
136. Gupta, P.K., Balyan, H.S., Gahlaut, V., Saripalli, G., Pal, B., Basnet, B.R. & Joshi, A.K. (2019). Hybrid wheat: past, present and future. *Theor. Appl. Genet.*, 132, pp. 2463-2483. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03397-y>

137. Tucker, E.J., Baumann, U., Koudiri, A., Suchecki, R., Baes, M., Garcia, M., Okada, T., Dong, C., Wu, Y., Sandhu, A., Singh, M., Langridge, P., Wolters, P., Albertsen, M.C., Cigan, A.M. & Whitford, R. (2017). Molecular identification of the wheat male fertility gene *Ms1* and its prospects for hybrid breeding. *Nat. Commun.*, 8, No. 869, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00945-2>
138. Okada, A., Arndell, T., Borisjuk, N., Sharma, N., Watson-Haigh, N.S., Tucker, E.J., Baumann, U., Langridge, P. & Whitford, R. (2019). CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Ms1* enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. *Plant Biotechnol. J.*, 17, Iss. 10, pp. 1905-1913. <https://doi.org/10.1111/pbi.13106>
139. Wang, Z., Li, J., Chen, S., Heng, Y., Chen, Z., Yang, J., Zhou, K., Pei, J., He, H., Deng, X.W. & Ma, L. (2017). Poaceae-specific MS1 encodes a phospholipid-binding protein for male fertility in bread wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, pp. 12614-12619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715570114>
140. Liu, C., Zhong, Y., Qi, X., Chen, M., Liu, Z., Chen, C., Tian, X., Li, J., Jiao, Y., Wang, D., Wang, Y., Li, M., Xin, M., Liu, W., Jin, W. & Chen, S. (2020). Extension of the in vivo haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat. *Plant Biotechnol. J.*, 18, pp. 316-318. <https://doi.org/10.1111/pbi.13218>
141. Kelliher, T., Starr, D., Su, X., Tang, G., Chen, Z., Carter, J., Wittich, P.E., Dong, S., Green, J., Burch, E., McCuiston, J., Gu, W., Sun, Y., Strebe, T., Roberts, J., Bate, N.J. & Que, Q. (2019). One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat. Biotechnol.*, 37, pp. 287-292. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0038-x>
142. Yao, L., Zhang, Y., Liu, C., Liu, Y., Wang, Y., Liang, D., Liu, J., Sahoo, G. & Kelliher, T. (2018). OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat. Plants*, 4, pp. 530-533. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0193-y>
143. Liu, H., Wang, K., Jia, Z., Gong, Q., Lin, Z., Du, L., Pei, X. & Ye, X. (2020). Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of TaMTL using an optimized Agrobacterium-mediated CRISPR system. *J. Exp. Bot.*, 71, pp. 1337-1349. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz529>
144. Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H. & Edwards, D. (2017). Towards CRISPR/Cas crops — bringing together genomics and genome editing. *New Phytol.*, 216, No. 3, pp. 682-698. <https://doi.org/10.1111/nph.14702>
145. Zhang, Y., Malzahn, A.A., Sretenovic, S. & Qi, Y. (2019). The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. *Nat. Plants*, 5, pp. 778-794. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0461-5>
146. <http://crdd.osdd.net/servers/crisprge/links.php>
147. <http://www.addgene.org/crispr/reference/>
148. Zheng, Y., Zhang, N., Martin, G.B. & Fei, Z. (2019). Plant genome editing database (PGED): a call for submission of information about genome-edited plant mutants. *Mol. Plant*, 12, No. 2, pp. 127-129. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.001>
149. Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16, pp. 735-743.
150. Toda, E., Koiso, N., Takebayashi, A., Ichikawa, M., Kiba, T., Osakabe, K., Osakabe, Y., Sakakibara, H., Kato, N. & Okamoto, T. (2019). An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice. *Nat. Plants*, 5, No. 4, pp. 363-368. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0386-z>
151. Maryenti, T., Kato, N., Ichikawa, M. & Okamoto, T. (2019). Establishment of an in vitro fertilization system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol.*, 60, pp. 835-843.
152. Maher, M.F., Nasti, R.A., Vollbrecht, M., Starker, C.G., Clark, M.D. & Voytas, D.F. (2020). Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol.*, 38, No. 1, pp. 84-89. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2>
153. Lowe, K., Wu, E., Wang, N., Hoerster, G., Hastings, C., Cho, M.J., Scelonge, C., Lenderts, B., Chamberlin, M., Cushatt, J., Wang, L., Ryan, L., Khan, T., Chow-Yiu, J., Hua, W., Yu, M., Banh, J., Bao, Z., Brink, K., Igo, E., Rudrappa, B., Shamseer, P.M., Bruce, W., Newman, L., Shen, B., Zheng, P., Bidney, D., Falco, C., Register, J., Zhao, Z.Y., Xu, D., Jones, T. & Gordon-Kamm, W. (2016). Morphogenic regulators

- Baby boom and Wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell.*, 28, No. 9, pp. 1998-2015. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00124>
154. Gleba, Y., Klimyuk, V. & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, pp. 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>.
155. Liu, H. & Zhang, B. (2020). Virus-based CRISPR/Cas9 genome editing in plants. *Trends Gen.*, 36, pp. 810-813. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.002>
156. Li, C., Zhang, R., Meng, X., Chen, S., Zong, Y., Lu, C., Qiu, J.-L., Chen, Y.-H., Li, J. & Gao, C. (2020). Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. *Nat. Biotechnol.*, 38, pp. 875-882. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0393-7>
157. Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y. & Xia, L. (2017). Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.*, 8, No. 298, pp. 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00298>
158. Ledford, H. & Callaway, E. (2020). Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature*, 586, pp. 346-347. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02765-9>

Received 23.12.2020

INDUCED MUTAGENESIS IN WHEAT: FROM IONIZING RADIATION TO SITE-SPECIFIC GENE EDITING

O. Kishchenko^{1, 2}, *A. Stepanenko*^{1, 2}, *M. Borisjuk*¹

¹Jiangsu Collaborative Innovation Centre of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an, China

e-mail: nborisjuk@hytc.edu.cn

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

148 Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine

Wheat (*Triticum aestivum* L.) occupies the largest cultivated area among crops, supplying a substantial part of energy, nutrients, fiber and protein to human. Whereas the wheat yield has been significantly enhanced during the Green Revolution, the food needs also increase with the growth of human population. The breeding of highly productive cultivars with improved agronomic and nutrient characteristics remains an important challenge. Since the beginning of 20th century, induced mutagenesis using ionizing radiation and various chemicals has been practiced to increase the diversity of plant material in breeding. The method represents an effective tool for inducing a wide range of genetic changes. However, the vast majority of the generated random mutations, are rather deleterious and have to be cleaned up via cumbersome and time-consuming back-crossing procedures. Instead, site-specific endonucleases offer an opportunity of accurate and efficient target-specific modifications in the chosen loci selected by a researcher. The review provides a historic perspective on the induced mutagenesis technologies and the recent progress in genome editing based on customizable endonucleases. The main focus is on the advances of CRISPR/Cas technology, which emerged as the most widely used mean for crop genomes editing, including wheat with its complex hexaploid genome. The areas of application of the CRISPR/Cas systems for wheat improvement are described in detail. Particular attention is paid to the development of new approaches, based on genome editing systems for speeding up the production of wheat hybrids, improving wheat productivity and nutritional values. The legal regulations applied to the production and applications of the organisms obtained by targeted mutagenesis are also discussed.

Key words: *Triticum aestivum* L., wheat, induced mutagenesis, genome editing, CRISPR/Cas9.