



ЭВОЛЮЦИЯ МЕТОДОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В.,
Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

В статье рассмотрена эволюция методов геномного редактирования, начиная с индуцированного мутагенеза, вызывающего под действием физических факторов или химических агентов случайные мутации в геномах. Индуцированную полиплоидию принято считать геномной мутацией и при этом ее также можно рассматривать как некий вариант редактирования генома в виде полной его дубликации. Отмечено, что для эффективного направленного редактирования геномов любых организмов необходимо внесение двуцепочечных разрывов в целевые места молекул ДНК. Описываются методы направленного мутагенеза с помощью химерных олигонуклеотидов, рекомбинации с использованием мегануклеаз, искусственных молекулярных «ножниц» ARCUT, нуклеаз «цинковых пальцев», нуклеаз на основе эффекторных TAL белков, а также Cas нуклеаз, являющихся составной частью передовой CRISPR/Cas технологии редактирования геномов. Продемонстрирован весомый вклад отечественных ученых в отдельные направления получения мутантных растений, несмотря на чинимые им препятствия. Цитированная литература охватила более чем столетний период.

Ключевые слова: CRISPR/Cas технология, ZFN технология, TALEN технология, мегануклеазы, химерные олигонуклеотиды, молекулярные «ножницы» ARCUT, мутации, мутагенез, геномное редактирование

Содержание

	Стр.
Введение	245
Индуцированный мутагенез под действием физических и химических факторов	246
Индуцированная полиплоидия	248
Редактирование геномов с помощью химерных олигонуклеотидов	253
Двуцепочечные разрывы в ДНК и редактирование геномов с помощью мегануклеаз	254
Редактирование геномов с помощью ZF нуклеаз	254
Редактирование геномов с помощью TALE нуклеаз	256
Редактирование геномов с помощью CRISPR/Cas технологии	257
Редактирование геномов с помощью искусственных молекулярных «ножниц» ARCUT	259
Заключение	260
Литература	260

Введение

Биоразнообразие всего Живого есть результат бесчисленных эволюционных преобразований первых праорганизмов, первоосновой которых (преобразований) являются неизбежно происходящие спонтанные мутации, вызываемые нарушениями различных биологических процессов среди которых — репликация ДНК, репарация ДНК, генетическая рекомбинация, ведущие, в том числе, к

видообразованию. Считается, что частота таких мутаций в зависимости от организма (особенностей его генетического аппарата), особенностей участка ДНК может варьировать от 10^{-9} до 10^{-12} на нуклеотид за одну клеточную генерацию. Но помимо спонтанных, происходят еще и вызванные различными воздействиями физических факторов и химических агентов индуцированные мутации, частота которых в зависимости от силы воздействия

может различаться в очень широких пределах, достигая весьма заметных величин. Однако места возникновения таких индуцированных мутаций носят случайный характер и до некоторой степени зависят от типа мутагена и типа вызываемого им воздействия, избирательно нарушая те или иные азотистые основания в ДНК, или сами цепи ДНК. При этом такие мутации могут быть как полезными, так и вредными и даже летальными. Тем не менее, с помощью таких случайных индуцированных мутаций создано, например, большое число сортов культурных растений, характеризующихся ценными признаками, отбираемых первоначально по желательному фенотипу. Эти подходы сейчас можно назвать неосознанным редактированием геномов высших организмов, хотя все же любой процесс редактирования обычно связывают исключительно с исправлением каких-то плохих мест, будь это в геноме или в некоем тексте. К осознанным же способам внесения мутаций / редактированию ДНК следует отнести те, что производятся в конкретных местах геномов и экспериментатор заранее знает, что хочет получить на выходе. Увеличение плоидности организмов можно считать осознанной геномной мутацией, но ожидаемый эффект плохо предсказуем. Настоящие осознанные мутации вызываются, в том числе с помощью химерных олигонуклеотидов, а в последние десятилетия к ним прибавились более совершенные подходы, основанные на действии различных нуклеаз, вносящих разрывы в нужные места цепей ДНК, что позволило резко повысить эффективность такого мутагенеза, получившего название геномного редактирования. Наиболее мощным методом геномного редактирования недавно стала CRISPR/Cas технология.

В данной статье будут коротко рассмотрены различные способы как неосознанного, так и осознанного внесения в геномы высших организмов, и растений в частности, различных мутаций без рассмотрения тонких механизмов их действия. Прежде чем перейти к изложению основного материала следует акцентировать внимание читателей на том, что методы целевого мутагенеза геномов можно подразделить на направляемые белковыми молекулами (мега-нуклеазы, ZF-нуклеазы, TALE-нуклеазы) и нуклеиновыми кислотами, в том числе модифицированными (РНК-ДНК химерные олигонуклеотиды, дезоксирибоолигонуклеотиды, пептидно-нуклеотидные кислоты в виде комплекса ARCUT, молекулы РНК в CRISPR/Cas системах).

Индукцированный мутагенез под действием физических факторов и химических агентов

Хотя еще в самом начале XX-го века высказывались предположения о влиянии радиации на

наследственность, считается, что впервые это было показано только в 1927 г. американским генетиком - учеником Т.Х.Моргана Г.К.Мёллером, который продемонстрировал, что при воздействии рентгеновских лучей на дрозофилу в ее генетическом аппарате происходят определенные изменения [Muller, 1927]. Позже он стал лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 1946 г. «за открытие появления мутаций под влиянием рентгеновского облучения». Нельзя обойти вниманием тот факт, что Г.К.Мёллер, отличаясь «левыми» взглядами, некоторое время работал в СССР и даже стал в 1933 г. членом-корреспондентом АН СССР, затем публично отказавшись от членства в ней в 1948 г. после августовской сессии ВАСХНИЛ (о которой еще пойдет речь) и вновь восстановленный в членах Академии уже посмертно в 1990 г. Но еще раньше в 1938 г. Г.К.Мёллер был вынужден покинуть Советский Союз и обосноваться тогда в шотландском Эдинбурге, причем упоминание этого города здесь не случайно, поскольку ниже к нему еще вернемся. Однако для восстановления исторической справедливости следует сказать, что Г.К.Мёллера на несколько лет опередил выдающийся российский ботаник, микробиолог, генетик Г.А.Надсон, проводя исследования по влиянию радиации на живые организмы, вызывая тем самым мутационные изменения у низших грибов¹ [Надсон, 1920; Надсон, Филиппов, 1925; Nadson, 1925]. Хотя Г.А.Надсон и был убежден, что открытое им явление относится к категории мутаций, но он находился под давлением генетиков, считавших, что для такого утверждения требуется точный генетический анализ [Курсанова, 2017].

Тем не менее, именно открытие Г.К.Мёллера дало толчок многочисленным исследованиям в этом направлении. Так, вскоре в США L.J.Stadler провел радиационный мутагенез кукурузы [Stadler, 1928], а затем овса и гексаплоидной пшеницы [Stadler, 1929], опубликовав затем по этим и другим своим исследованиям обзорную статью [Stadler, 1930]. В СССР в те же годы работающий тогда в Одессе А.А.Сапегин также провел радиационный мутагенез мягкой пшеницы и опубликовал статью на немецком языке в журнале Der Züchter (ныне Theoretical and Applied Genetics) [Sapehin, 1930]. [Курсанова, 2015]

¹ За этот свой вклад в мутационные исследования Г.А.Надсон, ставший членом-корреспондентом АН СССР в 1928 г и действительным членом в 1929 г., также мог рассчитывать на получение Нобелевской премии вместе с Г.К.Мёллером, если бы не был обвинен по ложному доносу в 1937 г. и не расстрелян в апреле 1939 г. (реабилитирован в 1955 г.)

Работы по радиационному мутагенезу растительных объектов продолжают и сейчас. Так, с помощью воздействия электромагнитных излучений на живые организмы и на семена растений в частности создано немало ценных сортов сельскохозяйственных растений, возделываемых в широких масштабах. Но помимо рентгеновского излучения, γ -лучей ^{60}Co или ^{137}Cs , быстрых нейтронов и других источников ионизирующего излучения [Nilan, 1973; Kodym, Afza, 2003; Waje et al., 2009; Muthusamy, Jayabalan, 2013], для индуцированного мутагенеза растений сейчас продолжают использоваться ультрафиолетовые лучи [Bose, 2014], а также стала применяться холодная плазма [Zhang et al., 2014] и даже повышенное атмосферное давление (до 100 МегаПаскалей), под действием которого в семенах риса произошло некоторое количество мутаций [Zhang et al., 2013]. Учитывая высокую опасность использования постоянно излучающих источников радиации, в последние годы все больше работ по мутагенезу различных растительных объектов (арабидопсиса, табака, риса, пшеницы и др.), вызываемого воздействием физических факторов, проводится с помощью ионных лучей, которые возникают только при их специальной генерации [Zengliang et al., 1991; Hase et al., 1999; Wu, Yu, 2001; Li et al., 2011; Ling et al., 2013; Du et al., 2014; Mondal et al., 2017], причем нельзя не отметить значительное количество работ с их использованием, выполненных китайскими авторами.

Другой выдающийся российский, советский ученый Н.К.Кольцов – основатель экспериментальной биологии в нашей стране заинтересовался поиском химических веществ, влияющих на наследственность и в организованном им летом 1917 г. Институте экспериментальной биологии, бессменным директором которого он был до 1938 г., такие исследования в 1930-ые гг. стали проводить его ученики В.В.Сахаров и М.Е.Лобашев, но использованные ими реагенты в виде йода и уксусной кислоты были слишком слабы чтобы вызывать большое число мутаций. Прогресс в этой области намечился, когда к этим исследованиям подключился другой ученик Н.К.Кольцова И.А.Рапопорт², который

² Ушедший добровольцем на фронт 23 июня 1941 г. за несколько дней до назначенной на начало июля защиты своей докторской диссертации И.А.Рапопорт воевал, не щадя живота своего, неоднократно был ранен, потерял левый глаз и трижды представлялся к награждению званием Героя Советского Союза, но каждый раз в силу различных причин Звезда Героя ему не вручалась. Справедливости ради следует сказать, что незадолго до своей трагической кончины И.А.Рапопорт в 1990 г. был все же был удостоен

еще перед войной обнаружил вещества, вызывающие заметное число мутаций, но опубликовать статью на этот счет смог только после войны [Рапопорт, 1946]. В том же году в журнале Nature вышла статья С.Аuerbach [Auerbach, Robson, 1946], всю жизнь проработавшей в Шотландии, в Эдинбурге, после того как была вынуждена покинуть нацистскую Германию в 1933 г. Она в своих опытах использовала горчичный газ (боевое отравляющее вещество – иприт) и достигла 24% мутационных событий у особей дрозофил (за 100% принимается появление 100 мутаций на 100 хромосом дрозофилы). При этом в этой статье упоминается, что первые крупномасштабные исследования влияния иприта на наследственность ими были начаты в 1941 г. и весной 1942 г. в Министерство снабжения Великобритании был отправлен соответствующий отчет. В 1944 г. ими была опубликована статья [Auerbach, Robson, 1944], в которой сообщалось об использовании для индуцирования мутаций у дрозофилы аллилизотиоцианата и также говорилось, что ими найдено более сильное действующее вещество, вызывающее до 24% мутаций – видимо это и был иприт, являющийся алкилирующим агентом. Здесь, пожалуй, стоит добавить то, что интерес у С.Аuerbach к химическому мутагенезу проявился после того, как в Эдинбург приехал уже упоминавшийся будущий Нобелевский лауреат Г.К.Мёллер и они какое-то время даже работали вместе.

Однако все же именно И.А.Рапопорту принадлежат основные заслуги в продвижении химического мутагенеза, в том числе в селекции растений. Им было испытано большое количество соединений различной природы и среди них найдены сильные мутагены и даже супермутагены [Рапопорт и др., 1966]. С использованием многих соединений селекционерами нашей страны и всего мира создано множество сортов различных культурных растений. Это не могло не пройти незамеченным и в 1962 г. Нобелевским комитетом было принято решение выдвинуть в качестве номинантов на премию С.Аuerbach и И.А.Рапопорта, что было вполне логично, учитывая, что за радиационный мутагенез Нобелевская премия присуждена уже была, а химический мутагенез оказался не менее действенным. Но их номинирования на премию в итоге так и не произошло, поскольку Швеция, памятуя

Звания Героя Социалистического труда и ему были вручены Орден Ленина и золотая медаль «Серп и Молот», а ранее в 1984 г. ему была вручена Ленинская премия за цикл работ «Явление химического мутагенеза и его генетическое изучение». О жизненном пути этого неординарного человека можно прочесть в книге его жены и биографа О.Г.Строевой [2009].

об организованной травле поэта Б.Л.Пастернака после присуждения ему незадолго до этого в 1958 г. Нобелевской премии по литературе, способствующей его преждевременной кончине, решила обратиться сначала к Советскому правительству, понимая, что выдвигает на премию опального генетика. По воспоминаниям самого И.А.Рапопорта его тогда пригласили в ЦК КПСС и предложили заново вступить в партию, после того как он был из нее исключен в результате печально знаменитой сессии ВАСХНИЛ. Но И.А.Рапопорт им сказал: «Я не хочу восстанавливаться в партии за 60000 долларов»³ [Митрофанов, 2001]. Возможно все же И.А.Рапопорт был не прав и дело совсем не в деньгах, а наша страна в итоге лишилась абсолютно заслуженного лауреата Нобелевской премии, что могло бы способствовать дальнейшему расцвету генетических исследований в стране и объективному принижению работ Т.Д.Лысенко, который тогда по-прежнему еще пользовался поддержкой властей. Да и С.Аuerbach за свои исследования Нобелевскую премию так и получила... Но И.А.Рапопорт в очередной раз продемонстрировал свою твердость и смелость, а также принципиальную гражданскую позицию.

По воспоминаниям Н.С.Эйгес И.А.Рапопорт никогда не говорил о направленном получении мутаций - «Очевидно он понимал, что на данном этапе ставить этот вопрос преждевременно. Он говорил, что самое главное – это получить максимально широкое разнообразие, для того чтобы селекционеры могли выбирать нужные признаки» [Эйгес, 2013]. И чуть ниже к рассмотрению современных способов таких направленных мутаций мы как раз перейдем.

Тем не менее, химический мутагенез для образования случайных мутаций при создании новых сортов культурных растений во всем мире использовался на протяжении нескольких десятилетий. В специальной базе данных Mutant Variety Database <https://mvd.iaea.org> собраны сведения о более чем 3200 искусственно произведенных мутантах сельскохозяйственных растений, относящимся к двумстам видам, причем немалая их часть получена именно с помощью химического мутагенеза, который до сих пор активно применяется. В качестве свежих примеров можно привести ряд недавних работ, где для мутагенеза разных растений (бурачник лекарственный, мягкая пшеница, чечевица, соя,

³ Видимо в тот год это была денежная составляющая Нобелевских премий, которая резко выросла лишь с 2001 г. и сейчас равна 10 млн. шведских крон или около 1 млн. 250 тыс. долларов США, что с учетом инфляции соответствует приблизительно двумстам тысячам долларов начала 60-х гг. прошлого века.

вигна, рис) преимущественно используется предложенный И.А.Рапопортом метилэтансульфонат [Dhaliwal et al., 2015; Li et al., 2017; Rizvan et al., 2017; Song et al., 2017; Souza et al., 2017; Xu et al., 2017 и др.]. Вполне предсказуемо, что при повышении концентрации химических мутагенов возрастает количество производимых ими мутаций, но ранее подтвердить это было невозможно, пока не появилось полногеномное секвенирование⁴, благодаря которому стало достоверно известно сколько, каких и где изменений в геноме произошло [Galindo-Gonzales et al., 2015; Thole, Strader, 2015], и ряд таких работ уже упомянуты в другой нашей статье в этом же номере журнала Биомика [Баймиев и др., 2017].

Индукцированная полиплоидия

В настоящее время известно, что около 70% растений имеют природный полиплоидный статус, при этом преобладает аллополиплоидия, когда в составном геноме при гибридизации объединены происходящие от разных исходных видов отличающиеся субгеномы, тогда как автополиплоидов с кратным увеличением числа одного и того же набора хромосом несколько меньше. Однако немало и диплоидных видов, в том числе среди культурных форм, которые представляют интерес для селекционеров для повышения их уровня плоидности, поскольку полиплоиды часто характеризуются увеличением размеров клеток и органов (листьев, цветков, плодов), повышением содержания некоторых целевых метаболитов и рядом других важных для человека черт. Поэтому значительное количество работ в области селекции преследуют цель в виде направленного искусственного получения полиплоидных форм.

Удвоение числа хромосом у растений производится обычно под действием алкалоида трополонового ряда колхицина, выделяемого из растения безвременника осеннего (*Colchicum autumnale* L.), хотя используются и другие химические соединения, но все они уступают колхицину по эффективности процесса получения полиплоидов, который даже называют «колхицинированием». Мы намеренно не рассматриваем здесь случаи неравномерной полиплоидизации, когда у потомства возникает некратное исходному число хромосом, поскольку это не входит в задачи данной статьи.

⁴ О котором на русском языке можно почитать в следующих публикациях – Зубов, 2013; Ребриков и др., 2014.

В действительности таких искусственных полиплоидных растений, над которыми произведена геномная мутация в виде дубликации всего генома, как в нашей стране, так и за рубежом получено уже немало, но мы решили в качестве удачного примера создания такого растения остановиться на одном тетраплоидном виде, который доказал свои уникальные свойства, но по-видимому не сохранился. Другой причиной того, что мы уделяем внимание именно этому растению служит то, что оно (это растение, а также его основной метаболит) входят в сферу наших научных интересов [Кулуев и др., 2015; 2017; Гаршин и др., 2017].

Итак, что же это за растение? Это одуванчик, но не простой, а каучуконосный, называемый кок-сагыз или *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. Этот вид был впервые описан в 1931 г. сотрудником Ботанического института АН СССР Л.Е.Родиным. Местами его естественного произрастания считаются Кегенская, Сарджасская и Текесская долины восточного Тянь-Шаня, расположенные на высотах около 2000 метров и имеющие координаты между 79° и 80°30' восточной долготы и 42°20'-43°20' северной широты [Половенко, 1951].

В начале 1930-х гг. был произведен анализ значительной части флоры Советского Союза на предмет выявления каучуконосности растений, оказавшийся беспрецедентным по своему размаху. Самое богатое представительство каучуконосов на территории СССР было зафиксировано в семействе астровых *Asteraceae*. Настоящим кладезем каучука оказались некоторые виды одуванчиков и скорцонер из того же семейства астровых или сложноцветных. Целью таких поисков было обеспечение страны собственным натуральным каучуком, чтобы уйти от зависимости от завозимого каучука из тропической гевеи. То есть, используя современные термины – осуществить импортозамещение. Надо сказать, что до некоторой степени это удалось – весьма быстро росли посевы под кок-сагызом по всей территории страны. После того как первые каучукпромхозы по выращиванию кок-сагыза были созданы в Средней Азии в 1932 г. границы возделывания этого растения были сильно расширены преимущественно за счет Европейской части СССР, где во многих областях РСФСР стало вестись активное возделывание кок-сагыза, посевы которого были затем распространены на всю Белоруссию, часть Украины и Прибалтики. В 1938 г. посевы кок-сагыза занимали 15 тыс. га и строились планы довести площади под ним до 250 тыс. га.

Селекционеры-мичуринцы по всей стране вели неустанную работу по получению новых форм кок-сагыза с увеличенным выходом каучука.

Подключились к этому процессу и классические генетики, которые решили повысить плоидность этого растения. За эту работу взялся М.С.Навашин – известный специалист в области цитологии растений, обнаруживший, в том числе, явление ядрышкового доминирования у гибридных растений скерды из рода *Crepis*, названного им «амфипластией» [Navashin, 1928]. Нельзя не отметить, что его отец С.Г.Навашин еще в начале XX-го века [Навашин, 1912; 1915] обнаружил у гиацинта и мускари как раз такое явление ядерного диморфизма, проявляющегося в изменении числа хромосом со спутниками, «привешенными на нитях к концам аутохромозом» (цит. по оригиналу) и, таким образом, отделенными от основной части хромосом участком, известным ныне как вторичная перетяжка и служащим, как мы сейчас знаем, местом локализации генов рРНК. Навашиным-старшим тогда было обнаружено исчезновение и появление этой вторичной перетяжки на одной из хромосом у отдельных индивидуальных растений данных видов, вызываемой, как теперь известно, дифференциальной экспрессией генов рРНК, заключающейся в функционировании только определенных локусов рДНК и подавлении ими остальных, наблюдающейся у аллополиплоидных видов растений. Причем это именно тот самый С.Г.Навашин, который открыл двойное оплодотворение у растений и опубликовал соответствующую статью на немецком языке в 1898 г. в Известиях Императорской Академии Наук [Nawaschin, 1898], причем этот результат русского ученого, безусловно, также заслуживал присуждения Нобелевской премии. Но и тогда не сложилось, возможно, по причине того, что это важнейшее открытие не подходило ни под одну из номинаций, установленных А.Нобелем.

Возвращаясь к полиплоидии и колхицинированию, надо заметить, что как раз в конце 30-х гг. прошлого века только-только стали таким способом получать полиплоидные формы у растений. Первые публикации, в которых описывались колхицинированные полиплоидные растения (дурман) датируются 1937 г. [Blakeslee, Avery, 1937] после чего в разных странах последовал буквально вал работ по колхицинированию разных сельскохозяйственных растений [Eigsti, Dustin, 1955]. Так, сообщалось, что тетраплоидные виды родов *Atropa*, *Datura* и *Hyoscyamus* характеризовались увеличенным содержанием алкалоидов [Rowson, 1944]. Индуцированной полиплоидизации культурных растений стало уделяться серьезное внимание, рассматривались экономические моменты, ввиду потенциального положительного влияния

полиплоидии на урожайность [Bates, 1939; Randolph, 1941]. Получению с использованием колхицина полиплоидных хлопчатников была посвящена довольно большая экспериментальная статья [Beasley, 1940].

В нашей стране Г.Д.Карпеченко⁵ колхициновой обработкой получил в те годы тетраплоидный шестирядный ячмень [Карпеченко, 1941]. Интересно отметить, что в одной из работ по полиплоидизации лука и томатов [Shimamura, 1939] автор упоминает, что в своей работе он использовал предложенные Навашиным-старшим считавшуюся оптимальной средой для фиксации «Navashin fluid» и краситель генциан фиолетовый.

Растения тетраплоидного кок-сагыза были получены М.С.Навашиным и сотрудниками в 1939 г. [Навашин, Герасимова, 1940]. В их следующей статье [Навашин, Герасимова, 1941] были приведены результаты анализа созданной популяции тетраплоидных кок-сагызов из более чем ста растений. Отмечается, что все растения отличались исключительно мощным развитием и крупными размерами всех частей, а вес семян превосходил таковой у диплоидов практически в два раза. Также в их статье 1941 г. сообщается, что было собрано уже свыше 100 тысяч семян, которые будут высеяны весной 1941 г. Но война внесла свои коррективы в данную работу, и посевы были тогда вынужденно перенесены в Казахстан, а затем и в Курскую область после ее освобождения от гитлеровских оккупантов. Научно-исследовательская работа во время войны продолжалась и в 1945 г. была опубликована статья [Навашин и др., 1945], подводящая, как написали авторы, «предварительный итог нашей работы над тетраплоидией у кок-сагыза за последние 3 года». В статье было продемонстрировано, что практически по всем параметрам тетраплоидный кок-сагыз значительно превосходит обычный. Значительное превышение было показано по массе корней, в среднем составившее около 60%. При этом по процентному содержанию каучука тетраплоиды были

сопоставимы с диплоидами, либо незначительно превосходили последние.

Особого внимания заслуживает упоминание авторов о том, что каучук тетраплоидного кок-сагыза характеризовался большей степенью полимеризации, о чем им устно сообщил Л.Г.Добрунов, но видимо эти результаты остались неопубликованными. Причем, именно полимерность является одной их важнейших характеристик натурального каучука и чем она выше – тем каучук - лучше. В этой статье Навашин и соавт. отмечают оказываемое им содействие со стороны треста Главрасткаучук и что тетраплоидный кок-сагыз направлен на широкое сортоиспытание и выражают надежду на результаты географических посевов, которые могут дать дополнительную важную информацию.

Однако с этими испытаниями не все оказалось гладко. Так, положительные данные о тетраплоидном кок-сагызе засекречивались и замалчивались, а результаты лабораторных анализов задерживались месяцами и выдавались с пояснениями, рассчитанными на дискредитацию тетраплоидного кок-сагыза. После того как в 1947 г. был впервые получен крупный урожай семян (две тонны) Т.Д.Лысенко заявил главному агроному производственного сектора Главрасткаучука «чтобы тетраплоида не было ни в совхозах, ни в колхозах». Здесь придется обратиться к печально знаменитой сессии ВАСХНИЛ 1948 г., одним из толчков к проведению которой как раз послужил как ни странно именно тетраплоидный кок-сагыз, поскольку Ю.А.Жданов, возглавлявший Отдел науки при ЦК ВКП(б), достаточно реально оценивал ситуацию вокруг генетики и понимал ошибочность многих догм мичуринской биологии, насаждаемой Т.Д.Лысенко и, понимая важность тетраплоидного кок-сагыза для повышения добычи натурального каучука в стране, направил 28 февраля 1948 г. И.В.Сталину докладную записку «О тетраплоидном кок-сагызе» с копиями Г.М.Маленкову и А.А.Жданову, в которой прямо ставил вопрос о вреде, наносимом сельскому хозяйству страны Т.Д.Лысенко, создавшим обстановку враждебности и недоверия к тетраплоидному кок-сагызу и утверждавшему, что тетраплоиды - уроды. Также Ю.А.Жданов предлагал обратить самое серьезное внимание на работы М.С.Навашина и помочь тому. Именно после этого серьезного выпада против него Т.Д.Лысенко написал очередное личное письмо Сталину, с которого и началась подготовка к августовской сессии ВАСХНИЛ. (Другие многочисленные предпосылки для того, чтобы в СССР состоялась это публичное издевательство над настоящими учеными-генетиками, готовящееся в

⁵ Ранее Г.Д.Карпеченко в 1927 г. удалось получить с помощью полиплоидизации (без использования колхицина) первый межродовой гибрид Рафанобрассику. После ложного доноса и обвинения в шпионско-вредительской деятельности, к которой была добавлена поставленная ему в вину открытая борьба против «передовых методов научно-исследовательской работы и ценнейших достижений академика Лысенко по получению высоких урожаев» Г.Д.Карпеченко был расстрелян 28 июля 1941 г. в возрасте 42 лет, (реабилитирован в 1956 г.)

общей сложности более десятилетия, довольно подробно рассмотрены в статье В.М.Баутина и В.И.Глазко [2008], написанной в связи 60-летием того ужасного события.)⁶ Из имеющегося у нас экземпляра книги со стенографическим отчетом той сессии ВАСХНИЛ⁷ [1948] можно видеть, что

⁶ Хотя можно встретить и другую точку зрения [Миронин, 2010], что эту сессию ВАСХНИЛ специально задумывали и готовили сами генетики, чтобы прекратить воцаряющееся мракобесие и одержать окончательную победу над Т.Д.Лысенко, тем более, что положение того после войны заметно пошатнулось, поскольку его младший брат Павел Лысенко (химик по образованию) сдался гитлеровцам и по некоторым сведениям был даже какое-то время бургомистром Харькова, затем стал невозвращенцем, эмигрировав в 1949 г. из Германии в США, и, следовательно, Т.Д.Лысенко по понятиям того времени стал «членом семьи изменника Родины» со страшной аббревиатурой ЧСИР, что обычно не сулило таким людям ничего хорошего, однако эта информация тщательно скрывалась властями, а сам Т.Д.Лысенко сразу после Победы 10 июня и затем 10 сентября 1945 года был награжден своим вторым и третьим орденами Ленина «за успешное выполнение задания правительства в трудных условиях войны по обеспечению фронта и населения страны продовольствием, а промышленности сельскохозяйственным сырьем», а 29 сентября 1948 г. (вскоре после той самой сессии ВАСХНИЛ) – очередным Орденом Ленина (всего у него их было 8 и последний получен в 1961 г.). Так, что генетики, похоже, просчитались, а их инициатива была перехвачена. Но не обошлось и без марксистко-ленинской идеологии, тем более, что в те годы на Западе началась очередная кампания по дискредитации Т.Д.Лысенко, в которой приняли участие и некоторые советские ученые, в частности А.Р.Жебрак, опубликовавший статью в Science [Zhebrak, 1945] фактически о том, что не все ладно в советской биологической науке, хотя он пытался именно показать, что никакого политического давления на генетику в СССР не оказывается, но вышло скорее наоборот, а это уже пахло антисоветчиной и И.В.Сталин, узнавший об этой статье, остался крайне недоволен таким выпадом. Был целый ряд еще и других обстоятельств почему тогда победил Т.Д.Лысенко и его сторонники [Soyfer, 1989].
⁷ Данный отчет был издан со значительными угодными Лысенко купюрами двухсоттысячным (!) тиражом, видимо, чтобы запугать всех кого только было можно и нужно, поскольку это проверенный и испытанный способ подавления и подчинения себе посредственностью неугодных ему людей.

тетраплоидный кок-сагыз разными выступающими вспоминался неоднократно, служа одним из камней преткновения между «классической» и «мичуринской» генетикой. Говорил о нем и упоминаемый выше знаменитый И.А.Рапопорт, оставшийся фактически самым непримиримым противником мичуринской биологии. Также следует отметить, что жестко выступил ректор ТСХА акад. В.С.Немчинов, который подчеркнул огромную значимость открытия хромосом и хромосомной теории, прямо заявив, что «В теоретической основе я считаю, что в отношении хромосомной теории наследственности Трофим Денисович не прав».

В своем заключительном докладе Т.Д.Лысенко, обрував и раскритиковав (отчасти справедливо) получаемые «морганистами» полиплоидные формы различных растений, коснулся вопроса и о тетраплоидном кок-сагызе, против которого сильно возражать не посмел, сказав буквально следующее - «Остается один только тетраплоидный кок-сагыз. Этот кок-сагыз сейчас первый год испытывается в колхозах. Если он окажется хорошим, то само собой разумеется, что должен быть внедрен в производство. Пока он, однако, по данным трехлетнего государственного сортоиспытания, не лучше, чем обычные диплоидные сорта, хотя бы селекционера Булгакова. В этом году впервые тетраплоидный кок-сагыз начали испытывать в колхозах. Пройдет два-три года, и жизнь покажет, насколько он хорош. Искренне желаю, чтобы этот кок-сагыз оказался лучшим из всех форм кок-сагыза. Ведь от этого производству будет только польза». Видимо понимал народный академик, что с высокой трибуны лучше сильно не противиться тетраплоидному кок-сагызу, который мог реально повысить урожайность этой важной стратегической культуры. Что касается «личного вклада» самого Т.Д.Лысенко в каучуководство кок-сагыза (обычного), то ему принадлежат рекомендации по посеву семян ручным гнездовым способом (по щепотке семян в лунку) и также по размножению кок-сагыза черенкованием корневищ.

Тем не менее, пройдя все необходимые государственные испытания, преодолев сильнейшее сопротивление со стороны Т.Д.Лысенко, тетраплоидный сорт кок-сагыза ТН был все же рекомендован к внедрению и районированию, а его создатели получили авторские свидетельства СССР. В 1951 г. этот сорт занимал площадь уже в 7000 га, но в 1952 г. он резко перестал быть нужен... Так, в связи с развитием масштабного производства синтетического каучука Правительством СССР в 1952 г. было принято решение о ликвидации трестов и заготовительных пунктов по производству натурального каучука. Лысенко, который после той сессии ВАСХНИЛ,

заимел еще большую власть над биологией, когда выращивание собственных каучуконосов в СССР стало неактуальным возможно позаботился скорее о ликвидации этого сорта, нежели о его сохранении и передачи в коллекцию ВИРа. Тем более, что вскоре после той сессии ВАСХНИЛ его автор М.С.Навашин был вынужден сменить работу, перебравшись в Ботанический институт АН СССР в Ленинград, потому что закрыли его лабораторию в Москве в Институте генетики АН СССР, возглавлявшимся Т.Д.Лысенко. В 1951 г. в журнале «Агробиология» М.С.Навашин с Е.Н.Герасимовой-Навашиной [1951] опубликовали, возможно, последнюю статью о тетраплоидном кок-сагызе, в которой дискутировали о тетраплоидии вообще с позиций победившей в СССР мичуринской биологии, а также с учетом «ложных» мировоззрений морганистов-вейсманистов, пытаясь, видимо, насколько это было возможно защитить от нападок свое «детище», апеллируя, в том числе, к предложенному ими оригинальному способу получения тетраплоидов путем воздействия колхицина на меристему корня, которая по учению Мичурина-Лысенко должна оставаться «стадийно молодой», однако в сопровождающем статью материале «От редакции» был неумолимо приведен фрагмент о полиплоидах из все того же заключительного доклада Т.Д.Лысенко⁸, сделанном им на августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г., и недвусмысленно заявлено, что тетраплоидный кок-сагыз ничуть не лучше обычных диплоидных сортов.

Так, при анализе текстов статей С.Н.Кутузовой и соавторов [Кутузова и др., 2015], где они всесторонне изучили 24 сорта кок-сагыза из коллекции ВИРа, среди которых были (цитируется по предыдущей экспериментальной статье Кутузовой и Петросян, 2011) «дикорастущие популяции, привезенные экспедициями ВИР из Казахстана в 1963-1965 гг., а также отборы и сорта, созданные в результате селекции в разных регионах СССР (Казахстан, Белоруссия, Киевская, Сумская, Харьковская, Черниговская, Полтавская области Украины; Татария; Воронежская, Тульская, Курская, Московская области России)» можно видеть, что тетраплоидный кок-сагыз ими не упоминается, что косвенно свидетельствует, что его в коллекции ВИРа нет, иначе бы он был бы непременно взят в исследование вместе с другими сортами и дикими образцами с учетом его уникальных свойств. Думать, что тетраплоидный кок-сагыз нигде сейчас не произрастает - заставляет и ряд других обстоятельств. Так, вероятность того, что тетраплоидный кок-сагыз, одичав, случайно сохранился в дикой природе в местах, где он возделывался, крайне мала. Причиной такого неверия служит то, что например, на территории

Республики Башкортостан, несмотря на то, что в ряде районов, вплоть до начала 1950-х гг. обычный кок-сагыз выращивался на значительных площадях, достигавших почти 10 тысяч гектаров, он нигде не сохранился и сейчас не встречается в дикой природе, о чем нам известно со слов крупного специалиста ботаника А.А.Мулдашева, знающего флору Башкортостана практически как «свои пять пальцев». Ну и еще одной причиной является упомянутое выше ненавистное отношение к нему со стороны всесильного тогда Т.Д.Лысенко. Наиболее вероятным исходом событий тех лет можно считать, что созданный М.С.Навашиным с коллегами тетраплоидный кок-сагыз утерян, хотя будем рады ошибиться.

Но поскольку в США, Западной Европе, в других странах в последние годы вновь обратили самое пристальное внимание на кок-сагыз, как на альтернативный источник натурального каучука, то с учетом уникальных свойств созданного в СССР и затем исчезнувшего тетраплоидного кок-сагыза, такой надо получать заново, произведя дубликацию всего генома с помощью все того же колхицина. Справедливости ради следует сказать, что в 40-ые годы прошлого столетия в США также был получен тетраплоидный кок-сагыз, который характеризовался аналогичными свойствами в виде заметно увеличенных размеров всего растения, листьев, семян, корней [Warmke, 1945]. Так, было показано, что лучшие образцы тетраплоидов по накоплению каучука (сухой вес корня x содержание каучука в %) превосходили лучшие природные диплоидные растения более чем в 4 раза. Однако судьба американского тетраплоидного кок-сагыза также неизвестна, поскольку ни в одной из современных публикаций, в том числе американских и европейских авторов по кок-сагызу его полиплоидные формы не упоминаются. Не сохранились, похоже, и следы другого тетраплоидного кок-сагыза, полученного в том же Институте генетики АН СССР еще в 1938 г. Так, в статье, вышедшей в 1939 г. [Костов, Тибер, 1939], говорится, что в результате обработки перед посевом семян кок-сагыза колхицином удалось получить одно тетраплоидное растение, характеризовавшееся более мощным ростом и увеличенным размером семян, число которых достигло 27, возможно, давших потомство, но об этом информации нет. Спустя год к получению тетраплоидного кок-сагыза приступил М.С.Навашин. Причем ни в одной из своих статей [Навашин, Герасимова, 1940; 1941; Навашин и др., 1945], посвященных тетраплоидному кок-сагызу, не упоминается аналогичная работа их коллег по Институту [Костов, Тибер, 1939] и о причинах этого сейчас, наверное, можно только гадать. Возможно, тот кок-сагыз оказался химерным растением с

⁸ Являвшимся главным редактором Агробиологии.

неполноценной тетраплоидией и об этом косвенно свидетельствуют упоминания в первой статье М.С.Навашина 1940 года, что обработка колхицином семян кок-сагыза дает худшие результаты и поэтому они выбрали в качестве стартового материала именно корни и что надо для селекционной работы иметь не одно, а массу растений. К тому же в те годы в экспериментальных статьях было не очень принято приводить много ссылок, вот они и не сослались на неудачный результат своих коллег. Но как бы то ни было, тетраплоидного кок-сагыза сейчас, похоже, нигде нет и его надо получать заново.

Для подтверждения того, что получение полиплоидных растений по-прежнему актуально можно привести, например, недавнюю работу белорусских авторов, произведших дубликацию генома ржи, причем с использованием закиси азота [Белько и др., 2014]. Колхицинированием получены тетраплоиды у горошка мохнатого [Tulay, Unal, 2010], змееголовника [Zahedi et al., 2014], мандарина [Surson et al., 2015], яснотки белой [Javadian et al., 2017], гречишки татарской [Wang et al., 2017] и других растений. Кроме полиплоидизации всего растения в ряде случаев представляют интерес его отдельные полиплоидные ткани и органы, например корни. Так, показано, что при повышении плоидности вызываемых инфицированием почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes* растущих независимо от самого растения так называемых косматых (hairy) корней с помощью их обработки колхицином у полыни значительно (до 6 раз) выросло накопление целевого метаболита артемизинина [Jesus-Gonzalez, Weathers, 2003], за использование которого при лечении малярии в 2015 г. присуждена, кстати, Нобелевская премия по физиологии и медицине китайке У.Ту. При этом интерес к косматым корням разных растений в мире довольно велик, что можно видеть, в том числе, из нашего недавнего обзора, где всесторонне рассмотрены различные аспекты их применения [Кулуев и др., 2015a].

Редактирование геномов с помощью химерных олигонуклеотидов

При работе с одним из генов пузырчатой головни кукурузы *Ustilago maydis* было обнаружено, что химерные олигонуклеотиды, содержащие как дезоксирибо-, так и рибонуклеотидные основания со специально сформированной вторичной структурой в виде шпилек с короткими петлями из тиминов на концах и одним ником гораздо лучше обычных олигонуклеотидов способствуют событиям гомологичной рекомбинации [Kmiec et al., 1994], что в дальнейшем легло в основу метода мутагенеза, провоцируемого такими химерными РНК-ДНК олигонуклеотидами. Несмотря на то, что первые

успехи такого редактирования отдельных генов были достигнуты на животных объектах при коррекции мутаций серповидно-клеточной анемии [Cole-Strauss et al., 1996] и при введении точечных мутаций в гене тирозиназы для восстановления пигментации у мышей-альбиносов *in vitro* и *in vivo* [Alexeev, Yoon, 1998; Alexeev et al., 2000] для данной статьи представляют больший интерес работы, где после подобного геномного редактирования были получены полноценные организмы, а именно растения, в которых новый признак мог передаваться потомству. Вдаться в механизм происходящих мутаций, который, считается к тому же не до конца ясным, также не хотим, поскольку здесь более интересен сам факт появления измененных форм организмов.

Мутагенез с использованием химерных РНК-ДНК олигонуклеотидов у растений был впервые проведен в 1999 г., когда в одном номере журнала были опубликованы тандемом две статьи разных групп авторов [Beetham et al., 1999; Zhu et al., 1999], в которых у табака и кукурузы описывалось восстановление дефектного гена зеленого флуоресцентного белка и произведенные мутации одного нуклеотида в гене ацетолактатсинтазы, обеспечивающей возникновение (хотя и весьма с низкой частотой) устойчивости к гербицидам имидазолину и сульфонилмочевине. После этого последовал еще ряд аналогичных работ с этими же видами растений [Zhu et al., 2000; Kochevenko, Willmitzer, 2003], а также с рисом [Okuzaki, Toriyama, 2004]. Ввиду низкой эффективности такого процесса мутагенеза в одной из статей [Ruiter et al., 2003] утверждалось, что вклада химерных олигонуклеотидов никакого нет и это всего лишь спонтанные мутации. Однако другие авторы обратили внимание все же на превышение в 10-20 раз вероятности таких событий по сравнению со случайными мутациями и заодно показали, что в их случае при восстановлении свечения GFP себя лучше зарекомендовали одноцепочечные дезоксирибоолигонуклеотиды, нежели химерные [Dong et al., 2006]. Подготовлен специальный веб-ресурс MODEST (MAGE (Multiple Automated Genome Engineering) Oligo DESign Tool), позволяющий конструировать олигонуклеотиды для проведения редактирования геномов [Bonde et al., 2014].

Существует еще ряд вариаций мутагенеза с помощью олигонуклеотидных конструкций, устроенных и обозначаемых по-разному, что рассмотрено в некоторых обзорах [Breyer et al., 2009; Sauer et al., 2016]. Несмотря на то, что полученные таким образом мутантные растения ГМО не являются ввиду воспроизведения в них возможных природных процессов и казалось бы могут быть широко востребованы, перспективы использования такого

подхода довольно скромны ввиду, во-первых, низкой эффективности процесса внесения мутаций, а, во-вторых, серьезных трудностей отбора желательных растений, если нужны какие-то другие формы, а не с восстановленным репортерным геном или с возникающей устойчивостью к конкретному гербициду.

Двучепочечные разрывы в ДНК и редактирование геномов с помощью мегануклеаз

Для растений возможность направленного изменения отдельных генов была показана на примере табака путем рекомбинации вместо стандартного трансгеноза еще в 1988 г. [Paszkowski et al., 1988]. Однако эффективность такого процесса была довольно невелика и составила около $0,5-4,2 \times 10^{-4}$. Спустя некоторое время выяснилось, что для того чтобы рекомбинация была более эффективной - требуется внесение в целевой участок ДНК двучепочечных разрывов, по крайней мере на два порядка повышающих успешность процесса [Puchta et al., 1993; 1996]. Для достижения данной цели на том этапе подошли так называемые мегануклеазы (homing endonucleases), узнающие довольно протяженные участки ДНК длиной от 12 до 45 нуклеотидов, но расщепляющие тотальную ДНК ввиду не самой строгой специфичности этих ферментов почаше, «узнавая» фактически по 10-12 пар нуклеотидов. Причем оказалось, что благодаря возникающему двучепочечному разрыву в это место генома относительно легко за счет рекомбинации можно вставлять и новый участок ДНК [Salomon, Puchta, 1998]. В литературе встречаются обзорные статьи, рассматривающие механизмы возникновения двучепочечных разрывов в ДНК и их репарации [Hendel et al., 2015; Jasin et al., 2016; Steinert et al., 2016; Pacher, Puchta, 2017]. После обнаружения того факта, что двучепочечные разрывы крайне необходимы для улучшения процесса рекомбинации и геномного редактирования остро встал вопрос как их получать в целенаправленном месте.

На помощь пришли эти самые мегануклеазы, у которых однако потребовалось несколько менять специфичность узнавания последовательностей ДНК и работ в этом направлении было выполнено немало [Epinat et al., 2003; Rosen et al., 2006; Smith et al., 2006; Arnould et al., 2011]. Применительно к растениям можно указать на ряд работ. Так, используя специально созданные генно-инженерные конструкции с ответственным за устойчивость к фосфинотрицину геном *bar*, лишенным промотора, с помощью мегануклеазы *I-CeuI* данный ген был помещен точно в заранее подготовленное нужное место генома под контролем 35S промотора, что обеспечило полученному растению кукурузы

устойчивость к данному гербициду [D'Halluin et al., 2008]. Позже этой же группой авторов с помощью несколько видоизмененной мегануклеазы *I-CreI* была проведена встройка в точное место генома хлопчатника двух генов *hppd* и *epsps*, ответственных за устойчивость к глифосату [D'Halluin et al., 2013]. Другие авторы с использованием мегануклеазы *I-SceI* продемонстрировали в двух случаях из четырех трансформационных событий замену участка генома ячменя, на гомологичный в котором имелся функциональный ген, ответственный за устойчивость к гигромицину под контролем соответствующего промотора [Watanabe et al., 2016].

Редактирование геномов с помощью ZF нуклеаз

Как уже отмечалось выше, именно наличие двучепочечных разрывов в молекуле ДНК заметно повышают эффективность рекомбинационных событий в целевом месте и поэтому такие разрывы нужно создавать, причем с высокой специфичностью. Для этого было предложено использовать химерную нуклеазу, сконструированную на основе рестрикционной эндонуклеазы типа *IIS FokI*, характеризующейся расщеплением цепей ДНК на некотором расстоянии от сайта узнавания [Sugisaki, Kanazawa, 1981], благодаря тому, что данный фермент имеет различные домены, отвечающие за узнавание и расщепление [Li et al., 1992], что позволило сделать из него фактически универсальную рестрикционную эндонуклеазу, просто меняя первый домен [Podhajska, Szybalski, 1985]. Используя в качестве узнающего домена так называемые «цинковые пальцы», характерные для большинства транскрипционных факторов [Berg, 1988], и объединив их с каталитическим доменом рестриктазы *FokI* был создан новый тип ферментов с уникальными специфичностями узнавания определенных нуклеотидных последовательностей [Kim et al., 1996], превратив их фактически в ZF нуклеазу (Zinc Finger Nuclease - ZFN). Чуть позже было выяснено, что для проявления каталитической активности дикий фермент *FokI* должен димеризоваться [Bitinaite et al., 1998] и такое же условие распространяется на ZF нуклеазы, что автоматически на многие порядки повышает специфичность взаимодействия этих химерных нуклеаз с молекулами ДНК, поскольку фактически приводит к удвоению длины узнаваемой последовательности. Соответственно для образования двучепочечных разрывов при редактировании ДНК необходимо чтобы два таких фермента узнавали и расщепляли ДНК в непосредственной близости друг от друга. Разделяющая их спейсерная последовательность обычно составляет от 5 до 7 нуклеотидов [Smith et al., 2000; Mani et al., 2005].

Наиболее подходящими для использования в геномном редактировании оказались цинковые пальцы семейства Cys_2His_2 , получившие такое обозначение благодаря наличию четырех аминокислотных остатков в виде цистеинов и гистидинов, как известно имеющих сродство к металлам и в таких белках координирующих атом цинка [Durai et al., 2005]. При этом индивидуальный цинковый палец состоит из приблизительно 30 аминокислот, организованных в виде двух β -складок и одной α -спирали, несколько аминокислот на поверхности которой взаимодействуют с триплетом нуклеотидов в большой бороздке ДНК [Pavletich et al., 1991]. Однако природные цинковые пальцы имеют сродство к определенным нуклеотидным последовательностям в виде мотивов GNN, что несколько сужает их применение и поэтому генно-инженерным путем были созданы иные варианты цинковых пальцев, покрывающие практически все возможные 64 триплета – GNN, ANN, CNN и TNN [Segal et al., 1999; Liu et al., 2002; Dreier et al., 2001; 2005; Jamieson et al., 2003]. Для конструирования новых ZF нуклеаз используют различные подходы [Hurt et al., 2003; Segal et al., 2003; Maeder et al., 2008; Fujii et al., 2013]. Типичные белки с цинковыми пальцами содержат по три домена цинковых пальцев, каждый из которых, как уже говорилось выше, узнает по триплету азотистых оснований. Однако в литературе есть сообщения, что генно-инженерным путем увеличили число таких доменов до шести, благодаря чему такой белок способен распознавать последовательность ДНК уже из 18 нуклеотидов [Liu et al., 1997]. Наиболее трудоемким этапом в ZFN редактировании геномов является конструирование цинковых пальцев, специфичных к нуклеотидной последовательности, которую намечено редактировать. Было продемонстрировано, что при ZFN редактировании геномов возможно не только репарация двуцепочечных разрывов, но и внедрение донорной ДНК за счет гомологичной рекомбинации [Bibikova et al., 2003], а также использование для той же цели вместо донорной ДНК одноцепочечных олигонуклеотидов [Chen et al., 2011].

Впервые ZFN редактирование генома растений было продемонстрировано на арабидопсисе, в который была внедрена соответствующая конструкция и в месте образования двуцепочечного разрыва обнаружилось делеции разной протяженности (78% случаев), инсерции (13%) и в 9% случаев имели место инделы, в виде одновременно как делеций, так и инсерций, причем было показано, что для 10% растений возникшие мутации передавались потомству [Lloyd et al., 2005]. В тот же год было сообщено о восстановлении предварительно специально

испорченного *gus* гена в растениях табака за счет гомологичной рекомбинации по местам двуцепочечных разрывов ДНК, вызванных ZF нуклеазой [Wright et al., 2005]. Для повышения эффективности геномного ZFN редактирования была создана специальная серия бинарных векторов, несущих ZFN конструкции для трансформации различных растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens* [Tovkach et al., 2009]. Предложен также альтернативный способ доставки ZFN конструкций в растения табака и петунии, исключающий возникновение трансгенных растений [Marton et al., 2010]. Используя ZFN технологию с частотой трансформации, достигшей 2%, были созданы растения табака, в которых в места двуцепочечных разрывов в гене ацетолактатсинтазы встраивались различные донорные ДНК, несущие конструкции, обеспечивающие устойчивость к ряду гербицидов [Townsend et al., 2009]. При трансформации суспензионной культуры клеток табака конструкциями, несущими ZFN и донорные фрагменты ДНК, рассчитанные на восстановление работы белка GFP и гена *pat*, ответственного за устойчивость к фосфинотрицину, при интеграции в ген эндохитиназы эффективность этих процессов достигла 10% [Cai et al., 2009]. До некоторой степени схожие работы были выполнены в то же время на кукурузе [Shukla et al., 2009] и арабидопсисе [de Pater et al., 2009], причем трансформация последнего проводилась методом Floral dip. Несколько позже с использованием ZFN технологии был проведен одновременный мутагенез сразу 9 генов сои [Curtin et al., 2011], при этом было отмечено, что для идентификации сайтов, пригодных для редактирования с помощью ZFN использовалась специальная компьютерная программа [Reyon et al., 2011]. Недавно проведено направленное ZFN редактирование гена, кодирующего субъединицу одного из ядерных факторов, у томата [Hilioti et al., 2016]. Также относительно недавно успешное применение ZFN технологии редактирования геномов продемонстрировано для древесных растений – яблони и инжира [Peer et al., 2014].

В литературе можно встретить обзоры, специально посвященные геномному редактированию растений с помощью ZFN технологии [Kumar et al., 2006; Kim, Kim, 2011; Petolino, 2015]. Также имеются весьма подробные протоколы выполнения экспериментов по ZFN редактированию геномов, включая конструирование наборов цинковых пальцев [Wright et al., 2006; Maeder et al., 2009], а также предупреждения о неожиданно высоком уровне ошибок, допускаемых ZFN технологией [Ramirez et al., 2008].

Для более производительного геномного редактирования с помощью ZF нуклеаз осенью 2005 г. был создан специальный Консорциум - The Zinc Finger Consortium (<http://www.zincfingers.org>), где содержится различная полезная информация, а также ссылки на работающую on-line специализированную компьютерную программу **ZiFiT** [Sander et al., 2007; 2010], рассчитанную на дизайн цинковых пальцев и расположенную на сайте партнеров по адресу - <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>. Были подготовлены и другие web-ресурсы, облегчающие ZFN геномное редактирование [Mandel, Barbas III, 2006; Cradick et al., 2011], включая программу поиска нецелевых сайтов редактирования **PROGNOS ZFN v2.0** (<http://bao.rice.edu/cgi-bin/prognos/prognos.cgi>) [Fine et al., 2013]. Сформированы также базы данных **ZiFDB**, **ZifBase** и **EENdb**, где представлены сведения о различных ZF нуклеазах со специально сконструированными эрреями из цинковых пальцев [Fu et al., 2009; Jayakanthan et al., 2009; Xiao et al., 2012]. Был также создан специальный web-ресурс **ZFNGenome**, содержащий информацию о целевых сайтах для ZFN редактирования в геномах модельных организмов [Reyon et al., 2011].

Редактирование геномов с помощью TALE нуклеаз

Следующим инструментом для редактирования геномов после ZF нуклеаз стала TALEN технология (Transcription Activator Like Effector Nucleases - TALEN). Причем практически сразу после своего появления она в 2011 г. журналом *Nature Methods* была названа методом года, что объяснялось большей простотой и в целом лучшей эффективностью внесения целевых мутаций в геномы различных организмов. TALEN технология основана на использовании TALE нуклеазы, сконструированной по аналогии с ZF нуклеазой путем присоединения к TALE белкам, узнающим определенные последовательности нуклеотидов, каталитического домена рестрикционной эндонуклеазы *FokI* [Miller et al., 2011]. Но этому сначала предшествовало обнаружение таких белков в геноме фитопатогенной бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [Bonas et al., 1989; White, 2016] и другие исследования. Так, в гене *avrBs3* этой бактерии были обнаружены прямые повторы длиной 102 нуклеотида с очень высокой (91-100%) гомологией. Оказалось, что природный белок, кодируемый данным геном, состоит из нескольких доменов, главным из которых можно считать тот, что является ответственным за связывание с ДНК, имитируя эукариотические транскрипционные факторы [Kau et al., 2007]. Причем выяснилось, что за это отвечают как раз обнаруженные прямые повторы, кодирующие повторяющиеся пептиды из 34

аминокислот, отличающиеся между собой аминокислотами в 12 и 13 положениях, что позволило назвать их RVD (Repeat-Variable-Diresidue) и установить некий код узнавания парой таких аминокислот в составе повторяющихся пептидов данного белка конкретных нуклеотидов [Moscou, Bogdanove, 2009]. Этот код оказался вырожденным, но для некоторых сочетаний аминокислот имеется явно выраженное предпочтение [Boch et al., 2009], что позволило конструировать рекомбинантные белки, способные распознавать конкретные последовательности ДНК по принципу один повторяющийся мономер – один нуклеотид [Morbitzer et al., 2010].

Несколько упрощенно, но можно сказать, что обычно сейчас принято использовать пары аминокислот AsnIle для распознавания аденина; цитозина – HisAsp; гуанина – AsnAsn и тимина – AsnGly, хотя на самом деле все гораздо сложнее [Richter et al., 2016]. В итоге после объединения в химерном белке домена, узнающего последовательности ДНК, и каталитического домена рестриктазы *FokI* образовалась TALE нуклеаза, пригодная для геномного редактирования [Mak et al., 2012; Mussolino, Cathomen, 2012; Chen, Gao, 2013]. Причем количество узнаваемых нуклеотидов обычно достигает 18-20, что вполне обеспечивает уникальность выбранной последовательности, хотя как и для ZF нуклеаз могут производиться мутации в так называемых off-target сайтах, что отчасти можно исключить с помощью соответствующего биоинформатического анализа и компьютерных программ, о которых будет говориться чуть ниже.

В недавнем обзоре американских авторов [Malzahn et al., 2017] отмечается, что по состоянию на весну 2017 г. с помощью TALEN технологии произведено редактирование геномов 12 видов в основном сельскохозяйственных (пшеница, рис, кукуруза, ячмень, табак, картофель, соя, сахарный тростник, томат), а также ряда модельных (арабидопсис, табак Бенджамина, злак *Brachypodium*) растений, в которых редакции (преимущественно нокаутированию) подверглись свыше 50 генов. Так, например, TALEN редактирование генома сахарного тростника было предпринято с целью снизить содержание лигнина для увеличения выхода биоэтанола [Jung, Alpeteg, 2016]. Для того чтобы исключить подслащивание картофеля при его хранении на холоде с помощью TALEN технологии был нокаутирован ген вакуолярной инвертазы, а изготовленные из таких клубней чипсы имели сниженное содержание акриламида [Clasen et al., 2016]. В геноме гексаплоидной мягкой пшеницы удалось с помощью TALEN, а также CRISPR/Cas9 технологий нокаутировать все шесть аллелей генов

семейства *Mlo* (*Mildew resistant locus*) во всех трех субгеномах, чтобы растения стали невосприимчивы к такому опасному заболеванию как мучнистая роса [Wang et al., 2014]. Внесение мутаций в гены десатураз улучшило качество растительного масла у сои [Haun et al., 2014]. Нокаутирование гена бетаин альдегид дегидрогеназы в геноме риса привело к накоплению 2-ацетил-1-пирролина, являющегося основным компонентом, придающим приятный аромат и этот признак был передан поколениям T1 и T2 [Shan et al., 2015]. Также наследуемые мутации в гене *glossy2* кукурузы получены с помощью TALE нуклеазы [Char et al., 2015]. В одной из работ по направленному внесению мутаций в ген *OSEPSPS* риса вместе с TALE нуклеазой в качестве донорной молекулы использовались химерные РНК-ДНК олигонуклеотиды, но особого успеха это не принесло [Wang et al., 2015]. Ранее сообщалось, что для пяти генов арабидопсиса подобрано семь мишеней для их редактирования, которое удалось осуществить с частотой от 2 до 15% [Christian et al., 2013]. Также в 2013 г. была опубликована статья, в которой описывались произведенные мутации в гене ацетоллактатсинтазы в 30% трансформированных клетках табака [Zhang et al., 2013]. И эти последние упомянутые здесь публикации вместе с работами по редактированию риса [Li et al., 2012] и арабидопсиса [Cermak et al., 2011] оказались среди первых, где на растениях стала применяться TALEN технология.

Был проведен анализ мутационных событий, происходящих при геномном редактировании с помощью ZFN и TALEN технологий, на примере почти полутора тысяч мутаций у различных организмов, включая растения, по 43 независимым исследованиям [Kim et al., 2013]. Было обнаружено, что при использовании ZFN продуцировались инсерции и делеции с почти одинаковой частотой, тогда как при TALEN технологии гораздо чаще возникали делеции, чем инсерции (89% против 1,6%), что авторы связали с большей длиной спейсеров для TALEN – 12-21 пар нуклеотидов, обеспечивающих более протяженные выступающие концы фрагментов ДНК после возникновения двуцепочечных разрывов, чем таковые при ZFN, где обычно спейсеры составляют 5-6 пар нуклеотидов.

Чтобы несколько упростить работу по изготовлению различных генно-инженерных конструкций, несущих различные TAL мотивы, было предложено использовать высокоэффективную систему изготовления векторов Gateway, в том числе Platinum Gate TALEN kit [Kusano et al., 2016]. Для большей эффективности геномного редактирования с помощью TALEN технологии был написан ряд компьютерных программ, рассчитанных на поиск мест редактирования, дизайн генно-инженерных

конструкций, выявление нецелевых или off-target сайтов. Среди них - web ресурсы **ZiFiT v.4.2** (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>) [Sander et al., 2007; 2010], **TALE-NT** (<https://tale-nt.cac.cornell.edu>) [Doyle et al., 2012], **Mojo Hand** (<http://www.talendesign.org>) [Neff et al., 2013], **PROGNOS TALEN v2.0** (<http://bao.rice.edu/cgi-bin/prognos/prognos.cgi>) [Fine et al., 2013], **E-TALEN** (<http://www.e-talen.org/E-TALEN/>) [Heigwer et al., 2013], **Storyteller, TALVEZ** (<http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/cgi-bin2/talvez/talvez.cgi>) [Perez-Quintero et al., 2013], **TALENoffer** (http://galaxy.informatik.uni-halle.de/root?tool_id=TALENoffer) [Grau et al., 2013], **The TAL Plasmids Sequence Assembly Tool** (<http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/assembleTALSequences.html>), **TALgetter** (http://galaxy.informatik.uni-halle.de/root?tool_id=TALgetter) с вариантом для крупномасштабных проектов **TALgetterLong** (http://galaxy.informatik.uni-halle.de/root?tool_id=TALgetterLong) [Grau et al., 2013a], **SAPTA** (Scoring Algorithm for Predicting TALE(N) Activity) (http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/TAL_targeter.html) [Lin et al., 2014], **CHOPCHOP** (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>) [Montague et al., 2014], **CHOPCHOP v2** (<http://chopchop.cbu.uib.no>) [Labun et al., 2016], **TALENdesigner** (<http://talendesign.de>), база данных **EENdb**, где представлены сведения о различных TALE нуклеазах [Xiao et al., 2012], а также требующие установки на компьютер пользователя **AnnoTALE** (<http://www.jstacs.de/index.php/AnnoTALE>) [Grau et al., 2016], **TALEN Targeter**, **TAL Effector Targeter**, **Target Finder**, **Paired Target Finder**, **TALEN Targeter Off-Target Counter** (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/software>). Хотя число компьютерных программ и баз данных для TALEN геномного редактирования заметно превышает таковое для ZF нуклеаз, оно значительно уступает многочисленным программам и базам данных, подготовленных для CRISPR/Cas редактирования геномов [Bogdanove, Boohar, 2016; Periwal, 2017], рассмотренных в другой нашей статье в этом выпуске журнала [Чемерис и др., 2017].

Редактирование геномов с помощью CRISPR/Cas технологии

Чтобы не повторять в этом разделе данной статьи материалы других публикаций тематического номера [Баймиев и др., 2017; Кулуев и др., 2017a; Чемерис и др., 2017], описывающих использование CRISPR/Cas систем для редактирования геномов, их развитие, совершенствование и не дублировать цитированные в них статьи, ограничимся лишь констатацией факта, что в настоящее время CRISPR/Cas технология редактирования геномов стала главенствующей ввиду ее заметного превосходства над остальными. Вполне оправданным представляется в 2015 г. выбор CRISPR/Cas9

технологии «Прорывом года» [Travis, 2015], причем ранее в 2013 г. она была названа среди десяти прорывов года по версии журнала Science, где ей тогда было отведено второе место [Coontz, 2013]. Неким подтверждением роста популярности CRISPR/Cas технологии в мире может служить статистика запросов разных плазмидных векторов из репозитория Addgene, приведенная в презентации исполнительного директора репозитория Addgene Joanne Kamens «Addgene - A Unique Nonprofit Helping Accelerate Science», где даются сведения по выполненным запросам плазмид для технологий ZFN, TALEN и CRISPR по состоянию на 26 мая 2016 г., из которых отчетливо видны тенденции использования таких векторов. Так, начиная с 2007 г. ежегодно шла небольшая рассылка ZFN плазмид, достигшая максимума приблизительно в 700⁹ плазмид в 2011 г., после чего наметился заметный спад и их распространение сошло практически на нет. Причиной тому послужило появление сначала TALEN технологии, повлекшей за собой рассылку соответствующих векторов с 2010 г. с максимумом около 3000 разосланных плазмид в 2013 г., и снижением до приблизительно 150 таких векторных молекул за 5 месяцев 2016 г., а затем и CRISPR/Cas технологии из-за появления которой с 2012 г. начался очень резкий подъем спроса на вектора для нее, приведший к рассылке по миру около 23 тысяч таких плазмид в 2015 г. и по крайней мере 12 тысяч к концу мая 2016 г. В этой же презентации сообщается, что из всех разосланных для CRISPR/Cas технологии плазмид общим числом свыше 60 тысяч почти половина (48%) приходится на долю США, далее следует Япония (9%), Китай (7%), Германия (6%) Великобритания (5%), Канада (3%), Франция, Южная Корея, Швейцария (по 2%), Австралия (1%), Дания (0,5%) и весь остальной мир (без расшифровок) запросил 14% всех плазмид. При этом покупатели в репозитории Addgene CRISPR/Cas плазмид работают в более чем 80 странах.

К сожалению, более свежими сведениями мы не располагаем, но вполне возможно, что в 2017 г. число таких запросов превысит и 30 тысяч, в чем тоже есть наш скромный вклад в виде четырех приобретенных плазмид для CRISPR/Cas геномного редактирования. При этом в настоящее время (на конец сентября 2017 г.) если задать поиск по сайту <http://www.addgene.org> со словами «ZFN» «TALEN» «CRISPR», то поисковая система сообщает, что в данном репозитории хранится соответственно 31, 1264 и 5401 таких плазмид. В одной из публикаций [Soriano-Carot] сообщается, что в целом в репозитории Addgene хранится свыше 50

тысяч плазмид (видимо по состоянию на начало 2017 г.), и рассылают они сейчас ежемесячно свыше 11 тысяч плазмид, а всего за период с 2004 г. таковых уже по миру разослано свыше 750 тысяч.

Одними из главных преимуществ CRISPR/Cas технологии редактирования геномов служат ее относительная простота и быстрота подготовительных процедур. Что касается точности вносимых в геном изменений, то за счет различных усовершенствований данной технологии, в том числе использование никаз, она достаточно высока и, вне всякого сомнения, будет и дальше повышаться. Несмотря на то, что в другой нашей статье этого номера [Кулуев и др., 2017] уже описывалось создание каталитически неактивной Cas9 нуклеазы, получившей обозначение dCas9 (d – от слова dead или deactivated), вспомним здесь о ней еще раз только потому, что было показано, что если такую измененную нуклеазу сшить с частью эндонуклеазы *FokI*, то при использовании двух таких ферментных комплексов с соответствующими гидовыми РНК, образуется димер *FokI*, который будет способен проявлять каталитическую активность [Guilinger et al., 2014; Tsai et al., 2014; Aouida et al., 2015; Wyvekens et al., 2015; Havlicek et al., 2017]. Так, что не только упоминаемые в этой статье ZF и TALE нуклеазы, но и Cas нуклеазы (например, fdCas9) для проявления ферментативной активности могут нести в качестве каталитического домена таковой от *FokI* нуклеазы.

CRISPR/Cas редактированные растения (тем более при их получении без использования чужеродной ДНК) теоретически способны стать альтернативой привычным трансгенным растениям и оказаться среди повсеместно возделываемых сельскохозяйственных культур [Wolter, Puchta, 2017]. Тем не менее, при этом уже слышны голоса несогласных и с такими растениями, указывающие, что при CRISPR/Cas редактировании могут происходить мутации и в нецелевых местах генома, а это крайне опасно. Причем потенциальные противники редактированных растений почему-то не хотят принимать во внимание, что при радиационном или химическом мутагенезе¹⁰ в геномах растений возникает настоящий сонм подобных мутаций, примеры чего были приведены нами в другой статье [Баймиев и др., 2017]. Однако хочется верить, что здравый смысл все же восторжествует и такие боязни останутся в прошлом, поскольку как показывает выращивание и использование в пищу тех же самых трансгенных или ГМ-растений уже на протяжении двух десятилетий не имеется ни одного достоверного подтверждения нанесенного этими ГМО хоть какого-нибудь вреда здоровью человека, да и экологии. Но

⁹ Насколько можно судить из представленного в презентации графика.

¹⁰ Против которых мы лично, что называется, ничего не имеем и даже сами используем в своих исследованиях.

если пытаться говорить об отдаленных последствиях, могущих проявиться у наших потомков и о которых пока мы не можем судить, то тогда нужно вспомнить мобильную связь, которая также иногда подвергается нападкам из-за ее потенциального вреда для человека, что нашло отражение в ряде обзорных статей [Belayev et al., 2016; Elmas, 2016; Zhang et al., 2017] и даже если это и так, отказываться от такой связи человечество никак не намерено. Раз уж речь зашла об электромагнитном излучении, производимом мобильными телефонами, то стоит упомянуть недавнюю статью австралийского автора M.N.Halgamuge [2017], в которой были проанализированы 45 публикаций из рецензируемых журналов за период с 1996 по 2016 гг., описывающих 169 экспериментов по выяснению влияния мобильных телефонов на 29 видов растений в виде изменения у них физиологических и морфологических показателей. Утверждается, что кукуруза, гибискус, горох, пажитник, ряска, томат, лук и маш оказались очень чувствительными к такому излучению.

Редактирование геномов с помощью искусственных молекулярных «ножниц» ARCUT

Собственно название данного раздела не вполне отражает реальную ситуацию вокруг нынешних возможностей применения искусственных молекулярных ножниц ARCUT (*artificial restriction DNA cutter*), представляющих собой комплекс из двух модифицированных олигонуклеотидов в виде их пептидно-нуклеиновых аналогов (содержащих еще и некоторые другие неприродные азотистые основания) и четырехвалентного церию с ЭДТА, поскольку серьезных успехов по направленному мутагенезу этим методом еще нет. Тем, не менее, в своих обзорных статьях авторы данного подхода сравнивают ARCUT с ZFN геномным редактированием, а также использованием для этой цели мегануклеаз [Katada, Komiyama, 2009] и поэтому оставить здесь совсем без внимания эту пока не технологию было бы неправильно.

Начало этим работам было положено в начале 1990-х гг., когда группа японских авторов обнаружила, что ДНК может «разрезаться» редкоземельными металлами, в частности церием [Matsumoto, Komiyama, 1992; Komiyama et al., 1994]. Собственно о том, что в молекулах ДНК происходят разрывы фосфодиэфирных связей под действием металлов было известно и до них. Так, ранее было показано, что при формировании триплексных структур ДНК/олигонуклеотид нити ДНК рвет двухвалентное железо в присутствии ЭДТА [Moser, Dervan, 1987] или комплекс меди с 1,10-фенантролином [François et al., 1988].

После целой серии работ японских авторов по улучшению разрезания молекул ДНК в целевых

местах [Yamamoto et al., 2000; Kitamura, Komiyama, 2002; Arishima et al., 2003; Chen et al., 2004 и др.] было установлено, что наиболее успешно данный процесс идет при использовании пептидно-нуклеиновой кислоты, инвазия которой в цепи ДНК происходит весьма эффективно [Yamamoto et al., 2004]. Другой особенностью пары таких олигонуклеотидов было присутствие в определенных местах диаминопурина и тиюрацила, неспособных образовывать комплементарные пары между собой, но при этом спаривающиеся с природными тиминном и аденином соответственно, что делало данные олигонуклеотиды псевдокомплементарными друг другу и внедряющимися в цепи ДНК таким образом, что возникало некое «вздутие», в котором на комплементарных цепях отожджены два таких модифицированных олигонуклеотида и их фланкируют короткие одноцепочечные участки геномной ДНК, в которых под действием церию и происходят разрывы фосфодиэфирных связей, что в итоге из-за близкого расположения таких мест приводит к двуцепочечному разрыву ДНК. Здесь можно заметить, что такие модифицированные олигонуклеотиды, используемые для рекомбинации ДНК, принципиально отличаются от упоминаемых выше химерных ДНК-РНК олигонуклеотидов, поскольку рассчитаны именно на внесение двуцепочечных разрывов в молекулы ДНК, заметно повышающих вероятность рекомбинационных событий.

Помимо того, что данный метод был успешно применен для разрезания различных молекул ДНК *in vitro* [Aiba et al., 2005; 2006; Yamamoto et al., 2006; 2007] также были осуществлены эксперименты, которые с определенной натяжкой можно считать проведенными *in vivo*, что авторы вывели даже в заголовок одной из своих статей [Komiyama, 2014], но, строго говоря, это скорее можно считать примером успешной рекомбинации ДНК, начавшейся *in vitro*, продолжившейся и доказавшей *in vivo* свою функциональность. Так, на культуре клеток человека было продемонстрировано, что если ген голубого флуоресцентного белка, находящегося в составе плазмидного вектора, расщепить в нужном месте искусственными ножницами ARCUT и в присутствии донорной ДНК, которой служил фрагмент (без промотора) аналогичного гена зеленого флуоресцентного белка (отличающегося несколькими аминокислотами в хромофорной части), ввести в культивируемые клетки, то рекомбинация этих генов за счет ферментных репарационных систем хозяина происходит с высокой частотой и клетки начинают светиться зеленым, а не голубым светом, тогда как в контроле подобное наблюдалось в гораздо меньшей степени [Katada et al., 2009]. Также было показано

специфичное расщепление с помощью ARCUT в тотальной ДНК гена *fmr1*, расположенного на X хромосоме человека, что было затем подтверждено блот-гибридизацией по Саузерну [Ito et al., 2009]. В последующих статьях этих авторов достаточно подробно разбираются механизмы произведенной рекомбинации [Katada, Komiyama, 2011; Komiyama, 2014; Shigi et al., 2017].

Однако новых организмов с таким образом отредактированными геномами пока не получено и возможно стоит обратить внимание как раз на растительные объекты, которые, благодаря тотипотентности, способны регенерироваться из единичных клеток, в которые, впрочем, нужно сначала еще доставить соответствующий комплекс ARCUT, да и растительные клетки должны выдержать присутствие такого металла как церий, который может оказаться для них токсичным.

Заключение

Несмотря на то, что индуцированный радиационный¹¹ и химический¹² мутагенез предложены уже весьма давно, они до сих пор востребованы и используются для создания новых сортов культурных растений. Точно также индуцированная полиплоидизация, разработанная приблизительно в то же время, находит аналогичное применение. Причем, приведя в качестве примера удачного получения тетраплоидной формы одуванчика кок-сагыза, нам фактически пришлось провести настоящее расследование складывавшихся вокруг этого растения обстоятельств. Что касается направленного геномного редактирования, то в настоящее время «ножницы» ARCUT практически не используются (хотя определенные перспективы имеют), химерные РНК-ДНК олигонуклеотиды, мегануклеазы, ZFN и TALEN технологии используются сравнительно редко, поскольку их отодвинула на второй план передовая CRISPR/Cas технология¹³, оказавшаяся весьма удобной и производительной.

Для получения дальнейшей информации по ZFN, TALEN и CRISPR/Cas технологиям редактирования геномов можно обратиться ко множеству обзорных статей, где в том числе проводится сравнение возможностей этих методов [Немудрый и др., 2014; Чугунова и др., 2016; Gaj et al., 2013; Pauwels et al., 2013; Osakabe Y., Osakabe K., 2015; Samanta et al., 2016; Kamburova et al., 2017; Pacher, Puchta, 2017 и др.].

¹¹ Отмеченный Нобелевской премией

¹² Бывший весьма близко к тому, чтобы и за него вручили Нобелевскую премию

¹³ Просто обязанная получить Нобелевскую премию

Литература

1. Баймиев Ан.Х., Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Михайлова Е.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов (растений) и общество // Биомика. 2017. Т.9. С.183-202.
2. Баутин В.М., Глазко В.И. Сессия ВАСХНИЛ, август 1948 г. Уроки на будущее // Известия ТСХА. 2008. Вып. 3. С.149-175.
3. Белько Н.Б., Гордей И.С., Гордей И.А., Урбан Э.И. Дупликация генома озимой ржи (*Secale cereale* L.) с использованием закиси азота (N₂O) // Молекулярная и прикладная генетика. 2013. Т.15. С. 64-74.
4. Гаршин М.В., Картуха А.И., Кулуев Б.Р. «Кок-сагыз: особенности культивирования, перспективы возделывания и внедрения в современное производство» // Биомика. 2016. Том 8. С. 323-333.
5. Зубов В.В. Секвенирование по Ротбергу (потенциал полупроводникового секвенирования) // Биомика. 2013. Т.5. С.48-61.
6. Карпеченко Г.Д. Тетраплоидные шестирядные ячменя, полученные обработкой колхицином // Докл. АН СССР. 1940. Т. 27. С. 48-51.
7. Кулуев Б.Р., Гарафутдинов Р.Р., Максимов И.В., Сагитов А.М., Чемерис Д.А., Князев А.В., Вершинина З.Р., Баймиев Ан.Х., Мулдашев А.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Натуральный каучук, его источники и составные части» // Биомика. 2015. Т.7. С. 224-283.
8. Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. ««Косматые» корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей» // Биомика. 2015а. Т.7. С.70-120.
9. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Чемерис А.В. «Гидропонное и аэропонное выращивание одуванчика *Taraxacum kok-saghyz* Rodin» // Биомика. 2017. Т.9. С. 96–100.
10. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017а. Т.9. С.155-182.
11. Курсанова Т.А. Основоположник отечественной микробиологии. К 150-летию со дня рождения академика Г.А. Надсона // Вестник Российской академии наук. 2017. Т.87. С.663-669.

12. Миронин С.С. Лысенко был прав! / http://biblioteka-dzvон.narod.ru/docs/Mironin_About_Lysenko.pdf
13. Митрофанов В.Г. (ред.) Иосиф Абрамович Рапопорт - ученый, воин, гражданин. Очерки, воспоминания, материалы. М.: Наука. 2001. 305 С.
14. Навашин М.С., Герасимова Е.Н. Введение колхицина через корни с целью получения полиплоидных растений // ДАН СССР. 1940. Т.26. С.689-692.
15. Навашин М.С., Герасимова Е.Н. Получение тетраплоидного кок-сагыза и его практическое значение // ДАН СССР. 1941. Т.31. С.47-50.
16. Навашин М.С., Герасимова Е.Н., Чередниченко А.Ф. Тетраплоидный кок-сагыз как повышенно-продуктивный сорт // ДАН СССР. 1945. Т.47. С.450-453.
17. Навашин М.С., Герасимова-Навашина Е.Н. О тетраплоидии и тетраплоидном кок-сагызе // Агробиология. 1951. №6. С.102-109.
18. Навашин С. О диморфизме ядер в соматических клетках у *Galtonia candicans* // Изв. Имп. Акад. Наук. Сер. VI. - 1912. - №4. - С.373-385.
19. Навашин С. Гетеро- и идиохромозомы растительного ядра, как причина ядерного диморфизма некоторых видов растений, и значение ядерного диморфизма в процессе видообразования // Изв. Имп. Акад. Наук. Сер. VI. 1915. №17. С.1821-1834.
20. Надсон Г.А. О действии радия на дрожжевые грибки в связи с общей проблемой влияния радия на живое вещество // Вестник рентгенологии и радиологии. 1920. № 1-2. С. 45-137. (цит. по Курсанова Т.А. Основоположник отечественной микробиологии. К 150-летию со дня рождения академика Г.А.Надсона // Вестник Российской академии наук. 2017. Т.87. С.663-669.)
21. Надсон Г.А., Филиппов Г.С. О влиянии рентгеновых лучей на половой процесс и образование мутантов у низших грибов (*Micoraceae*) // Вестник рентгенологии и радиологии. 1925. № 6. С. 305-310. (цит. по Курсанова Т.А. Основоположник отечественной микробиологии. К 150-летию со дня рождения академика Г.А.Надсона // Вестник Российской академии наук. 2017. Т.87. С.663-669.)
22. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // Acta Naturae. 2014. Т. 6. С. 20-42.
23. О положении в биологической науке. Стенографический отчет сессии Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук имени В.И.Ленина. 31 июля - 7 августа 1948 г. М.: ОГИЗ – СЕЛЬХОЗГИЗ. Государственное издательство сельскохозяйственной литературы. 1948. 536 С.
24. Рапопорт И.А. Карбонильные соединения и химический механизм мутаций // Докл. АН СССР. 1946. Т.54. С.65-68.
25. Рапопорт И.А., Зоз Н.Н., Макарова С.И., Сальникова Т.В. (ред.) Супермутагены / М.: Наука. 1966. 272 С.
26. Строева О.Г. Иосиф Абрамович Рапопорт 1912-1990. М.: Наука. 2009. 213 С.
27. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование / М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2014. 232 С.
28. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.203-228.
29. Чугунова А.А., Донцова О.А., Сергиев П.В. Методы изменения геномов: новая эра в молекулярной биологии // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 881-898.
30. Эйгес Н.С. Историческая роль Иосифа Абрамовича Рапопорта в генетике. Продолжение исследований с использованием метода химического мутагенеза // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. С. 162-172.
31. Aiba Y., Mori M., Yamamoto Y., Komiyama M. Rapid site-selective hydrolysis of double-stranded DNA by use of Ce (IV)/EDTA and PNA bearing phosphate group // Nucleic Acids Symposium Series. 2005. V. 49. P. 277-278.
32. Aiba Y., Yamamoto Y., Komiyama M. Highly active artificial restriction enzyme composed of Ce (IV)/EDTA and PNA bearing phosphate group-Relationship between the promotion by phosphate and the structure of invasion complex //Nucleic Acids Symposium Series. 2006. V. 50. P. 255-256.
33. Alexeev V., Igoucheva O., Domashenko A., Cotsarelis G., Yoon K. Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide // Nature biotechnology. 2000. V. 18. P. 43-48.
34. Alexeev V., Yoon K. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide // Nature biotechnology. 1998. V. 16. P. 1343-1346.
35. Aouida M., Eid A., Ali Z., Cradick T., Lee C., Deshmukh H., Atef A., AbuSamra D., Gadhoun S.Z., Merzaban J., Bao G., Mahfouz M. Efficient fdCas9 synthetic endonuclease with improved

- specificity for precise genome engineering // PLoS One. 2015. V. 10 (7). e0133373.
36. Arishima H., Yokoyama M., Komiyama M. Site-selective DNA hydrolysis by the combination of Ce (IV) and oligonucleotide bearing EDTA groups // Nucleic Acids Symposium Series. 2003. V. 3. P. 137-138.
 37. Arnould S., Delenda C., Grizot S., Desseaux C., Paques F., Silva G.H., Smith J. The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy // Protein Engineering, Design & Selection. 2010. V.24. P. 27-31.
 38. Auerbach C., Robson J.M. Production of mutations by allyl isothiocyanate // Nature. 1944. V.154. P.81
 39. Auerbach C., Robson J.M. Chemical production of mutations // Nature. 1946. V.157. P.302.
 40. Bates G.H. Polyploidy induced by colchicine and its economic possibilities // Nature. 1939. V. 144. P.315-316.
 41. Beetham P.R., Kipp P.B., Sawycky X.L., Arntzen C.J., May G.D. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999. V. 96. P. 8774-8778.
 42. Belyaev I., Dean A., Eger H., Hubmann G., Jandrisovits R., Kern M., Kundi M., Moshhammer H., Lercher P., Müller K., Oberfeld G., Ohnsorge P., Pelzmann P., Scheingraber C., Thill R. EUROPAEM EMF Guideline 2016 for the prevention, diagnosis and treatment of EMF-related health problems and illnesses // Rev. Environ. Health. 2016. V.31. P.363-397.
 43. Berg J.M. Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V.85. P.99-102.
 44. Bibikova M., Beumer K., Trautman J.K., Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases // Science. 2003. V. 300. P. 764-764.
 45. Blakeslee A.F., Avery A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine // Journal of Heredity. 1937. V.28. P.393-411.
 46. Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K., Schildkraut I. *FokI* dimerization is required for DNA cleavage // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V.95. P.10570-10575.
 47. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors // Science. 2009. V. 326. P. 1509-1512.
 48. Bogdanove A.J., Booher N.J. Online Tools for TALEN Design // TALENs: Methods and Protocols. 2016. P. 43-47.
 49. Bonas U., Stall R.E., Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* // Molecular and General Genetics MGG. 1989. V. 218. P. 127-136.
 50. Bonde M.T., Klausen M.S., Anderson M.V., Wallin A.I., Wang H.H., Sommer M.O. MODEST: a web-based design tool for oligonucleotide-mediated genome engineering and recombineering // Nucleic Acids Research. 2014. V. 42 (W1). W408-W415.
 51. Booher N.J., Bogdanove A.J. Tools for TAL effector design and target prediction // Methods. 2014. V. 69. P. 121-127.
 52. Bose J.L. Chemical and UV Mutagenesis // The Genetic Manipulation of Staphylococci: Methods and Protocols. 2016. P. 111-115.
 53. Breyer D., Herman P., Brandenburger A., Gheysen G., Remaut E., Soumillion P., Van Doorselaere J., Custers R., Pauwels K., Sneyers M., Reheul D. Commentary: Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? // Environmental Biosafety Research. 2009. V. 8. P. 57-64.
 54. Cai C.Q., Doyon Y., Ainley W.M., Miller J.C., DeKaveler R.C., Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Garrison R., Schulenberg L., Blue R., Worden A., Baker L., Faraji F., Zhang L., Holmes M.C., Rebar E.J., Collingwood T.N., Rubin-Wilson B., Gregory P.D., Urnov F.D., Petolino J.F. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases // Plant Molecular Biology. 2009. V. 69. P. 699-709.
 55. 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. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting // Nucleic Acids Research. 2011. V. 39. e82.
 56. Char S.N., Unger - Wallace E., Frame B., Briggs S.A., Main M., Spalding M. H., Vollbrecht E., Wang K., Yang B. Heritable site - specific mutagenesis using TALENs in maize // Plant Biotechnology Journal. 2015. V. 13. P. 1002-1010.
 57. Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton J., Collingwood T.N., Frodin M., Davis G.D. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases // Nature Methods. 2011. V. 8. P. 753-755.
 58. Chen K., Gao C. TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of

- plants // Journal of Genetics and Genomics. 2013. V.40. P. 271-279.
59. Chen W., Kitamura Y., Zhou J.M., Sumaoka J., Komiyama M. Site-selective DNA hydrolysis by combining Ce (IV)/EDTA with monophosphate-bearing oligonucleotides and enzymatic ligation of the scission fragments // Journal of the American Chemical Society. 2004. V. 126. P. 10285-10291.
 60. Christian M., Qi Y., Zhang Y., Voytas D.F. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases // G3: Genes, Genomes, Genetics. 2013. V. 3. P. 1697-1705.
 61. Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebu R., Davison S., Ray E.E., Daulhac A., Coffman A., Yabandith A., Retterath A., Haun W., Baltes N.J., Mathis L., Voytas D.F., Zhang F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout // Plant biotechnology journal. 2016. V. 14. P. 169-176.
 62. Cole-Strauss A., Yoon K., Xiang Y., Byrne B.C., Rice M.C., Gryn J., Holloman W.K., Kmiec E.B. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide // Science. 1996. V. 273. P. 1386-1388.
 63. Coontz R. Science's top 10 breakthroughs of 2013. (<http://www.sciencemag.org/news/2013/12/sciences-top-10-breakthroughs-2013>).
 64. Cradick T.J., Ambrosini G., Iseli C., Bucher P., McCaffrey A.P. ZFN-site searches genomes for zinc finger nuclease target sites and off-target sites // BMC Bioinformatics. 2011. V.12:152.
 65. Curtin S.J., Zhang F., Sander J.D., Haun W.J., Starker C., Baltes N.J., Reyon D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Coffman A.P., Dobbs D., Joung J.K., Voytas D.F., Stupar R.M. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases // Plant physiology. 2011. V. 156. P. 466-473.
 66. Dhaliwal A.K., Mohan A., Sidhu G., Maqbool R., Gill K.S. An ethylmethane sulfonate mutant resource in pre-Green revolution hexaploid wheat // PLoS One. 2015. V.10(12):e0145227.
 67. D'Halluin K., Vanderstraeten C., Stals E., Cornelissen M., Ruiter R. Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize // Plant Biotechnology J. 2008. V. 6. P. 93-102.
 68. D'Halluin K., Vanderstraeten C., Hulle J., Rosolowska J., Den Brande I., Pennewaert A., D'Hont K., Bossut M., Jantz D., Ruiter R., Broadhvest J. Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double - strand break induction // Plant Biotechnology J. 2013. V. 11. P. 933-941.
 69. De Pater S., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Hooykaas P.J., Van Der Zaal B.J. ZFN - induced mutagenesis and gene - targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium* - mediated floral dip transformation // Plant Biotechnology Journal. 2009. V. 7. P. 821-835.
 70. Dong C., Beetham P., Vincent K., Sharp P. Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system // Plant Cell Reports. 2006. V. 25. P. 457-465.
 71. Doyle E.L., Booher N.J., Standage D.S., Voytas D.F., Brendel V.P., Vandyk J.K., Bogdanove A.J. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction // Nucleic Acids Res. 2012. V.40. (Web Server issue). W117-122.
 72. Dreier B., Beerli R.R., Segal D.J., Flippin J.D., Barbas C.F. 3rd. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors // J. Biol. Chem. 2001. V.276. P.29466-29478.
 73. Dreier B., Fuller R.P., Segal D.J., Lund C.V., Blancafort P., Huber A., Kokschi B., Barbas C.F. 3rd. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-CNN-3' family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors // J. Biol. Chem. 2005. V.280. P.35588-35597.
 74. Du Y., Li W., Yu L., Chen G., Liu Q., Luo S., Shu Q., Zhou L. Mutagenic effects of carbon-ion irradiation on dry *Arabidopsis thaliana* seeds // Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2014. V. 759. P. 28-36.
 75. Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M. H., Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells // Nucleic acids research. 2005. V. 33. P. 5978-5990.
 76. Eigsti O.J. A cytological study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1938. V.24. P.56-63.
 77. Eigsti O.J., Dustin P., Jr. / Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, U.S.A. 1955. 470 P.
 78. Elmas O. Effects of electromagnetic field exposure on the heart: a systematic review // Toxicol. Ind. Health. 2016. V.32. P.76-82.
 79. Epinat J.C., Arnould S., Chames P., Rochaix P., Desfontaines D., Puzin C., Patin A., Zanghellini A., Paques F., Lacroix E. A novel engineered

- meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells // *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31. P. 2952-2962.
80. Fine E.J., Cradick T.J., Zhao C.L., Lin Y., Bao G. An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage // *Nucleic Acids Res*. 2014. V.42(6):e42.
 81. François J.C., Saison-Behmoaras T., Chassignol M., Thuong N.T., Sun J.S., Hélène C. Periodic cleavage of poly(dA) by oligothymidylates covalently linked to the 1,10-phenanthroline-copper complex // *Biochemistry*. 1988. V.27. P.2272-2276.
 82. Fu F., Sander J.D., Maeder M., Thibodeau-Beganny S., Joung J.K., Dobbs D., Miller L., Voytas D.F. Zinc Finger Database (ZiFDB): a repository for information on C2H2 zinc fingers and engineered zinc-finger arrays // *Nucleic Acids Res*. 2009. (Database issue):D279-83.
 83. Fujii W., Kano K., Sugiura K., Naito K. Repeatable construction method for engineered zinc finger nuclease based on overlap extension PCR and TA-cloning // *PloS one*. 2013. V. 8 (3). e59801.
 84. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering // *Trends in Biotechnology*. 2013. V. 31. P. 397-405.
 85. Galindo-Gonzalez L., Pinzon-Latorre D., Bergen E.A., Jensen D.C., Deyholos M.K. Ion Torrent sequencing as a tool for mutation discovery in the flax (*Linum usitatissimum* L.) genome // *Plant Methods*. 2015. V. 11 (19).
 86. Grau J., Boch J., Posch S. TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction // *Bioinformatics*. 2013. V.29. P.2931-2932.
 87. Grau J., Wolf A., Reschke M., Bonas U., Posch S., Boch J. Computational predictions provide insights into the biology of TAL effector target sites. *PLOS Computational Biology*. 2013a. 9(3): e1002962.
 88. Grau J., Reschke M., Erkes A., Streubel J., Morgan R.D., Wilson G.G., Koebnik R., Boch J. AnnoTALE: bioinformatics tools for identification, annotation, and nomenclature of TALEs from *Xanthomonas* genomic sequences // *Sci. Rep*. 2016. V.6:21077.
 89. Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to *FokI* nuclease improves the specificity of genome modification // *Nat. Biotechnol*. 2014. V. 32. P. 577–582.
 90. Halgamuge M.N. Review: Weak radiofrequency radiation exposure from mobile phone radiation on plants // *Electromagn. Biol. Med*. 2017. V.36. P.213-235.
 91. Havlicek S., Shen Y., Alpagu Y., Bruntraeger M.B., Zufir N.B., Phuah Z.Y., Fu Z., Dunn N.R., Stanton L.W. Re-engineered RNA-guided *FokI*-nucleases for improved genome editing in human cells // *Mol. Ther*. 2017. V.25. P.342-355.
 92. Hase Y., Shimono K., Inoue M., Tanaka A., Watanabe H. Biological effects of ion beams in *Nicotiana tabacum* L // *Radiation and Environmental Biophysics*. 1999. V. 38. P. 111-115.
 93. Haun W., Coffman A., Clasen B.M., Demorest Z.L., Lowy A., Ray E., Retteran A., Stoddard T., Juillerat A., Cedrone F., Mathis, L., Voytas D.F., Zhang F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family // *Plant Biotechnology Journal*. 2014. V. 12. P. 934-940.
 94. Heigwer F., Kerr G., Walther N., Glaeser K., Pelz O., Breinig M., Boutros M. E-TALEN: a web tool to design TALENs for genome engineering // *Nucleic Acids Res*. 2013. V.41(20):e190.
 95. Hendel A., Fine E.J., Bao G., Porteus M.H. Quantifying on-and off-target genome editing // *Trends in Biotechnology*. 2015. V. 33. P. 132-140.
 96. Hilioti Z., Ganopoulos I., Ajith S., Bossis I., Tsaftaris A. A novel arrangement of zinc finger nuclease system for in vivo targeted genome engineering: the tomato LEC1-LIKE4 gene case // *Plant Cell Reports*. 2016. V. 35. P. 2241-2255.
 97. Hurt J.A., Thibodeau S.A., Hirsh A.S., Pabo C.O., Joung J.K. Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. V. 100. P. 12271-12276.
 98. Ito K., Katada H., Shigi N., Komiyama M. Site-selective scission of human genome by artificial restriction DNA cutter // *Chemical Communications*. 2009. N. 43. P. 6542-6544.
 99. Jamieson A.C., Miller J.C., Pabo C.O. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins // *Nature Rev. Drug Discov*. 2003. V.2. P.361–368.
 100. Jasin M., Haber J.E. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair // *DNA repair*. 2016. V. 44. C. 6-16.
 101. Javadian N., Karimzadeh G., Sharifi M., Moieni A., Behmanesh M. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (*Linaceae*) // *Planta*. 2017. V.245. P.1165-1178.
 102. Jayakanthan M., Muthukumar J., Chandrasekar S., Chawla K., Punetha A., Sundar D. ZifBASE: a database of zinc finger proteins and associated resources // *BMC Genomics*. 2009. V. 10 (421).
 103. Jung J.H., Altpeter F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall

- composition for production of bioethanol // *Plant Molecular Biology*. 2016. V. 92. P. 131-142.
104. Kamburova V.S., Nikitina E.V., Shermatov S.E., Buriev Z.T., Kumpatla S.P., Emani C., Abdurakhmonov I.Y. Genome Editing in Plants: An Overview of Tools and Applications // *International Journal of Agronomy*. 2017. V. 2017.
 105. Katada H., Chen H.J., Shigi N., Komiyama M. Homologous recombination in human cells using artificial restriction DNA cutter // *Chemical Communications*. 2009. N. 43. P. 6545-6547.
 106. Katada H., Komiyama M. Artificial restriction DNA cutters as new tools for gene manipulation // *ChemBioChem*. 2009. V. 10. P. 1279-1288.
 107. Katada H., Komiyama M. Artificial restriction DNA cutters to promote homologous recombination in human cells // *Current Gene Therapy*. 2011. V. 11. P. 38-45.
 108. Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator // *Science*. 2007. V. 318. P. 648-651.
 109. Kim S., Kim J.S. Targeted genome engineering via zinc finger nucleases // *Plant Biotechnology Reports*. 2011. V. 5. P. 9-17.
 110. Kim Y., Kweon J., Kim J.S. TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures // *Nature Methods*. 2013. V. 10. P. 185-185.
 111. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V.93. P.1156-1160.
 112. Kmiec E.B., Cole A., Holloman W.K. The REC2 gene encodes the homologous pairing protein of *Ustilago maydis* // *Molecular and Cellular Biology*. 1994. V. 14. P. 7163-7172.
 113. Kochevenko A., Willmitzer L. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene // *Plant Physiology*. 2003. V. 132. P. 174-184.
 114. Kodym A., Afza R. Physical and chemical mutagenesis // *Methods Mol. Biol.* 2003. V.236. P.189-204.
 115. Komiyama M., Takeda N., Shiiba T., Takahashi Y., Matsumoto Y., Yashiro M. Rare earth metal ions for DNA hydrolyses and their use to artificial nuclease // *Nucleosides and Nucleotides*. 1994. V.13. P.1297-1309.
 116. Komiyama M. Chemical modifications of artificial restriction DNA cutter (ARCUT) to promote its *in vivo* and *in vitro* applications. // *Artif. DNA, PNA, XNA*. 2014. V.5(3):e1112457.
 117. Kumar S., Allen G.C., Thompson W.F. Gene targeting in plants: fingers on the move // *Trends in Plant Science*. 2006. V. 11. P. 159-161.
 118. Kusano H., Onodera H., Kihira M., Aoki H., Matsuzaki H., Shimada H. A simple Gateway-assisted construction system of TALEN genes for plant genome editing // *Scientific Reports*. 2016. V. 6 (30234).
 119. Labun K., Montague T.G., Gagnon J.A., Thyme S.B., Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. P. W272-W276.
 120. Li F., Wang T., Xu S., Yuan H., Bian P., Wu Y., Wu L., Yu Z. Abscopal mutagenic effect of low-energy-ions in *Arabidopsis thaliana* seeds // *International Journal of Radiation Biology*. 2011. V. 87. P. 984-992.
 121. Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice // *Nature biotechnology*. 2012. V. 30 (5). P. 390-392.
 122. Li L., Wu L.P., Chandrasegaran S. Functional domains in *Fok I* restriction endonuclease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V.89. P.4275-4279.
 123. Li Z., Jiang L., Ma Y., Wei Z., Hong H., Liu Z., Lei J., Liu Y., Guan R., Guo Y., Jin L., Zhang L., Li Y., Ren Y., He W., Liu M., Htwe N.M., Liu L., Guo B., Song J., Tan B., Liu G., Li M., Zhang X., Liu B., Shi X., Han S., Hua S., Zhou F., Yu L., Li Y., Wang S., Wang J., Chang R., Qiu L. Development and utilization of a new chemically-induced soybean library with a high mutation density // *J. Integr. Plant Biol*. 2017. V.59. P.60-74.
 124. Lin Y., Fine E.J., Zheng Z., Antico C.J., Voit R.A., Porteus M.H., Cradick T.J., Bao G. SAPTA: a new design tool for improving TALE nuclease activity // *Nucleic Acids Res*. 2014. V.42(6):e47.
 125. Ling A.P.K., Ung Y.C., Hussein S., Harun A.R., Tanaka A., Yoshihiro H. Morphological and biochemical responses of *Oryza sativa* L.(cultivar MR219) to ion beam irradiation // *Journal of Zhejiang University*. 2013. V. 14. P. 1132-1143.
 126. Liu Q., Segal D.J., Ghiara J.B., Barbas C.F. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. V. 94. P. 5525-5530.
 127. Liu Q., Xia Z.Q., Case C.C. Validated zinc finger protein designs for all 16 GNN DNA triplet targets // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. V.277. P. 3850-3856.
 128. Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D., Drews G.N. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. V. 102. P. 2232-2237.
 129. Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiaik A., Wright D.A., Anthony R.M., Eichtinger M., Jiang T.,

- Foley J.E., Winfrey R.J., Townsend J.A., Unger-Wallace E., Sander J.D., Müller-Lerch F., Fu F., Pearlberg J., Göbel C., Dassie J.P., Pruett-Miller S.M., Porteus M.H., Sgroi D.C., Iafrate A.J., Dobbs D., McCray P.B.Jr., Cathomen T., Voytas D.F., Joung J.K. Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification // *Molecular Cell*. 2008. V. 31. P. 294-301.
130. Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Sander J.D., Voytas D.F., Joung J.K. Oligomerized Pool ENgineering (OPEN): An “Open-Source” Protocol for Making Customized Zinc Finger Arrays // *Nature Protocols*. 2009. V. 4. P. 1471-1501.
131. Mak A.N.S., Bradley P., Bogdanove A.J., Stoddard B.L. TAL effectors: function, structure, engineering and applications // *Current Opinion in Structural Biology*. 2013. V. 23. P. 93-99.
132. Malzahn A., Lowder L., Qi Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR // *Cell & Bioscience*. 2017. V. 7 (21).
133. Mandell J.G.; Barbas C.F., III. Zinc finger tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases // *Nucleic Acids Research*. 2006. V. 34. W516-W523.
134. Mani M., Smith J., Kandavelou K., Berg J.M., Chandrasegaran S. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. V. 334. P. 1191-1197.
135. Marton I., Zuker A., Shklarman E., Zeevi V., Tovkach A., Roffe S., Ovadis M., Tzfira T., Vainstein A. Nontransgenic genome modification in plant cells // *Plant Physiology*. 2010. V. 154. P. 1079-1087.
136. Matsumoto Y., Komiyama M. DNA hydrolysis by rare-earth metal ions // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1992. V.27. P.33-34.
137. Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., Dulay G P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urnov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L., Gregory P.D., Rebar E.J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing // *Nature Biotechnology*. 2011. V. 29. P. 143-148.
138. Mondal S., Petwal V.C., Badigannavar A.M., Bhad P.G., Verma V.P., Goswami S.G., Dwivedi J. Electron beam irradiation revealed genetic differences in radio-sensitivity and generated mutants in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) // *Applied Radiation and Isotopes*. 2017. V. 122. P. 78-83.
139. Montague T.G., Cruz J.M., Gagnon J.A., Church G.M., Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. W401–407.
140. Morbitzer R., Römer P., Boch J., Lahaye T. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V.107. P.21617-21622.
141. Moscou M. J., Bogdanove A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors // *Science*. 2009. V. 326. P. 1501-1501.
142. Moser H.E., Dervan P.B. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation // *Science*. 1987. V.238. P.645-650.
143. Muller H.J. Artificial transmutation of the gene // *Science*. 1928. V.66. P.84-87.
144. Mussolino C., Cathomen T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy // *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. V. 23. P. 644-650.
145. Muthusamy A., Jayabalan N. Variations in seed protein content of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutant lines by in vivo and in vitro mutagenesis // *J. Environ. Biol.* 2013. V.34. P.11-16.
146. Nadson G. Influence des rayons X sur la sexualité et la formation des mutants chez les Champignons inférieurs (*Mucorinees*) // *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1925. V. 98. P. 473–475. (цит. по Курсанова Т.А. Основоположник отечественной микробиологии. К 150-летию со дня рождения академика Г.А.Надсона // *Вестник Российской академии наук*. 2017. Т.87. С.663-669.)
147. Navashin M. «Amphiplastie» - eine neue Karyologische Erscheinung // *Ztschr. ind. Abst. und Verebnungslehre.* - 1928. - V.2. - Suppl. - S.1148-1152. (русский перевод — М.С. Навашин «Амфипластия» - новое кариологическое явление // В кн.: Проблемы кариологии и цитогенетики в исследованиях на видах рода *Crepis*. - М.: Наука. 1985. С.108-111.)
148. Nawaschin S. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium Martagon* und *Fritillaria tenella* // *Изв. Имп. Акад. Наук*. 1898. Т.9. С.377-382.
149. Neff K.L., Argue D.P., Ma A.C., Lee H.B., Clark K.J., Ekker S.C. Mojo Hand, a TALEN design tool for genome editing applications // *BMC Bioinformatics*. 2013. V.14:1.
150. Nilan R.A. Increasing the effectiveness, efficiency, and specificity of mutation induction in flowering plants // *Genes, Enzymes, and Populations*. 1973. P. 205-222.
151. Okuzaki A., Toriyama K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice // *Plant Cell Reports*. 2004. V. 22. P. 509-512.

152. Osakabe Y., Osakabe K. Genome editing with engineered nucleases in plants // *Plant and Cell Physiology*. 2014. V. 56. P. 389-400.
153. Pachter M., Puchta H. From classical mutagenesis to nuclease - based breeding—directing natural DNA repair for a natural end - product // *The Plant Journal*. 2017. V. 90. P. 819-833.
154. Paszkowski J., Baur M., Bogucki A., Potrykus I. Gene targeting in plants // *EMBO J*. 1988. V. 20. P. 4021–4026.
155. Pauwels K., Podevin N., Breyer D., Carroll D., Herman P. Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations // *New Biotechnology*. 2014. V. 31. P. 18-27.
156. Pavletich N.P., Pabo C.O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å // *Science*. 1991. V.252. P.809-817.
157. Peer R., Rivlin G., Golobovitch S., Lapidot M., Gal-On A., Vainstein A., Tzfira T., Flaishman M.A. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees // *Planta*. 2015. V. 241. P. 941-951.
158. Pérez-Quintero A.L., Rodriguez-R L.M., Dereeper A., López C., Koebnik R., Szurek B., Cunnac S. An improved method for TAL effectors DNA-binding sites prediction reveals functional convergence in TAL repertoires of *Xanthomonas oryzae* strains // *PLoS One*. 2013. V.8(7):e68464.
159. Periwal V. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases // *Brief Bioinform*. 2017. V.18. P.698-711.
160. Petolino J.F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases // *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 2015. V. 51. P. 1-8.
161. Podhajski A.J., Szybalski W. Conversion of the *FokI* endonuclease to a universal restriction enzyme: cleavage of phage M13mp7 DNA at predetermined sites // *Gene*. 1985. V.40. P.175-182.
162. Puchta H., Dujon B., Hohn B. 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*. 1993. V. 21. P. 5034–5040.
163. Puchta H., Dujon B., Hohn B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 5055–5060.
164. Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Müller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytas D.F., Joung J.K. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers // *Nature Methods*. 2008. V. 5 (5). P. 374-375.
165. Randolph L.F. An evaluation of induced polyploidy as a method of breeding crop plants // *The American Naturalist*. 1941. V. 75. P. 347-363.
166. Reyon D., Kirkpatrick J.R., Sander J.D., Zhang F., Voytas D.F., Joung J.K., Dobbs D., Coffman C.R. ZFNGenome: a comprehensive resource for locating zinc finger nuclease target sites in model organisms // *BMC Genomics*. 2011. V.12:83.
167. Richter A., Streubel J., Boch J. TAL effector DNA-binding principles and specificity // *TALENs: Methods and Protocols*. 2016. P. 9-25.
168. Richter A., Streubel J., Boch J. TAL effector DNA-binding principles and specificity // *TALENs: Methods and Protocols*. 2016. V.1338. P. 9-25.
169. Rizwan M., Aslam M., Asghar M.J., Abbas G., Shah T.M., Shimelis H. Pre-breeding of lentil (*Lens culinaris* Medik.) for herbicide resistance through seed mutagenesis // *PLoS One*. 2017. V.12(2):e0171846.
170. Rosen L.E., Morrison H.A., Masri S., Brown M.J., Springstubb B., Sussman D., Stoddard B.L. Seligman L.M. Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities // *Nucleic Acids Research*. 2006. V. 34. P. 4791-4800.
171. Rowson J.M. Increased alkaloidal contents of induced polyploids of *Datura* // *Nature*. 1944. V.154. P.81-82.
172. Ruiter R., Van Den Brande I., Stals E., Delaure S., Cornelissen M., D'halluin, K. Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeraplasty // *Plant Molecular Biology*. 2003. V. 53. P. 715-729.
173. Salomon S., Puchta H. Capture of genomic and T - DNA sequences during double - strand break repair in somatic plant cells // *The EMBO Journal*. 1998. V. 17. P. 6086-6095.
174. Samanta M.K., Dey A., Gayen S. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes // *Transgenic Research*. 2016. V. 25. P. 561-573.
175. Sander J.D., Zaback P.Z., Joung J.K., Voytas D.F., Dobbs D. Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool // *Nucleic Acids Research*. 2007. V.35. W599-605.
176. Sander J.D., Maeder M.L., Reyon D., Voytas D.F., Joung J.K., Dobbs D. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool // *Nucleic Acids Research*. 2010. V.38. W462-468.
177. Sapehin, A. A. Röntgen-Mutationen beim Weizen (*Triticum vulgare*) // *Der Züchter*. 1930. V.2. P.257-259.
178. Sauer N.J., Mozoruk J., Miller R.B., Warburg Z.J., Walker K.A., Beetham P.R., Schopke C.R.,

- Gocal G.F. Oligonucleotide - directed mutagenesis for precision gene editing // *Plant Biotechnology Journal*. 2016. V. 14. P. 496-502.
179. Segal D.J., Dreier B., Beerli R.R., Barbas C.F. 3rd. Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V.96. P.2758-2763.
 180. Segal D.J., Beerli R.R., Blancafort P., Dreier B., Effertz K., Huber A., Koksche B., Lund V., Magnenat L., Valente D., Barbas C.F. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 2137-2148.
 181. Shan Q., Zhang Y., Chen K., Zhang K., Gao C. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology // *Plant Biotechnology Journal*. 2015. V. 13. P. 791-800.
 182. Shigi N., Sumaoka J., Komiyama M. Applications of PNA-based artificial restriction DNA cutters // *Molecules*. 2017. V.22. pii: E1586.
 183. Shimamura T. Cytological studies of polyploidy induced by colchicine // *Cariologia*. 1939. V.9. P.476-494.
 184. 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., Gregory P.D., Urnov F.D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases // *Nature*. 2009. V. 459. P. 437-441.
 185. Smith J., Bibikova M., Whitby F.G., Reddy A.R., Chandrasegaran S., Carroll D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains // *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. P. 3361-3369.
 186. Smith J., Grizot S., Arnould S., Duclert A., Epinat J.C., Chames P., Prieto J., Redondo P., Blanco F.J., Bravo J., Montoya G., Paques F., Duchateau P. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences // *Nucleic acids research*. 2006. V. 34. N. 22. e149.
 187. Song D., Wu G., Vrinten P., Qiu X. Development of imidazolinone herbicide tolerant borage (*Borago officinalis* L.) // *Plant Sci*. 2017. V.262. P.74-80.
 188. Soriano-Carot M. Addgene: a global scientific resource // http://www.postdocjournal.com/file_journal/2912_90252780.pdf
 189. Souza P.F., Silva F.D., Carvalho F.E., Silveira J.A., Vasconcelos I.M., Oliveira J.T. Photosynthetic and biochemical mechanisms of an EMS-mutagenized cowpea associated with its resistance to cowpea severe mosaic virus // *Plant Cell Rep*. 2017. V.36. P.219-234.
 190. Soyfer V.N. New light on the Lysenko era // *Nature*. 1989. V.339. P.415-420.
 191. Stadler L.J. Genetic effects of X-rays in maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1928. V.14. P.69-75.
 192. Stadler L.J. Chromosome number and the mutation rate in *Avena* and *Triticum* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1929. V.15. P.876-881.
 193. Stadler L.J. Some genetic effects of X-rays in plants // *Journal of Heredity*. 1930. V.21. P.3-20.
 194. Steinert J., Schiml S., Puchta H. Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants // *Plant Cell Reports*. 2016. V. 35. P. 1429-1438.
 195. Sugisaki H., Kanazawa S. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (*FokI*) and *Micrococcus luteus* (*MluI*) // *Gene*. 1981. V.16. P.73-78.
 196. Surson S., Sitthaphanit S., Wongma N. *In vivo* induction of tetraploid in tangerine citrus plants (*Citrus reticulata* Blanco) with the use of colchicine // *Pak. J. Biol. Sci*. 2015. V.18. P.37-41.
 197. Thole J.M., Strader L.C. Next-generation sequencing as a tool to quickly identify causative EMS-generated mutations // *Plant Signaling and Behavior*. 2015. V. 10 (5). e1000167-1.
 198. Tovkach A., Zeevi V., Tzfira T. A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells // *The Plant Journal*. 2009. V. 57. P. 747-757.
 199. Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F., Maeder M.L., Joung J.K., Voytas D.F. High frequency modification of plant genes using engineered zinc finger nucleases // *Nature*. 2009. V. 459. P. 442-445.
 200. Travis J. Making the cut. CRISPR genome-editing technology shows its power // *Science*. 2015. V.350. P.1456-1457.
 201. Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung J.K. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing // *Nat. Biotechnol*. 2014. V.32. P.569-576.
 202. Tulay E., Unal M. Production of colchicine induced tetraploids in *Vicia villosa* roth // *Caryologia*. 2010. V. 63 (3). P. 292-303.
 203. Waje C.K., Jun S.Y., Lee Y.K., Moon K.D., Choi Y.H., Kwon J.H. Seed viability and functional properties of broccoli sprouts during germination and

- postharvest storage as affected by irradiation of seeds // *J. Food Sci.* 2009. V.74. P.C370-374.
204. Wang L.J., Sheng M.Y., Wen P.C., Du J.Y. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // *Bot. Stud.* 2017. V.58(1):2.
205. Wang M., Liu Y., Zhang C., Liu J., Liu X., Wang L. Wang W., Chen H., Wei C., Ye X., Li, X., Tu J. Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice OsEPSPS gene and the inheritance of mutations // *PLoS One.* 2015. V.10 (4). e0122755.
206. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. P. 947–951.
207. Warmke H.E. Experimental polyploidy and rubber content in *Taraxacum kok-saghyz* // *Bot. Gaz.* 1945. V.106. P.316-324.
208. Watanabe K., Breier U., Hensel G., Kumlehn J., Schubert I., Reiss B. Stable gene replacement in barley by targeted double-strand break induction // *Journal of experimental botany.* 2015. V. 67 (5). P. 1433-1445.
209. White F. *Xanthomonas* and the TAL effectors: Nature's molecular biologist // *TALENs: Methods and Protocols.* 2016. V.1338. P. 1-8.
210. Wolter F., Puchta H. Knocking out consumer concerns and regulator's rules: efficient use of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes for genome editing in cereals // *Genome Biology.* 2017. V. 18 (1). P. 43.
211. Wright D.A., Thibodeau-Beganny S., Sander J.D., Winfrey R.J., Hirsh A.S., Eichinger M., Fu F., Porteus M.H., Dobbs D., Voytas D.F., Joung J.K. Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly // *Nature Protocols.* 2006. V. 1. P. 1637.
212. Wright D.A., Townsend J.A., Winfrey R.J., Irwin P.A., Rajagopal J., Lonosky P.M., Hall B.D., Jondle M.D., Voytas D.F. High - frequency homologous recombination in plants mediated by zinc - finger nucleases // *Plant Journal.* 2005. V. 44. P. 693-705.
213. Wu L., Yu Z. Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat // *Radiation and Environmental biophysics.* 2001. V. 40 (1). P. 53-57.
214. Wyvekens N., Topkar V.V., Khayter C., Joung J.K., Tsai S.Q. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing // *Hum. Gene Ther.* 2015. V.26. P.425-431.
215. Xiao A., Wu Y., Yang Z., Hu Y., Wang W., Zhang Y., Kong L., Gao G., Zhu Z., Lin S., Zhang B. EENdb: a database and knowledge base of ZFNs and TALENs for endonuclease engineering // *Nucleic Acids Res.* 2013. V.41. (Database issue). D415-422.
216. Xu T., Bian N., Wen M., Xiao J., Yuan C., Cao A., Zhang S., Wang X., Wang H. Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) high-tillering dwarf mutant // *Theor. Appl. Genet.* 2017. V.130. P.483-494.
217. Yamamoto Y., Igawa T., Sumaoka J., Komiyama M. Hydrolysis of DNA by Ce (IV)/EDTA complexes—The mechanism of DNA cleavage and design of artificial restriction enzymes // *Nucleic Acids Symposium Series.* 2000. V. 44. P. 231-232.
218. Yamamoto Y., Mori M., Tomita T., Zhou J.M., Komiyama M. Manipulation of double-stranded DNA by artificial restriction enzyme composed of Ce (IV)/EDTA and PNA // *Nucleic Acids Symposium Series.* 2004. V. 48. P. 279-280.
219. Yamamoto Y., Uehara A., Tomita T., Komiyama M. Site-selective and hydrolytic two-strand scission of double-stranded DNA using Ce(IV)/EDTA and pseudo-complementary PNA // *Nucleic Acids Res.* 2004. V.32(19):e153.
220. Yamamoto Y., Miura K., Komiyama M. Site-selective hydrolysis of huge DNA by artificial restriction DNA cutter // *Nucleic Acids Symposium Series.* 2006. V. 50. P. 265-266.
221. Yamamoto Y., Uehara A., Miura K., Watanabe A., Aburatani H., Komiyama M. Development of artificial restriction DNA cutter composed of Ce(IV)/EDTA and PNA // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. V.26. P.1265-1268.
222. Yu Z., Deng J., He J., Huo Y., Wu Y., Wang X., Lui G. Mutation breeding by ion implantation // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 1991. V. 59-60. P. 705-708.
223. Zahedi A.A., Hosseini B., Fattahi M., Dehghan E., Parastar H., Madani H. Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschyi* Boiss // *Bot. Stud.* 2014. V.55(1):22.
224. Zhang W., Liu X., Zheng F., Zeng S., Wu K., da Silva J.A.T., Duan J. Induction of rice mutations by high hydrostatic pressure // *Plant Physiology and Biochemistry.* 2013. V. 70. P. 182-187.
225. Zhang X., Zhang X.F., Li H.P., Wang L.Y., Zhang C., Xing X.H., Bao C.Y. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2014. V. 98. P. 5387-5396.
226. Zhang Y., Zhang F., Li X., Baller J.A., Qi Y., Starker C.G., Bogdanove A.J. Voytas D.F.

- Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering // *Plant Physiology*. 2013. V. 161. P. 20-27.
227. Zhang J., Sumich A., Wang G.Y. Acute effects of radiofrequency electromagnetic field emitted by mobile phone on brain function // *Bioelectromagnetics*. 2017. V.38. P.329-338.
228. Zhebrak A.R. Soviet biology // *Science*. 1945. V.102. P.357-358.
229. Zhu T., Mettenburg K., Peterson D.J., Tagliani L., Baszczynski C.L. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides // *Nature Biotechnology*. 2000. V. 18. P. 555-558.
230. Zhu T., Peterson D.J., Tagliani L., Clair G.S., Baszczynski C.L., Bowen B. Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. V. 96. P. 8768-8773.

EVOLUTION OF METHODS FOR GENOME EDITING

Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Knyazev A.V.,
Chemeris D.A., Gumerova G.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia, chemeris@anrb.ru

Resume

The article describes the evolution of the genomic editing methods, beginning since induced mutagenesis that causes random mutations in the genomes under the action of physical factors or chemical agents. Induced polyploidy is considered to be a genome mutation, and thus it can be viewed as a variant of editing of the genome in the form of a complete duplication. It is noted that for effective directional editing genomes of any organisms, it is necessary to introduce double-stranded breaks in the target site of DNA molecules. Methods of directed mutagenesis, using chimeric oligonucleotides, recombination with meganuclease, artificial molecular "scissors" ARCUT, "zinc fingers" nucleases, the nucleases on the basis of effector TAL proteins, as well as Cas nucleases, which is part of the forefront CRISPR/Cas technology for editing genomes are described. A significant contribution of Russian scientists in several areas of producing mutant plants is demonstrated, despite the obstacles created for them. References cover more than a century.

Keywords: CRISPR/Cas editing, ZFN editing, TALEN editing, meganucleases, chimeric oligonucleotides, molecular cutter ARCUT, mutation, mutagenesis, genome editing