

## ПЕРСПЕКТИВЫ СОЧЕТАНИЯ МЕТОДОВ ГАПЛОИДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КОЛОСОВЫХ ЗЛАКОВ СЕМЕЙСТВА *TRITICEAE* (ОБЗОР)

**А. В. Жильцов**<sup>1</sup>, младший научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий эмбриогенеза зерновых культур, zhiltsoff.sasha2013@yandex.ru, ORCID ID: 0009-0004-3080-5077;

**А. А. Чекалин**<sup>1</sup>, младший научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий эмбриогенеза зерновых культур, sasha.chekalin.98@mail.ru, ORCID ID: 0009-0004-7052-0789;

**О. В. Попова**<sup>1</sup>, лаборант-исследователь лаборатории клеточных биотехнологий эмбриогенеза зерновых культур;

**И. В. Дуванов**<sup>1</sup>, научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий эмбриогенеза зерновых культур, biotechduvanov@yandex.ru, ORCID ID: 0009-0007-3406-6277;

**Д. Н. Мирошниченко**<sup>1,2</sup>, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией клеточных биотехнологий эмбриогенеза зерновых культур ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», старший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений ФГБНУ «Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии», miroshnichenko@bibch.ru, ORCID ID: 0000-0003-3975-7484

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», 143026, Московская обл., г.п. Одинцово, р.п. Новоивановское, ул. Аерохимиков, д. 6;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: iab@iab.ac.ru

За последние несколько десятилетий гаплоидные биотехнологии стали неотъемлемой частью селекционных программ для многих сельскохозяйственных культур. С помощью стратегии удвоения гаплоидов, индуцируемых в культуре гаметных клеток и тканей *in vitro*, посредством андрогенеза, гиногенеза и отдаленной гибридизации стало возможным значительно сократить время создания новых сортов. С помощью технологии удвоенных гаплоидов в течение одной-двух генераций можно получить выровненные гомозиготные линии, которые не только помогают ускорить селекционный процесс, но и являются хорошим подспорьем в изучении ряда научно-практических проблем. Другой перспективный инструмент для получения линий и образцов с заданными признаками в пределах нескольких поколений – редактирование генома с помощью различных редактирующих комплексов на основе нуклеаз. Появившаяся десять лет назад технология редактирования генома CRISPR/Cas9 позволяет решать самые разнообразные задачи функциональной геномики растений, включая инженерию устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам, повышение урожайности и качества продукции. Она превосходит большинство известных методов улучшения сортов по признакам, имеющим моно- или полигенный контроль, поскольку дает возможность одновременного изменения нескольких генов, что актуально для полиплоидных видов. Неотъемлемой частью геномного редактирования растений, как и технологий гаплоидогенеза, является культура клеток и тканей *in vitro*, что открывает возможность их комбинирования. Сочетание технологий позволяет напрямую получать гомозиготные растения с новыми ген-специфичными мутациями, что обеспечивает увеличение генетического разнообразия и ускоряет отбор линейного материала, несущего новые хозяйственно полезные признаки. В представленном обзоре обобщен опыт комбинирования методов гаплоидии и геномного редактирования у колосовых злаков семейства *Triticeae*. Помимо анализа современного состояния, рассмотрены перспективы дальнейшего развития технологий получения гаплоидов пшеницы, ячменя, тритикале и ржи с отредактированным геномом.

**Ключевые слова:** пшеница, ячмень, рожь, тритикале, редактирование генома, CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein* – эндонуклеазы Cas, ассоциированные с короткими палиндромными повторами), TALEN (*transcription activator-like effector nucleases* – эффлекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции), ZFN (*Zinc-finger nucleases* – цинково-пальцевые нуклеазы), дигаплоиды.

**Для цитирования:** Жильцов А. В., Чекалин А. А., Попова О. В., Дуванов И. В., Мирошниченко Д. Н. Перспективы сочетания методов гаплоидной биотехнологии и редактирования геномов для совершенствования колосовых злаков семейства *Triticeae* (обзор) // Зерновое хозяйство России. 2024. Т. 16, № 3. С. 18–26. DOI: 10.31367/2079-8725-2024-92-3-18-26.



## PROSPECTS FOR COMBINING THE METHODS OF HAPLOID BIOTECHNOLOGY AND GENOME EDITING TO IMPROVE SPIKED GRAINS OF THE *TRITICEAE* FAMILY (REVIEW)

**A. V. Zhiltsov**<sup>1</sup>, junior researcher of the of the laboratory for cell biotechnologies of grain embryo genesis, zhiltsoff.sasha2013@yandex.ru, ORCID ID: 0009-0004-3080-5077;

**A. A. Chekalin**<sup>1</sup>, of the laboratory for cell biotechnologies of grain embryo genesis, sasha.chekalin.98@mail.ru, ORCID ID: 0009-0004-7052-0789;

**O. V. Popova**<sup>1</sup>, laboratory assistant-researcher of the laboratory for cell biotechnologies of grain embryo genesis;

**I. V. Duvanov**<sup>1</sup>, researcher of the laboratory for cell biotechnologies of grain embryo genesis, biotechduvanov@yandex.ru, ORCID ID: 0009-0007-3406-6277;

**D. N. Miroshnichenko**<sup>1,2</sup>, Candidate of Biological Sciences, head of the laboratory for cell biotechnologies of grain embryo genesis of the FSBSI "Federal Research Center "Nemchinovka", senior researcher of the laboratory for plant genetic engineering of the FSBSI "All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology", miroshnichenko@bibch.ru, ORCID ID: 0000-0003-3975-7484

<sup>1</sup>FSBSI "Federal Research Center "Nemchinovka",

143026, Moscow region, Odintsovsky region, Odintsovsky district, v. of Novoivanovskoe, Agrokhimikov Str., 6;

<sup>2</sup>FSBSI "All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology" (FSBSI ARRIAB),

127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: iab@iab.ac.ru

Over the past few decades, haploid biotechnologies have become an integral part of breeding programs for many crops. Using the strategy of doubling haploids induced in the culture of gametic cells and tissues *in vitro*, through androgenesis, gynogenesis and distant hybridization, it became possible to significantly reduce the time for developing new varieties. Using the technology of doubled haploids, within one or two generations, it is possible to obtain aligned homozygous lines, which can both help speed up the breeding process and study several scientific and practical issues. Another promising tool for developing lines and samples with specified traits within several generations is genome editing (engineering) using various nuclease-based engineering complexes. The CRISPR/Cas9 genome editing technology, which came into use ten years ago, allows solving a wide variety of problems in plant functional genomics, including engineering resistance to biotic and abiotic stresses, improving productivity and product quality. The technology is better than the most known methods for improving varieties for the traits which have mono- or polygenic control, since it allows changing several genes simultaneously, which is important for polyploid species. An integral part of plant genome editing, as well as haploidogenesis technologies, is cell and tissue culture *in vitro*, which gives possibility for their combination. The combination of technologies allows producing homozygous plants with new gene-specific mutations, which improves genetic diversity and accelerates the selection of linear material with new economically valuable traits. The current review has summarized the experience of combining haploidy and genome editing methods in spiked grains of the *Triticeae* family. In addition to analyzing the current state, there have been considered the prospects for further development of technologies for obtaining haploids of wheat, barley, triticale, and rye with an edited genome.

**Keywords:** wheat, barley, oats, triticale, genome editing (engineering), CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein), TALEN (transcription activator-like effector nucleases), ZFN (Zinc-finger nucleases), dihaploids.

**Введение.** Развитие гаплоидных биотехнологий в конце XX века оказало серьезное влияние на генетические исследования, направленные на совершенствование сортамента с.-х. культур, в том числе колосовых злаков, относящихся к семейству *Triticeae*. Индукция гаплоидных растений пшеницы, ячменя, ржи и тритикале в культуре клеток и тканей *in vitro* с последующим удвоением хромосом позволяет получить элитные линии, которые обладают низким генетическим расщеплением и устойчиво сохраняют признаки родительских форм. Внедрение технологии массового получения гаплоидных растений способствовало сокращению срока создания современных высокопродуктивных сортов. Они позволили преодолеть одно из «узких мест» традиционной селекции, а именно: необходимость выращивания большого числа гибридных поколений для получения гомозиготных форм. За сравнительно короткий срок стало возможным выявление константных гибридов первого поколения с целевой комбинацией генов. Увеличилась точность и эффективность отбора, при этом уменьшился объем анализируемой популяции.

В настоящее время существует два основных способа получения гаплоидных растений семейства *Triticeae*: андрогенез (андроклиния) и отдаленная гибридизация (Калинина и др., 2020). Андроклинные гаплоиды получают путем культивирования *in vitro* изолированных

пыльцевиков или незрелых микроспор на специализированных питательных средах, призванных инициировать из гаметных клеток эмбриоподобные структуры. Образовавшиеся андроклинные эмбриоиды в дальнейшем стимулируют к развитию в гаплоидные растения, которые благодаря спонтанному или чаще искусственному удвоению хромосом способны развиваться в фертильные удвоенные гаплоидные растения, часто называемые в литературе дигаплоидами (DH).

Метод отдаленной гибридизации предполагает опыление пыльцой чужеродного вида-опылителя, зачастую называемого гаплопродюсером. Благодаря проявлению постгаметной несовместимости происходит селективная элиминация хромосом опылителя. При этом в результате воздействия эндогенных фитогормонов после опыления формируется гаплоидный зародыш. Несмотря на то что гаплоидные зародыши нежизнеспособны из-за отсутствия эндосперма, при своевременном изолировании и дальнейшем культивировании на питательных средах *in vitro* (в литературе такой подход часто называют embryo rescue) они могут регенерировать полноценные гаплоидные растения.

Каждый из описанных способов имеет свои преимущества и недостатки. Тем не менее успешное внедрение гаплоидных биотехнологий в селекционную практику уже привело

к появлению в различных странах мира новых высокопродуктивных сортов, в первую очередь пшеницы и ячменя (Hale et al., 2022).

Постоянно растущие потребности человечества в обеспечении продовольствием, а также изменения климата и ухудшение экологической ситуации обуславливают необходимость в новых разработках для ускорения селекции. К таким новым биотехнологиям можно отнести методы редактирования ДНК, обычно называемые редактированием генома, которые обрели широкое применение в генетике растений после появления технологии CRISPR/Cas9 (Tang et al., 2023). Редактирование генома растений достигается за счет разрезания нитей ДНК нуклеазами различных типов, которые направляются к определенному гену-мишени гидовой (или направляющей) РНК (sgRNA), комплементарной последовательности гена-мишени. Для редактирования генома растений в настоящее время используют три класса нуклеаз – нуклеазы «цинковые пальцы» ZFN, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции TALEN, и эндонуклеазы Cas, ассоциированные с короткими палиндромными повторами (CRISPR) (Злобин и др., 2017; Gaj et al., 2016). Цинково-пальцевые нуклеазы (ZFN) представляют собой тип белка, состоящего из белкового домена, обеспечивающего связывание с ДНК, и домена нуклеазы для разрезания ДНК. Подобно ZFN, TALEN также используются для создания двуцепочечных разрывов в ДНК с целью коррекции генетической информации. В свою очередь, CRISPR/Cas предоставляет собой систему редактирования генома, состоящую из Cas-белка, который связывается с ДНК, и гидовой РНК, направляющей Cas-белок к участку генома для изменений. На данный момент наибольшее распространение получила технология CRISPR/Cas9, которую можно успешно использовать как для модельных видов, так и для важнейших с.-х. культур (Tang et al., 2023). Несмотря на то что технологии редактирования генома используются генетиками и биотехнологами всего 10 лет, уже достигнуты большие методологические и практические успехи ее применения, в том числе для зерновых культур, чему посвящено большое число экспериментальных и обзорных работ последних лет (Ahmar et al., 2023).

Технологии редактирования генома растений постоянно совершенствуются. В настоящее время они позволяют вносить точечные мутации (делеции, или вставки, одного или нескольких нуклеотидов), протяженные делеции (от десятков до сотен нуклеотидов), замену одного типа нуклеотида на другой (Т → С, А → Г и т.п.), замену определенной нуклеотидной последовательности на другую. Технологии редактирования генома успешно применяются для внесения целевых мутаций в один ген или сразу в несколько генов (гомологичных или негомологичных), которые могут присутствовать как на одной, так и на нескольких хромосомах, в том числе у растений с полиплоидным гено-

мом. Последний аспект важен для зерновых колосовых злаков, среди которых пшеница и тритикале являются полиплоидными видами со сложной организацией генома. Важно отметить, что геномное редактирование изменяет только целевые генетические последовательности и не затрагивает остальную генетическую информацию.

Тем не менее, как и любая развивающаяся технология, она имеет ряд недостатков. Один из них заключается в том, что для получения растений с отредактированным геномом используются методы генетической инженерии и трансгенеза растений. Подавляющее большинство первичных растений, полученных с помощью технологий редактирования генома, представляют собой трансгенные организмы и не могут быть вовлечены напрямую в селекционный процесс (Мирошниченко и др., 2019). Другая проблема заключается в том, что в результате геномного редактирования чаще всего происходит индукция моноаллельных мутаций. При этом получить мутантное растение, в котором успешно инициировано редактирование сразу во всех аллелях, достаточно проблематично, особенно если это касается полиплоидных видов. Даже если удастся индуцировать биаллельные мутации, когда каждая аллель становится отредактированной, но несет отличающиеся мутации, в последующем поколении происходит расщепление, которое может не дать ожидаемого эффекта.

В этой связи сочетание геномного редактирования с технологией гаплоидогенеза может в первую очередь преодолеть проблему гетерозиготности растений с отредактированным геномом. Более того, как показывают некоторые пилотные исследования, подключение методов гаплоидогенеза позволит в некоторых случаях избежать трансгенеза, поскольку компоненты геномного редактирования доставляются в клетки транзитно, то есть без стабильной вставки в геном растений. Настоящий обзор сфокусирован на экспериментальных достижениях, появившихся в научной печати в последние годы и посвященных сочетанию двух указанных биотехнологий с целью получения мутантных растений – колосовых злаков, в первую очередь ячменя и пшеницы. Кроме того, в обзоре обсуждаются перспективы совместного применения технологий геномного редактирования и гаплоидогенеза для злаков семейства *Triticeae*, играющих важную роль в растениеводстве России.

**Ячмень.** Среди злаков семейства *Triticeae* ячмень – первая культура, для которой показана возможность успешного сочетания технологий гаплоидогенеза и геномного редактирования. В 2014 г. группа исследователей из Института генетики растений и исследований культурных растений им. Лейбница (г. Гатерслебен, Германия) показала принципиальную возможность редактирования гаплоидного генома ячменя с помощью экспрессии TALEN нуклеаз в клетках, полученных в куль-

туре микроспор (Gurushidze et al., 2014). В экспериментах использовали трансгенные линии озимого ячменя 'Igr1', содержащие функциональную копию гена зеленого флуоресцентного белка *GFP*. Для нокаута этого гена с помощью агробактериальной трансформации в эмбриогенную пыльцу трансгенного ячменя переносили вектор для экспрессии двух *GFP* специфичных комплексов TALEN. Благодаря гаплоидному характеру клеток-мишеней те клетки, в которых произошла нокаутирующая мутация, можно было легко выявить по отсутствию характерной флуоресценции. Из таких клеток авторы успешно регенерировали первичные гаплоидные мутантные растения, которые после дублирования генома колхцином сформировали полноценные фертильные гомозиготные дигаплоиды. При этом 22 % дигаплоидных растений несли целевые делеции длиной от 4 до 36 нуклеотидов, позволившие «выключить» ген *GFP* (Gurushidze et al., 2014). В дальнейшем, чтобы повысить эффективность мутагенеза, исследователи модифицировали свой протокол. Изменения состояли в том, что отдельные блоки TALEN с помощью агробактерий переносили в гаплоидные клетки ячменя, чтобы регенерировать гомозиготные дигаплоидные трансгенные линии, каждая из которых несет только одну единицу из пары TALEN (Gurushidze et al., 2017). Дальнейшее скрещивание трансгенных растений приводило к объединению обеих единиц TALEN, что вызывало их активацию во время ранних этапов зиготического эмбриогенеза. Благодаря чему эффективность сайт-направленного мутагенеза у гибридных растений достигается 62,5–100 %. Протоколы не нашли дальнейшего развития, поскольку на смену громоздким TALEN комплексам пришла менее громоздкая и более эффективная технология редактирования CRISPR/Cas9, которая сейчас стала доминирующей в работах по геномному редактированию растений.

В 2020 г. группа исследователей из нескольких университетов Австралии предложила свой протокол геномного редактирования ячменя, сочетающий CRISPR/Cas9 подход и гаплоидию, основанную на культуре пыльников (Han et al., 2021). Протокол был протестирован на модельном сорте 'Golden Promise' и четырех австралийских сортах ячменя, которые отличались фенологией, эффективностью индукции эмбриогенного каллуса и способностью к регенерации не альбиносных растений. Каллус, индуцированный из культивируемых пыльников с помощью агробактерий, трансформировали векторами, несущими последовательности нуклеазы Cas9 и различные sgRNA. Протокол, предложенный авторами, позволяет получать полноценные дигаплоиды через 35 недель после посева  $F_1$  семян. При этом выход растений, несущих целевые мутации, составляет в среднем 53 %, колеблясь от 35 до 75 % у отдельных сортов в зависимости от гена-мишени (Han et al., 2021).

Предыдущие сообщения представляют собой по большей части методологические исследования, в которых авторы пытались различными способами увеличить эффективность разрабатываемых протоколов на «модельных» генах. Тогда как в работах Hoffie et al. (2021) культуру изолированных микроспор комбинировали с технологией геномного редактирования CRISPR/Cas9 для получения вирусостойчивых растений ячменя. Так, в результате нокаута одного из генов семейства факторов инициации трансляции *HvEIF4E* были получены дигаплоидные растения ячменя 'Igr1', семенное потомство которых неизменно оказывалось гомозиготным и полностью устойчивым к механической инокуляции вирусом VaMMV (Barley mild mosaic virus), который в неблагоприятные годы может поражать до 50 % посевов озимого ячменя в зонах умеренного климата. К сожалению, «выключение» *HvEIF4E*, вовлеченного в различные процессы роста и развития растений, негативно сказалось на продуктивности ячменя, в результате чего сократилось число зерен в колосе и уменьшилась урожайность. В перспективе этот недостаток можно преодолеть. В недавней публикации та же группа исследователей использовала в качестве мишени для геномного редактирования ген PDIL5-1, потеря функциональности которого обуславливает устойчивость диких видов ячменя к различным вирусам (Hoffie et al., 2023). Это позволило достичь стабильной устойчивости к VaMMV у двух культурных сортов ячменя. При этом редактирование гена PDIL5-1 (нокаут через сдвиг рамки считывания) не сказалось отрицательно на росте и урожайности растений как в условиях теплицы, так и в условиях поля.

**Пшеница.** Первое сообщение об успешном комбинировании гаплоидии пшеницы и направленного мутагенеза с использованием систем геномного редактирования появилось в 2018 году. В исследовании Bhowmik (Bhowmik et al., 2018) была представлена система индукции генетических модификаций в генах *TaLox2* и *TaUbiL1* с помощью трансфекции микроспор пшеницы векторами, кодирующими компоненты CRISPR/Cas9. Исследования концентрировались на оптимизации условий трансфекции ДНК в гаплоидные клетки методом электропорации, поэтому о регенерации полноценных гаплоидных растений не сообщалось. В последующей публикации авторы утверждали, что мутантные клетки дали начало полноценным гаплоидным растениям, однако документальных подтверждений представлено не было (Bhowmik and Islam, 2020).

В конце 2019 г. американско-канадская группа исследователей представила совместную разработку биотехнологических компаний DowDuPont и Agri-Food Canada по редактированию генома мягкой пшеницы путем доставки ZEN нуклеаз в культивируемые микроспоры (Bilichak et al., 2020). В качестве мишени был выбран ген *IPK1*, продукт которого запускает последний этап биосинтеза фитиевой кисло-

ты, снижение содержания которой увеличивает накопление железа и цинка в зернах. Чтобы избежать трансгенеза, ZEN-опосредованная система редактирования была сконструирована в виде пептидного комплекса, способного проникать в клетки в результате трансфекции. Авторы успешно подтвердили изменения в целевом локусе *IPK1* как при трансфекции микроспор, так и клеток эмбрионоподобных структур, сформировавшихся из микроспор. Любопытно, что ZFN-IPK1 комплекс создавался для внесения мутаций в высоко консервативную область обоих гомеологов в субгеномах А и В. Однако сайт-специфичные изменения обнаруживались преимущественно в *IPK1* последовательности субгенома А. Как и в исследовании предыдущих авторов, регенерация полноценных гаплоидных растений представлена не была. Низкая эффективность и определенные сложности при конструировании ZEN-содержащих пептидных комплексов делают этот метод малоперспективным.

Одним из распространенных и эффективных способов получения гаплоидных растений пшеницы является опыление пыльцой кукурузы, которая выступает в качестве гаплопродюсера. В 2019 г. исследовательская группа компании Syngenta (США) опубликовала работу о получении линии-индуктора кукурузы, которую можно использовать для получения дигаплоидов различных видов растений одновременно с редактированием их генома (Kelliher et al., 2019). Несмотря на то, что главная задача исследований заключалась в разработке технологии прямого редактирования элитных инбредных линий кукурузы путем скрещивания с линией-индуктором, в пыльце которой присутствовали компоненты редактирующего комплекса CRISPR/Cas9, авторы также показали возможность ее применения для опыления пшеницы и индукции мутаций в геноме образовавшихся гаплоидных зародышей. Для этого линию-индуктор кукурузы (NP2222) трансформировали векторами, экспрессирующими *Cas9* и гидовую РНК, нацеленную на гомеологи *TaGT1-4A*, *TaGT1-4B* и *TaGT1-4D* пшеницы, которые являются ортологами *GRASSY TILLER1* генов кукурузы. После опыления пыльцой трансгенной кукурузы двух сортов пшеницы среди 298 гаплоидных растений два гаплоида одного из сортов содержали мутации в *TaGT1-4B* гене. Несмотря на низкую эффективность (0,7%), мутантные гаплоидные растения пшеницы не содержали чужеродных последовательностей *Cas9* и sgRNA, так как в результате aberrантного репродуктивного процесса в развивающемся зародыше остается только гаплоидный набор хромосом материнского родителя. В надежде повысить эффективность выхода гаплоидных растений мягкой пшеницы с отредактированным геномом были созданы новые трансгенные растения кукурузы, в которых для увеличения активности *Cas9* использовали промоторы генов *BETA EXPANSIN5* и *PROFILIN3*, обладающих повышенной экс-

прессией в кукурузной пыльце. Использование *prPROFILIN3:Cas9* кассеты экспрессии позволило несколько увеличить выход мутантных гаплоидных растений пшеницы мягкой пшеницы AC Nanda до 1,8%, тогда как опыление цветков одной из ЦМС линий пшеницы не дало положительного результата (Kelliher et al., 2019).

Спустя короткое время методология совместного применения сайт-направленного мутагенеза и индукции гаплоидов получила значительное развитие в работе Budhagatapalli и др. (Budhagatapalli et al., 2020). Используя систему CRISPR/Cas9 для внесения мутаций в гены *TaBRI1* и *TaSD1*, контролирующих высоту растений, исследователи достигли более эффективного редактирования генов при формировании гаплоидных зародышей. Авторы идентифицировали 15 независимых мутантных гаплоидных растений у шести генотипов пшеницы, включая три яровых и один озимый сорта гексаплоидной мягкой пшеницы, а также двух генотипов тетраплоидной твердой пшеницы. Эффективность формирования мутантных гаплоидов в среднем составила 8,6%, колеблясь от 3,6 до 50% у различных генотипов. При этом сорта твердой пшеницы проявляли более низкую эффективность. Поскольку гены-мишени *BRI1* and *SD1* достаточно консервативны, мутации были успешно индуцированы во всех трех гомеологах (А, В, D). Однако нокаутировать все гомеологи одновременно в одном растении не удалось. По мнению авторов, это может быть следствием того, что полная потеря функциональности *BRI1* and *SD1* не позволяет развиваться гаплоидным зародышам, поскольку гомозиготные  $M_2$  поколения дигаплоидных мутантов, несущие мутации в одном гомеологе, демонстрировали снижение высоты растений и длины колоса (Budhagatapalli et al., 2020). В целом разработанный методологический подход снизил генотипическую зависимость при получении гаплоидных растений, показал возможность создания ряда новых мутаций с использованием всего лишь одного *Cas9/gRNA*-трансгенного растения (опылителя) кукурузы. При этом дигаплоидные растения и их гомозиготное потомство  $M_1-M_2$  не содержали чужеродную Т-ДНК.

Недавняя работа группы североамериканских исследователей показала, что эффективность выхода мутантных гаплоидных растений в системах гибридизации *T.aestivum* x *Z.mays* может меняться в зависимости от выбора промотора для экспрессии *Cas9/gRNA* кассет в растениях кукурузы (Karmacharya et al., 2023). Для достижения высокой эффективности редактирования генов применение промотора *U3* пшеницы (*TaU3p*) для управления экспрессией гидовых РНК оказалось лучшим выбором в сравнении с промотором *U3* риса, похожим по действию. В работе также продемонстрирована возможность одновременного включения двух локусов *TaHRC-R* и *TaHRC-S* восприимчивости пшеницы к болезням. При включении в кассету экспрессии гидовых РНК, направленных на сайт-специфическую модификацию каж-

дого из локусов, эффективность выхода двойных мутантных дигаплоидов составила 7,7%. При этом эффективность мутагенеза по отдельным локусам достигла 27–33%. При использовании системы гибридизации *T.aestivum* x *Z.mays* авторы также продемонстрировали высокую эффективность мутагенеза гена *Tsn1*, известного своим участием в обеспечении устойчивости пшеницы к различным фитопатогенам. Выход мутантных гаплоидов составил 15–18%. Несмотря на то что в исследовании не представлены результаты устойчивости к фитопатогенам, авторы надеются ее продемонстрировать в поколениях дигаплоидных мутантов, поскольку устойчивые генотипы и линии пшеницы, нокаутные по этим генам, уже обнаружены у некоторых сортов и используются в селекции (Karmacharya et al., 2023).

**Другие представители Triticeae.** Среди представителей семейства *Triticeae* рожь (*Secale*) и тритикале (x *Triticosecale*) имеют немаловажное значение в с.-х. производстве России и многих других стран. Тем не менее в отличие от ячменя и пшеницы, у которых совокупное число работ по редактированию различных целевых генов приближается к первой сотне, первое сообщение об успешном редактировании генов тритикале появилось лишь в 2024 г. (Miroshnichenko et al., 2024). Для ржи до сих пор нет ни одного сообщения об успешном применении какой-либо системы редактирования. Причин этому несколько. Рожь является одним из непокорных злаков в культуре клеток и тканей *in vitro*. Методы получения дигаплоидов в культуре пыльников сортов ржи описаны (Deimling and Flehinghaus-Roux, 1997). Однако их эффективность значительно уступает в сравнении с ячменем и пшеницей. Тритикале, рукотворный ржано-пшеничный гибрид, в последние годы обгоняет по посевным площадям рожь и приобретает все большую популярность в различных странах мира как кормовая, техническая и зерновая культура. У тритикале благодаря присутствию генома пшеницы эффективность гаплоидных технологий выше, чем у ржи. Принимая во внимание, что регенерация гаплоидных растений тритикале возможна как методом андрогенеза, так и в системах гибридизации «тритикале x кукуруза» (Дьячук и др., 2022), эти подходы могут вскоре найти свое применение для редактирования генома тритикале.

**Перспективы.** Анализ литературных источников показывает, что сочетание технологий редактирования генома и гаплоидной технологии находится в активной фазе становления для колосовых зерновых культур. Над этим работают как отдельные научные исследовательские группы разных стран, так и крупные биотехнологические компании, вовлеченные в селекцию и семеноводство. Очевидные методологические успехи уже просматриваются у пшеницы, в первую очередь благодаря использованию систем гибридизации «пшеница x кукуруза», когда ген-мишень пшеницы

редактируется комплексом CRISPR/Cas9, активированным в кукурузе. Такой подход позволяет избежать генотипической зависимости, которая присутствует при геномном редактировании пшеницы, поскольку лишь ограниченное число сортов подходит для генетической трансформации. Однажды полученную линию-гаплопродюсер кукурузы можно многократно использовать. Главное, чтобы гены-мишени у редактируемых видов и сортов пшеницы были комплементарны последовательности гидовой РНК, которая экспрессируется в линии-индукторе. Получаемые при этом гаплоидные растения не содержат чужеродных вставок вследствие естественной элиминации хромосом опылителя, а дигаплоидизация переводит индуцированные мутации в гомозиготное состояние. В совокупности все это открывает возможность прямого вовлечения дигаплоидных линий, содержащих отредактированные гены, непосредственно в селекционный процесс. В силу накопленного за прошедшее десятилетие опыта редактирования и наличия достаточно большого числа перспективных генов-кандидатов (Кулуев и др., 2022; Ухатова и др., 2023; Ahmar et al., 2023) следует ожидать быстрого развития этого направления для пшеницы. Учитывая, что гаплоидию на основе гибридизации кукурузой можно адаптировать для различных сортов тритикале, просматриваются перспективы использования аналогичного подхода для редактирования генома тритикале.

Использование гаплоиндукции на основе различных подходов андрогенеза в сочетании с геномным редактированием имеет перспективы дальнейшего развития, особенно для ячменя и ржи. Для этих злаков использование систем на основе различных гаплопродюсеров, например, «*Secale* x *Z.mays*» или «*H. vulgare* x *H. bulbosum*», значительно менее технологично и уступает в эффективности получения гаплоидов системам на основе культуры пыльников и микроспор. Технологии редактирования геномов растений совершенствуются быстро. Одним из перспективных вариантов может рассматриваться транзитное внесение компонентов геномного редактирования в виде комплексов РНК или белок-РНК в эмбрионные гаплоидные клетки. Комплексы белок-РНК, часто называемые в литературе рибонуклеопротеидными (РНП), уже успешно применяются для геномного редактирования пшеницы, риса и кукурузы, не требующего трансгенных вставок (Tang et al., 2023; Мирошниченко и др., 2019). Такие комплексы обычно транзитно доставляются в клетки культуры пыльников и микроспор с помощью метода биобаллистики. Этот метод уже более 40 лет используется для получения трансгенных растений зерновых культур. Описаны протоколы биобаллистической доставки ДНК и плазмид в клетки и ткани культуры пыльников и микроспор ряда колосовых видов злаков с последующей регенерацией трансгенных гаплоидных расте-

ний (Ohnoutková and Vlčko, 2020; Massiah et al., 2001). В ближайшее время можно ожидать адаптации этих протоколов для редактирования геномов ячменя, пшеницы и, возможно, тритикале и ржи, с помощью РНП комплексов, которые будут транзигентно доставляться в гаплоидные эмбриогенные клетки или каллусы, из которых в дальнейшем удастся получить нетрансгенные гаплоидные растения с новыми мутациями.

#### Библиографические ссылки

1. Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Жилин С.В., Хомякова О.В., Барнашова Е.К., Калашникова Э.В., Окладникова В.П. Гаплоидия тритикале In vitro (обзор литературы) // Зерновое хозяйство России. 2022. № 1. С. 39–45. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-79-1-39-45
2. Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21, № 1. С. 104–111. DOI: 10.18699/VJ17.228
3. Калинина Н.В., Головкин С.Г., Ионова Е.В. Методы получения гаплоидов в клеточной селекции озимой пшеницы (обзор) // Зерновое хозяйство России. 2020. № 6. С. 56–63. DOI: 10.31367/2079-8725-2020-72-6-56-63
4. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Кулуев А.Р., Галимова А.А., Заикина Е.А., Хлесткина Е.К. Редактирование геномов представителей трибы пшеницевые с использованием системы CRISPR/Cas // Молекулярная биология. 2022. Т. 56, № 6. С. 949–968. DOI: 10.31857/S0026898422060155
5. Мирошниченко Д.Н., Шульга О.А., Тимербаев В.Р., Долгов С.В. Достижения, проблемы и перспективы получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом // Биотехнология. 2019. Т. 35, № 1. С. 3–26. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26
6. Ухатова Ю.В., Ерастенкова М.В., Коршикова Е.С., Крылова Е.А., Михайлова А.С., Семилет Т.В., Хлесткина Е.К. Улучшение культурных растений при помощи системы CRISPR/Cas: новые гены-мишени // Молекулярная биология. 2023. Т. 57, № 3. С. 387–410. DOI: 10.31857/S0026898423030151
7. Ahmar S., Hensel G., Gruszka D. CRISPR/Cas9-mediated genome editing techniques and new breeding strategies in cereals-current status, improvements, and perspectives // Biotechnology Advances. 2023. Vol. 69, Article number: 108248. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2023.108248
8. Bhowmik P.K., Islam M.T. CRISPR-Cas9-Mediated gene editing in wheat: A step-by-step protocol // In book: CRISPR-Cas Methods: Springer Protocols Handbooks. Humana. New York. 2020. P. 203–222. DOI: 10.1007/978-1-0716-0616-2\_13
9. Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Kagale S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9 // Scientific reports. 2018. Vol. 8, Article number: 6502. DOI: 10.1038/s41598-018-24690-8
10. Bilichak A., Sastry-Dent L., Sriram S., Simpson M., Samuel P., Webb S., Eudes F. Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes // Plant Biotechnology Journal. 2020. Vol. 18, Iss. 5. P. 1307–1316. DOI: 10.1111/pbi.13296
11. Budhagatapalli N., Halbach T., Hiekel S., Büchner H., Müller A.E., Kumlehn J. Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer // Plant Biotechnology Journal. 2020. Vol. 18, Iss. 12. P. 2376–2378. DOI: 10.1111/pbi.13415
12. Deimling S., Flehinghaus-Roux T. Haploidy in rye // In vitro haploid production in higher plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture / Ed. by S.M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veilleux. Springer, Dordrecht. 1997. Vol. 26. P. 181–204. DOI: 10.1007/978-94-017-1862-2\_10
13. Gaj T., Sirk S.J., Shui S.L., Liu J. Genome-editing technologies: principles and applications // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2016. Vol. 8, Iss. 12. Article number: a023754. DOI: 10.1101/cshperspect.a023754
14. Gurushidze M., Hensel G., Hiekel S., Schedel S., Valkov V., Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells // PloS one. 2014. Vol. 9, Iss. 3. Article number: e92046. DOI: 10.1371/journal.pone.0092046
15. Gurushidze M., Hiekel S., Otto I., Hensel G., Kumlehn J. Site-directed mutagenesis in barley by expression of TALE nuclease in embryogenic pollen // Biotechnologies for Plant Mutation Breeding / ed. by J. Jankowicz-Cieslak, T. Tai, J. Kumlehn, B. Till. Springer, Cham. 2017. P. 113–128. DOI: 10.1007/978-3-319-45021-6\_7
16. Hale B., Ferrie A.M., Chellamma S., Samuel J.P., Phillips G.C. Androgenesis-based doubled haploidy: Past, present, and future perspectives // Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 12. Article number: 751230. DOI: 10.3389/fpls.2021.751230
17. Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X.Q., Zeng J., He X., Li C. Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture // Plant communications. 2021. Vol. 2, Iss. 2. Article number: 100082. DOI: 10.1016/j.xplc.2020.100082
18. HOFFIE R.E., OTTO I., HISANO H., KUMLEHN J. Site-directed mutagenesis in barley using RNA-guided Cas endonucleases during microspore-derived generation of doubled haploids // Doubled Haploid Technology: Methods in Molecular Biology / ed. J.M. Segui-Simarro. Humana. New York. 2021. Vol. 2287. P. 199–214. DOI: 10.1007/978-1-0716-1315-3\_9
19. HOFFIE R.E., PEROVIC D., HABEKUß A., ORDON F., KUMLEHN J. Novel resistance to the Bymovirus BaMMV established by targeted mutagenesis of the PDIL5-1 susceptibility gene in barley // Plant Biotechnology Journal. 2023. Vol. 21, Iss. 2. P. 331–341. DOI: 10.1111/pbi.13948
20. Karmacharya A., Li D., Leng Y., Shi G., Liu Z., Yang S., Zhong S. Targeting disease susceptibility genes in wheat through wide hybridization with maize expressing Cas9 and guide RNA // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2023. Vol. 36, Iss. 9. P. 554–557. DOI: 10.1094/MPMI-01-23-0004-SC

21. Kelliher T., Starr D., Su X., Tang G., Chen Z., Carter J., Que Q. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction // *Nature biotechnology*. 2019. Vol. 37, Iss. 3. P. 287–292. DOI: 10.1038/s41587-019-0038-x
22. Massiah A., Rong H.L., Brown S., Laurie S. Accelerated production and identification of fertile, homozygous transgenic wheat lines by anther culture // *Molecular Breeding*. 2001. Vol. 7, P. 163–173. DOI: 10.1023/A:1011308916226
23. Miroshnichenko D., Timerbaev V., Divashuk M., Pushin A., Alekseeva V., Kroupin P., Dolgov S. CRISPR/Cas9-mediated multiplexed multi-allelic mutagenesis of genes located on A, B and R subgenomes of hexaploid triticale // *Plant Cell Reports*. 2024. Vol. 43, Article number: 59. DOI: 10.1007/s00299-023-03139-x
24. Ohnoutková L., Vlčko T. Homozygous transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants by anther culture // *Plants*. 2020. Vol. 9, Iss. 7. Article number: 918. DOI: 10.3390/plants9070918
25. Tang Q., Wang X., Jin X., Peng J., Zhang H., Wang Y. CRISPR/Cas Technology Revolutionizes Crop Breeding // *Plants*. 2023. Vol. 12, Iss. 17. Article number: 3119. DOI: 10.3390/plants12173119

### References

1. D'yachuk T. I., Akinina V. N., Zhilin S. V., Khomyakova O. V., Barnashova E. K., Kalashnikova E. V., Okladnikova V. P. Gaploidiya tritikale In vitro (obzor literatury) Triticale haploidy In vitro (review) // *Zernovoe khozyaistvo Rossii*. 2022. № 1. S. 39-45. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-79-1-39-45
2. Zlobin N. E., Ternovoi V. V., Grebenkina N. A., Taranov V. V. Sdelat' slozhnoe proshche: sovremennyyi instrumentarii dlya redaktirovaniya genoma rastenii [Making the complex simpler: modern tools for editing plant genomes] // *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*. 2017. T. 21, № 1. S. 104–111. DOI: 10.18699/VJ17.228
3. Kalinina N. V., Golovko S. G., Ionova E. V. Metody polucheniya gaploidov v kletochnoi selektsii ozimoi pshenitsy (obzor) [Methods for obtaining haploids in cell breeding of winter wheat (review)] // *Zernovoe khozyaistvo Rossii*. 2020. № 6. S. 56–63. DOI: 10.31367/2079-8725-2020-72-6-56-63
4. Kuluev B. R., Mikhailova E. V., Kuluev A. R., Galimova A. A., Zaikina E. A., Khlestkina E. K. Redaktirovanie genomov predstavitelei triby pshenitsevye s ispol'zovaniem sistemy CRISPR/Cas [Editing the genomes of wheat tribe representatives using the CRISPR/Cas system] // *Molekulyarnaya biologiya*. 2022. T. 56, № 6. S. 949–968. DOI: 10.31857/S0026898422060155
5. Miroshnichenko D. N., Shul'ga O. A., Timerbaev V. R., Dolgov S. V. Dostizheniya, problemy i perspektivy polucheniya netransgennykh rastenii s otrektirovannym genomom [Achievements, problems, and prospects for obtaining non-transgenic plants with edited genomes] // *Biotekhnologiya*. 2019. T. 35, № 1. S. 3–26. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26
6. Ukhatova Yu. V., Erastenkova M. V., Korshikova E. S., Krylova E. A., Mikhailova A. S., Semilet T. V., Khlestkina E. K. Uluchshenie kul'turnykh rastenii pri pomoshchi sistemy CRISPR/Cas: novye geny-misheni [Improvement of crop plants using the CRISPR/Cas system: new target genes] // *Molekulyarnaya biologiya*. 2023. T. 57, № 3. S. 387–410. DOI: 10.31857/S0026898423030151
8. Bhowmik P. K., Islam M. T. CRISPR-Cas9-Mediated gene editing in wheat: A step-by-step protocol // In book: *CRISPR-Cas Methods: Springer Protocols Handbooks*. Humana. New York. 2020. P. 203–222. DOI: 10.1007/978-1-0716-0616-2\_13
9. Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Kagale S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9 // *Scientific reports*. 2018. Vol. 8, Article number: 6502. DOI: 10.1038/s41598-018-24690-8
10. Bilichak A., Sastry-Dent L., Sriram S., Simpson M., Samuel P., Webb S., Eudes F. Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes // *Plant Biotechnology Journal*. 2020. Vol. 18, Iss. 5. P. 1307–1316. DOI: 10.1111/pbi.13296
11. Budhagatapalli N., Halbach T., Hiekel S., Büchner H., Müller A. E., Kumlehn J. Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer // *Plant Biotechnology Journal*. 2020. Vol. 18, Iss. 12. P. 2376–2378. DOI: 10.1111/pbi.13415
12. Deimling S., Flehminghaus-Roux T. Haploidy in rye // In *in vitro* haploid production in higher plants. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* / Ed. by S. M. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux. Springer, Dordrecht. 1997. Vol. 26, P. 181–204. DOI: 10.1007/978-94-017-1862-2\_10
13. Gaj T., Sirk S. J., Shui S. L., Liu J. Genome-editing technologies: principles and applications // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016. Vol. 8, Iss. 12. Article number: a023754. DOI: 10.1101/cshperspect.a023754
14. Gurushidze M., Hensel G., Hiekel S., Schedel S., Valkov V., Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells // *PLoS one*. 2014. Vol. 9, Iss. 3. Article number: e92046. DOI: 10.1371/journal.pone.0092046
15. Gurushidze M., Hiekel S., Otto I., Hensel G., Kumlehn J. Site-directed mutagenesis in barley by expression of TALE nuclease in embryogenic pollen // *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding* / ed. by J. Jankowicz-Cieslak, T. Tai, J. Kumlehn, B. Till. Springer, Cham. 2017. P. 113–128. DOI: 10.1007/978-3-319-45021-6\_7
16. Hale B., Ferrie A. M., Chellamma S., Samuel J. P., Phillips G. C. Androgenesis-based doubled haploidy: Past, present, and future perspectives // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 12, Article number: 751230. DOI: 10.3389/fpls.2021.751230
17. Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X. Q., Zeng J., He X., Li C. Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture // *Plant communications*. 2021. Vol. 2, Iss. 2. Article number: 100082. DOI: 10.1016/j.xplc.2020.100082

18. HOFFIE R. E., OTTO I., HISANO H., KUMLEHN J. Site-directed mutagenesis in barley using RNA-guided Cas endonucleases during microspore-derived generation of doubled haploids // *Doubled Haploid Technology: Methods in Molecular Biology* / ed. J. M. Segui-Simarro. Humana. New York. 2021. Vol. 2287, P. 199–214. DOI: 10.1007/978-1-0716-1315-3\_9
19. HOFFIE R. E., PEROVIC D., HABEKUß A., ORDON F., KUMLEHN J. Novel resistance to the Bymovirus BaMMV established by targeted mutagenesis of the PDIL5-1 susceptibility gene in barley // *Plant Biotechnology Journal*. 2023. Vol. 21, Iss. 2. P. 331–341. DOI: 10.1111/pbi.13948
20. KARMACHARYA A., LI D., LENG Y., SHI G., LIU Z., YANG S., ZHONG S. Targeting disease susceptibility genes in wheat through wide hybridization with maize expressing Cas9 and guide RNA // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2023. Vol. 36, Iss. 9. P. 554–557. DOI: 10.1094/MPMI-01-23-0004-SC
21. KELLIHER T., STARR D., SU X., TANG G., CHEN Z., CARTER J., QUE Q. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction // *Nature biotechnology*. 2019. Vol. 37, Iss. 3. P. 287–292. DOI: 10.1038/s41587-019-0038-x
22. MASSIAH A., RONG H. L., BROWN S., LAURIE S. Accelerated production and identification of fertile, homozygous transgenic wheat lines by anther culture // *Molecular Breeding*. 2001. Vol. 7, P. 163–173. DOI: 10.1023/A:1011308916226
23. MIROSHNICHENKO D., TIMERBAEV V., DIVASHUK M., PUSHIN A., ALEKSEVA V., KROUPIN P., DOLGOV S. CRISPR/Cas9-mediated multiplexed multi-allelic mutagenesis of genes located on A, B and R subgenomes of hexaploid triticales // *Plant Cell Reports*. 2024. Vol. 43, Article number: 59. DOI: 10.1007/s00299-023-03139-x
24. OHNOUTKOVÁ L., VÍČKO T. Homozygous transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants by anther culture // *Plants*. 2020. Vol. 9, Iss. 7. Article number: 918. DOI: 10.3390/plants9070918
25. TANG Q., WANG X., JIN X., PENG J., ZHANG H., WANG Y. CRISPR/Cas Technology Revolutionizes Crop Breeding // *Plants*. 2023. Vol. 12, Iss. 17. Article number: 3119. DOI: 10.3390/plants12173119

Поступила: 26.02.24; доработана после рецензирования: 03.05.24; принята к публикации: 03.05.24.

**Критерии авторства.** Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

**Конфликт интересов.** Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Авторский вклад.** Жильцов А. В., Чекалин А. А., Попова О. В., Дуванов И. В., Мирошниченко Д. Н. – анализ литературы и написание обзора.

**Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.**