

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Модификация геномов растений: от индуцированного мутагенеза до геномного редактирования

А.Б. Щербань^{1, 2} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

 atos@bionet.nsc.ru

Аннотация. Лавинообразный рост научных данных, полученных с помощью современных методов геномного редактирования (ГР), обуславливает актуальность их критического осмысления и сопоставления с предыдущими методами модификации генома. В обзоре дана характеристика основных этапов развития методов модификации генома применительно к растительным объектам. Технология индуцированного мутагенеза лидировала в течение многих десятилетий прошлого века, с ее помощью получено огромное разнообразие сортов культурных растений. Однако этот процесс был довольно длительным и включал целый ряд стадий: от индукции множественных мутаций с помощью мутагенных факторов до этапов скрещивания и отбора наиболее ценных форм на протяжении ряда поколений. Пришедшая на смену технологии геномной инженерии (трансгенеза) позволила радикально сократить время получения новых генетически модифицированных форм до одного поколения, сделать процесс модификации более эффективным и целенаправленным. Но наряду с этим она имела главным недостатком возможность неконтролируемого влияния вводимого трансгена на другие гены растения-реципиента, что привело к существенным ограничениям применения трансгенеза во многих странах. Эти ограничения в настоящее время успешно преодолеваются с развитием методов ГР, позволяющих очень точно, в пределах одного гена, осуществлять модификацию, которая по своим свойствам практически не отличается от природного аллеля гена (особенно в случае использования рибонуклеопротеиновых комплексов), что дает возможность избежать ограничений на применение этой технологии в практической селекции. Приведена краткая характеристика различных методов ГР, включая использование белковых редакторов, ZF- и TALEN-нуклеаз, а также наиболее перспективный метод – CRISPR/Cas9. Перечислен ряд научных результатов по созданию с помощью этих методов новых форм растений: устойчивых к неблагоприятным факторам, с повышенной урожайностью и ценными питательными свойствами. В рамках обзора рассматривается новый подход «доместикация *de novo*» с целью ускоренного получения культурных растений из природных форм. Обсуждаются дальнейшие пути развития методологии ГР.

Ключевые слова: индуцированный мутагенез; трансгенез; геномное редактирование; нуклеазы; CRISPR/Cas9; патоген; устойчивость; урожайность.

Для цитирования: Щербань А.Б. Модификация геномов растений: от индуцированного мутагенеза до геномного редактирования. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7):684-696. DOI 10.18699/VJGB-22-83

Plant genome modification: from induced mutagenesis to genome editing

А.Б. Shcherban^{1, 2} 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 atos@bionet.nsc.ru

Abstract. The snowballing growth of scientific data obtained using modern techniques of genome editing (GE) calls for their critical evaluation and comparison against previously applied methods such as induced mutagenesis, which was a leading method of genome modification for many decades of the past century, and its application has resulted in a huge diversity of cultivars. However, this method was relatively long and included a number of stages from inducing multiple mutations using different mutagenic factors to crossing and selecting the most valuable cultivars for several generations. A new technology of genetic engineering and transgenesis enabled us to radically reduce the time required to obtain a new genetically-modified cultivar to one generation and make the modification process more effective and targeted. The main drawback of this approach was that an introduced transgene might uncontrollably affect the other genes of a recipient plant, which led to the limitations imposed on transgenesis application in many countries. These limitations have been effectively surmounted thanks to the development of GE techniques allowing for a precise modification within a single gene that in many characteristics make it similar to a natural allele (especially when it comes to ribonucleoprotein complexes), which has paved the way for wide application of GE in routine breeding. The paper reviews the main stages of GE development in its application in plants. It provides short descriptions

of different GE techniques, including those using protein editors such as zinc-finger and transcription activator-like effector nucleases (TALEN), and the CRISPR/Cas9 technology. It lists a number of achievements in using GE to produce new cultivars of higher yield that are resistant to unfavorable factors and have good nutritional properties. The review also considers the *de novo* domestication approach, which allows for faster obtaining of new cultivars from natural varieties. In the conclusion, the future ways of GE development are discussed.

Key words: induced mutagenesis; transgenesis; genome editing; nucleases; CRISPR/Cas9; pathogen; resistance; yield.

For citation: Shcherban A.B. Plant genome modification: from induced mutagenesis to genome editing. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):684-696. DOI 10.18699/VJGB-22-83

Введение

В основе эволюции живых организмов лежит непрерывный процесс накопления спонтанных мутаций, частота которых в зависимости от особенностей генетического аппарата варьирует от 10^{-9} до 10^{-12} /нуклеотид/поколение клеток. Механизм их появления, как известно, связан с нарушениями основных биологических процессов: репликации, репарации и рекомбинации ДНК (Jonczyk et al., 1988; Banerjee et al., 1990). Только незначительная часть таких мутаций вовлекается в эволюционный процесс, остальные отсеиваются в результате отбора. Индуцированные мутации под действием химических агентов, волнового излучения или иных факторов также носят случайный характер, но при этом имеют повышенную частоту, которая создает возможность одновременного получения огромного множества мутационных событий в геноме (Sakuraba et al., 2005). Однако для отбора полезных аллелей и их комбинаций необходим длительный процесс, включающий этапы скрещивания с немутантными формами и селекции нужных генотипов в ряду поколений. Тем не менее значительное число современных сортов растений было получено как результат программы исследования индуцированного мутагенеза в начале и середине XX в., частично это побочный продукт развития ядерных технологий.

Второй способ искусственного получения новых вариантов генов – генная инженерия, или трансгенез. Основное ее преимущество, по сравнению с индуцированным мутагенезом, заключается в возможности быстрого, целенаправленного влияния на тот или иной признак посредством вводимого чужеродного трансгена, что приводит к значительному сокращению срока получения генетически модифицированного организма (ГМО) (Khush, 2012). Однако у данной технологии наряду с положительными есть и отрицательные стороны, которые будут рассмотрены далее.

Дальнейшее развитие технологий модификации генома связано с усовершенствованием адресной доставки векторных молекул и повышением направленности их действия на определенные генетические локусы, что нашло свое воплощение в стратегии генетического таргетинга (gene targeting) (Hall et al., 2009). Она позволяет во многом избежать главного недостатка трансгенеза, а именно: возможности встраивания трансгена в различные участки генома, сделать воздействие на геном более точечным, затрагивающим только ген(ы) интереса, исключая нецелевое (off-target) редактирование других генов. Стратегия таргетинга изначально базировалась на феномене гомологичной рекомбинации между последовательностью ДНК в составе вектора и гомологичной ей

последовательностью геномной ДНК (Smithies et al., 1985; Саресчи, 1989). Результатом данного процесса могут быть делеция гена или его части, часто приводящая к потере его функциональности (нокауту), встройка дополнительной последовательности, модификация отдельных оснований (точечные мутации). Технологии генетического таргетинга широко используются на животных, а также у человека. В частности, с целью изучения генетических заболеваний в клеточных линиях в условиях *in vitro* производится нокаут или модификация того или иного гена, потенциально участвующего в патогенезе (Sur et al., 2009). Наряду с гомологичной рекомбинацией в геномах эукариотических организмов существует механизм негомологичной рекомбинации (non-homologous end joining, NHEJ), который с высокой частотой может генерировать непредсказуемые мутации в ходе последующей репарации ДНК (Guirouilh-Barbat et al., 2004).

Большим достижением, позволившим значительно повысить эффективность генетического таргетинга, стало открытие и использование искусственно созданных эндонуклеаз, таких как мегануклеазы, zinc-finger (ZF)-нуклеазы, TALEN-нуклеазы, сайт-специфическая нуклеаза Cas9. Собственно, использование этих нуклеаз и привело к появлению нового специфического термина «геномное редактирование», хотя его можно рассматривать и в широком смысле, как любые методы модификации генов, независимо от технологии (Bak et al., 2018).

Нуклеазы ZF и TALEN используются в комплексе с направляющими белками, а именно с доменами «цинковые пальцы» и белками, подобными TAL-эффекторам бактерий, соответственно. В случае нуклеазы Cas9 в качестве направляющей структуры используется молекула РНК (CRISPR RNA). Последняя методология, получившая название CRISPR-Cas9 (CRISPR/Cas), стала революционным прорывом в геномном редактировании (ГР), так как была наименее трудоемкой, сравнительно дешевой и наиболее точной и эффективной. За прошедшие годы с момента дебюта в 2012 г. ее применили для редактирования огромного количества объектов: от человека до дрожжей (Хлесткина, Шумный, 2016).

Далее будут более подробно рассмотрены результаты, полученные на растениях с помощью различных методов модификации генома.

Индуцированный мутагенез

Влияние радиации на наследственность было показано еще в начале прошлого века в работах американского генетика Г. Мёллера (Muller, 1927) и русского ботаника Г. Надсона (Nadson, Philippov, 1925). Это открытие стимулировало многочисленные генетические исследования в

данном направлении, которые происходили параллельно с интенсивным развитием волновой и ядерной физики в тот же период. Достаточно назвать таких исследователей русской школы, как А. Сапегин, который изучал радиационный мутагенез мягкой пшеницы (Sapehin, 1930), Н. Тимофеев-Ресовский – основоположник целого направления радиационной генетики (Timofeeff-Ressovsky, 1929). Одновременно с этим происходило изучение химического мутагенеза, начиная с работ Н. Кольцова и его ученика И. Рапопорта, которому принадлежат основные достижения в использовании химического мутагенеза в селекции растений (Рапопорт, 1946).

На протяжении нескольких десятилетий, с 30-х годов прошлого века, селекционерами всего мира создано множество сортов различных культурных растений с использованием как радиационных, так и химических мутагенов. В базах данных имеются сведения о более чем 3200 искусственных мутантах культурных растений, относящихся к 200 видам (<https://mvd.iaea.org>).

По доле произведенных мутагенных сортов (6.7 %) Россия находится на 4-м месте после Китая Индии и Японии (Ahloowalia et al., 2004). На основе мутантных форм в нашей стране были получены сорта озимой и яровой пшеницы, ячменя, сои, люпина, овса, фасоли и ряда других культур. В качестве яркого примера можно привести сорт яровой мягкой пшеницы Новосибирская 67, созданный с помощью радиационного мутагенеза. Этот сорт – результат совместной работы селекционеров Новосибирской опытной станции и Института цитологии и генетики СО АН СССР (Черный, 1982). Долгое время он был лидером по площади посевов в Западной Сибири, поскольку совмещал высокую продуктивность, отличные хлебопекарные свойства, устойчивость к ряду болезней. В НИИ масличных культур (Краснодар) методом химического мутагенеза был получен сорт подсолнечника Первенец, который по качеству масла не уступал сортам оливкового дерева (Российский солнечный цветок, 2007).

Мутация карликовости была использована Н. Борлаугом для создания неполегающих высокоурожайных сортов мягкой пшеницы, что послужило основой «зеленой революции» в середине XX в. (Gaud, 1968). Методами экспериментального мутагенеза совместно с отдаленной гибридизацией Э. Сирс и Ф. Эллиот перенесли локусы устойчивости к ржавчине и головне от диких видов эгилопса и пырея в мягкую пшеницу (Kilian et al., 2011). Г. Штуббе (ГДР), используя 5-кратное облучение рентгеновскими лучами в нескольких поколениях и отбор, увеличил размер плодов у дикого мелкоплодного томата до размера плодов культурного томата (Stubbe, 1957).

Трансгенез

Следующий способ получения новых вариантов генов человеком – генная инженерия, или искусственный трансгенез. Этот процесс можно определить как введение чужеродного гена (трансгена) в живой организм, при котором организм получает прогнозируемые, передающиеся по наследству свойства. Доставка трансгенов у растений осуществляется с помощью специальных векторов, созданных на основе Ti-плазмид агробактерий (Weising et al., 1988). Поскольку генетический код одинаков для всех

видов, то трансгенный организм способен экспрессировать чужеродные гены.

Данная технология имела много преимуществ перед индуцированным мутагенезом. Во-первых, генная инженерия существенно расширила возможности целенаправленной модификации организмов, поскольку чужеродные гены могут иметь не характерные для организма-реципиента свойства, которые невозможно получить с помощью мутагенов (например, синтез в растениях лекарственных препаратов, инсектицидов и т. п.). Во-вторых, масштабы и длительность селекции значительно сокращались, особенно с внедрением в состав векторной ДНК маркеров – генов устойчивости к антибиотикам или репортерных генов, которые позволяли быстро и эффективно идентифицировать ГМО. В фундаментальном аспекте трансгенные организмы представляют собой удобную модель для изучения функции того или иного гена и его фенотипических проявлений.

Получено множество генетически модифицированных культур растений, таких как кукуруза, рис, соя, хлопок, рапс, картофель и др., которые возделываются на сотнях миллионов гектаров по всему миру (Genetically Engineered Crops..., 2016). Один из примеров трансгенных растений – золотистый рис, имеющий повышенное содержание β-каротина, предшественника витамина А, дефицит которого является причиной ксерофтальмии – распространенного заболевания в Юго-Восточной Азии. Для его создания в местный сорт риса с помощью биобаллистики был внедрен ген фитоенсинтазы нарцисса (Burkhardt et al., 1997). Другой пример успешного применения трансгенеза в сельском хозяйстве – трансгенная соя.

На рынке широко представлены сорта трансгенной сои, устойчивые к различным гербицидам: раундапу (глифосат), глюфозинату, дикамбе, а также содержащие ген ВТ-токсина из бактерии *Bacillus thuringiensis*, обеспечивающий устойчивость к насекомым-вредителям (<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>).

Аналогичный трансген был внедрен в хлопчатник, в результате чего растения приобрели резистентность к гусеницам хлопковой совки – распространенному вредителю этой культуры (Wu et al., 2008). Получены трансгенные растения хлопчатника, кукурузы, рапса, устойчивые к гербицидам (Tan et al., 2005; Karthik et al., 2020), устойчивая к насекомым кукуруза (Lundmark, 2007) и ряд других.

Все эти примеры показывают успешное применение технологии трансгенеза в сельском хозяйстве таких стран, как США, Китай, Индия, Аргентина, Канада и др., где разрешено промышленное выращивание и использование трансгенных растений.

В большинстве стран запрещено или существенно ограничено создание и выращивание ГМО либо, как в России, разрешен только ввоз и использование ГМО в качестве продуктов питания, корма для животных и для научно-исследовательских целей (Дудин, 2020). И хотя опасения, связанные с ГМО, являются следствием предвзятости или конкуренции со стороны агрохимических компаний, тем не менее нельзя утверждать, что они полностью безосновательны. ГМО представляют определенную угрозу для экосистем. Например, при введении генов устойчивости к гербицидам нельзя с полной уверенностью гарантировать,

что со временем эти гены не перейдут вместе с пылью на сорные виды растений в результате перекрестной гибридизации (Schütte et al., 2017).

Существует также некоторый риск воздействия трансгенного растения на нецелевые организмы, например, растения, несущие гены ВТ-токсинов, могут уничтожать безвредных насекомых. Однако этот риск весьма незначителен по сравнению с рисками, обусловленными воздействием инсектицидов (Marvier et al., 2007). Отдаленные последствия трансгенеза неясны из-за того, что трансгенная конструкция может встраиваться в различные участки генома и нарушать экспрессию других генов. Что касается вреда для здоровья человека, то, как показали многочисленные научные исследования, ГМО и их продукты опасны не более, чем традиционные культуры (König et al., 2004).

Геномное редактирование

В основе ГР лежит направленное изменение ограниченного участка гена, которое может достигаться различными способами. Если рассматривать предисторию, то первым экспериментом было использование для редактирования генов ДНК-олигонуклеотидов. Так, в 1999 г. у табака и кукурузы с помощью химерных РНК-ДНК-олигонуклеотидов были отредактированы два гена: дефектный ген зеленого флуоресцентного белка и ген ацетолаттатсинтазы (Beetham et al., 1999; Zhu et al., 1999). В последнем случае у растений возникла (хотя и с очень низкой частотой) устойчивость к гербицидам имидазолину и сульфонилмочевине. После этого последовал еще ряд аналогичных работ с этими и другими видами растений (Zhu et al., 2000; Kochevenko, Willmitzer, 2003; Okuzaki, Toriyama, 2004). Однако эффективность данного способа модификации генома была сопоставима с уровнем спонтанного мутагенеза (Ruiter et al., 2003).

Несколько большую эффективность показали одноцепочечные ДНК-олигонуклеотиды (Dong et al., 2006), тем не менее и в этом случае эффективность была низкой, к тому же возникла проблема отбора отредактированных растений, которая не могла быть решена без использования векторов. Поэтому перспектива развития данного направления остается под вопросом.

Следующее направление связано с использованием эндонуклеаз – специальных ферментов, вносящих двуцепочечные разрывы в молекулу ДНК. Процесс репарации таких разрывов может происходить путем рекомбинации с гомологичным месту разрыва фрагментом ДНК, помещенным в вектор и доставленным в ядро клетки путем трансформации. Первыми эндонуклеазами, использованными с этой целью, были мегануклеазы (homing endonucleases), узнающие участки ДНК длиной 12–45 нуклеотидов. Специфичность этих участков варьировала в зависимости от типа нуклеазы. Так, с помощью мегануклеазы *I-SceI* ген *bar* под контролем промотора 35S был точно внедрен в определенный сайт генома кукурузы, что обеспечило полному растению устойчивость к гербициду фосфинотрицину (D'Halluin et al., 2008).

Аналогично была проведена сайт-специфическая инсерция в геном хлопчатника (род *Gossypium*) генов *hpps* и *epsps*, ответственных за устойчивость к глифосату

(D'Halluin et al., 2013). К. Watanabe с коллегами (2015) с использованием мегануклеазы *I-SceI* осуществили замену участка генома ячменя на гомологичный в составе вектора, в котором имелся функциональный ген устойчивости к гитромицину.

Белковые редакторы: ZF- и TALEN-нуклеазы

В методах ГР на основе белковых редакторов используются химерные нуклеазы – сложные белки, содержащие два структурных компонента. Один из них специфически связывается с определенными нуклеотидными последовательностями геномной ДНК, направляя на них второй компонент – нуклеазу, катализирующую расщепление ДНК. Эти белки можно вводить в растительный геном с помощью экспрессионных векторов.

Вначале были разработаны ZF-нуклеазы, в типичном случае содержащие в качестве направляющей структуры три «цинковых пальца», – белковые домены, связанные с одним или двумя ионами цинка и способные узнавать и специфично связываться с определенным триплетом нуклеотидов в последовательности ДНК. В некоторых случаях удалось увеличить число доменов до 6 и, соответственно, повысить уровень специфичности до 18 нуклеотидов ДНК (Liu et al., 1997).

Впервые редактирование генома растений с использованием ZF-нуклеаз было продемонстрировано в 2005 г. на арабидопсисе, в который был внедрен соответствующий вектор, и в месте образования двуцепочечного разрыва обнаружился индел разной протяженности, преимущественно делеции (78 % случаев) (Lloyd et al., 2005). С тех пор целый ряд аналогичных работ был выполнен на табаке, сое, кукурузе, томате, яблоне и инжире (Shukla et al., 2009; Townsend et al., 2009; Curtin et al., 2011; Peer et al., 2015; Hilioti et al., 2016). Однако метод оказался весьма трудоемким и дорогостоящим, поскольку для индивидуальной последовательности ДНК-мишени необходимо создать уникальную белковую структуру ZF-нуклеазы. К тому же этот метод не вполне строго распознает триплеты нуклеотидов, что приводит к большому числу расщеплений ДНК в нецелевых участках. По этим причинам в настоящее время данный метод практически не применяется.

Более перспективным оказался метод ГР с использованием химерных нуклеаз TALEN (transcription activator-like effector nucleases). Роль ДНК-направляющих структур в этом методе играют белковые домены – прототипы природных TAL-эффекторов некоторых бактерий, каждый из которых узнает всего один нуклеотид. В данном случае механизм узнавания ДНК более однозначен, чем в случае ZF-нуклеаз, поэтому сравнительно легко создать конструкцию, специфично узнающую нужную последовательность ДНК. Соединяя последнюю с ферментом, расщепляющим ДНК (обычно используется *Fok I* эндонуклеаза), теоретически возможно с высокой точностью внести двунитевой разрыв в любой участок генома.

В 2011 г. этот метод был признан самым перспективным генно-инженерным методом. К 2017 г. с помощью TALEN-технологии произведено редактирование геномов 12 видов растений, включая культурные растения, такие как рис, пшеница, кукуруза, табак, ячмень, картофель,

сахарный тростник, соя, томат, а также модельные – арабидопсис, брахиподиум. В целом у этих растений более 50 генов подверглись редактированию (преимущественно нокауты) (Malzahn et al., 2017). Так, например, для увеличения выхода биоэтанола у сахарного тростника с использованием TALEN-нуклеаз был проведен нокаут генов, контролирующих высокое содержание лигнина (Jung, Altpeter, 2016). Для того чтобы исключить подслащивание картофеля при его хранении на холоде, был нокаутирован ген вакуолярной инвертазы, катализирующей расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу (Clasen et al., 2016). В каждом из трех субгеномов аллогексаплоидной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (геном BAD; $2n = 42$) удалось с помощью TALEN-, а также CRISPR/Cas9-подходов нокаутировать аллели генов *MLO* (mildew resistant loci), отвечающие за восприимчивость к мучнистой росе – весьма распространенному патогену (Wang et al., 2014). С целью улучшения качества растительного масла у сои были внесены мутации в гены ферментов десатураз (Haun et al., 2014).

Применительно к технологии TALEN разработан ряд компьютерных программ для поиска сайтов редактирования, создания векторных конструкций, выявления off-target сайтов, например TALENdesigner (<http://talendesign.de>).

CRISPR/Cas – ведущий метод геномного редактирования

В отличие от химерных нуклеаз, в методе CRISPR/Cas структурами, распознающими ДНК, являются не белки, а короткие РНК, которые, во-первых, делают это гораздо точнее по принципу комплементарности, а во-вторых, их значительно легче и дешевле синтезировать. Идея создания этого метода родилась при исследовании механизма, который используют бактерии для защиты от патогенных вирусов (бактериофагов) (Савицкая и др., 2016). В литературе существует много работ, посвященных этому методу (Хлесткина, Шумный, 2016; Злобин и др., 2017; Стрыгина, Хлесткина, 2020). Впервые на растительных объектах метод CRISPR/Cas был применен в 2013 г. (Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013).

Упрощенный вариант векторной конструкции для трансформации растений включает гены белка Cas9 и направляющей РНК (аналог CRISPR RNA бактерий), а также дополнительную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS). Данную конструкцию вводят в растительные клетки с использованием агробактериальной трансформации или биобаллистики. В клетке происходит транскрипция компонентов системы с помощью внутриклеточной РНК-полимеразы III. С РНК-матрицы, кодирующей Cas9, на рибосомах транслируется белок, который затем с помощью NLS поступает в ядро. В ядре происходит объединение направляющей РНК и Cas9, и далее этот комплекс связывается по принципу комплементарного взаимодействия с целевым сайтом.

Важным элементом, во многом определяющим специфичность связывания комплекса, является PAM (protospacer adjacent motif) – нуклеотидный триплет, обычно

NGG, расположенный вблизи 3'-конца целевого сайта. Каталитические домены нуклеазы вносят одноцепочечные разрывы вблизи PAM. Эти разрывы активизируют систему репарации, которая может происходить двояко. Первый путь – по механизму NHEJ-негомологичного соединения концов, и поскольку этот механизм склонен к ошибкам, могут иметь место индели одного или нескольких нуклеотидов, часто приводящие к сдвигу рамки считывания кодируемого белка, что нарушит его функциональность вплоть до нокаута. Второй путь – репарация с помощью гомологичной рекомбинации (HDR) предполагает редактирование целевого участка или вставку новой последовательности, которая может нести желательный для экспериментатора признак, но для этого необходимо, чтобы такой фрагмент донорной ДНК присутствовал в месте редактирования.

Ключевым моментом, обеспечивающим успех редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas, – выбор направляющей RNA (guide RNA) для гена-мишени. Непосредственный участок взаимодействия с gRNA обычно не превышает 30 п. н. Наличие PAM на 3'-конце этого участка является необходимым условием при выборе сайта для редактирования с помощью данной технологии. Другой важный критерий выбора gRNA – количество и локализация сайтов нецелевого редактирования, поиск которых в геноме для каждой конкретной gRNA осуществляется с помощью специальных программ, в частности доступных на сайте <http://crispr.mit.edu/>.

В последнее время активно разрабатывается способ геномного редактирования с использованием РНП-частиц или рибонуклеопротеиновых комплексов. В случае этих комплексов трансформирующим агентом служит не векторная конструкция (плазмидная ДНК), а готовый комплекс белка Cas9 и направляющей РНК. Этот метод уже продемонстрировал свою эффективность при редактировании геномов кукурузы, пшеницы и картофеля методом бомбардировки эмбриональных клеток микрочастицами золота (Martin-Ortigosa et al., 2014; Woo et al., 2015; Svitashv et al., 2016; Liang et al., 2017; Andersson et al., 2018).

Следует подчеркнуть, что именно сочетание безвекторного характера со способом доставки (не используется агробактерия, которая сама по себе может оказывать нежелательное генетическое воздействие) позволяет этому методу полностью выйти за рамки технологий ГМО, а значит, избежать запрета на использование в сельском хозяйстве. Еще одним его преимуществом является снижение вероятности разрезания геномной ДНК в нецелевых участках, по сравнению с доставкой при помощи агробактерий, поскольку время жизни доставленного в клетки РНП-комплекса заметно меньше, чем при его экспрессии с ДНК.

Однако у метода биобаллистики в сочетании с РНП есть целый ряд проблем, связанных с повышенной травматичностью для тканей растений, сложностью трансформации и регенерации, низкой частотой редактирования, поэтому агробактериальная трансформация с использованием векторов пока остается лидирующим подходом для CRISPR/Cas.

Использование метода CRISPR/Cas для создания новых форм растений

Геномное редактирование может применяться для решения задач как фундаментальной науки – изучение функций генов, так и прикладной – получение растений с новыми полезными для человека свойствами. Фундаментальная задача решается с применением методов обратной генетики, а именно исследователи манипулируют последовательностями генов, изменяя или выключая тот или иной ген, и анализируют, к каким изменениям фенотипа это приводит. Задачи прикладной науки весьма разнообразны.

Далее будут рассмотрены основные направления применения метода CRISPR/Cas с целью создания хозяйственно ценных форм растений.

Устойчивость к патогенам

Работы по созданию растений, устойчивых к различным патогенам, представлены в таблице. Так, у риса *Oryza sativa* L. с помощью метода CRISPR/Cas удалось достичь устойчивости к трем патогенам: бактерии, вызывающей бактериальный ожог (bacterial blight), сферическому вирусу тунгро (tungro spherical virus) и грибу-возбудителю пирикулярриоза (blast fungus). В случае бактерии был нокаутирован один из *S*-генов, отвечающих за чувствительность к данному патогену, а именно ген транспорта сахарозы *OsSWEET13*, являющийся мишенью для бактериального TAL-эффектора (Zhou et al., 2015). Во втором случае был выключен хозяйский ген *eIF4G*, продукт которого контролирует инициацию трансляции вирусной РНК (Macovei et al., 2018). И, наконец, в случае грибного патогена нокауту подвергся ген *OsERF922*, что привело к снижению уровня гормона этилена в клетках и усилению защитных свойств растения (Wang et al., 2016).

У мягкой пшеницы *T. aestivum* грибной патоген *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* вызывает опасное заболевание – мучнистую росу, которое актуально для многих регионов и очень существенно снижает урожай этой культуры. К настоящему времени проведено редактирование *S*-генов, связанных с чувствительностью к данному грибу. В одной из работ был произведен нокаут генов *MLO* (Wang et al., 2014), в другой – генов *EDR1* (enhanced disease resistance) (Zhang et al., 2017). Показано, что в обоих случаях для полной устойчивости растений необходим нокаут всех трех гомеологичных копий гена, поскольку нокаут одной или двух копий обеспечивал лишь частичную устойчивость к этому заболеванию.

У томата *Solanum lycopersicum* L. использование метода CRISPR/Cas позволило получить растения, устойчивые к следующим патогенам: возбудителю бактериальной пятнистости (bacterial speck), вирусу скручивания желтых листьев (yellow leaf curl virus) и мучнистой росе. В первом случае для усиления барьера для проникновения бактерии в клетки в ген *SIJAZ2*, контролирующий закрытие листовых устьиц, была внесена мутация, которая привела к усилению его функции (gain of function) (Ortigosa et al., 2018). В случае вирусного заболевания в качестве мишеней были выбраны гены самого патогена, – ген оболочки вируса (*CP*) и ген репликазы (*Rep*). Короткие последовательности этих генов в составе Т-ДНК встраивались в ядерный геном растения, что обеспечивало их

конститутивную экспрессию в виде молекул РНК, которые в комплексе с Cas9 эффективно интерферировали с ДНК-вируса (Tashkandi et al., 2018).

Устойчивость к абиотическому стрессу

Ряд работ посвящен созданию растений, устойчивых к абиотическим факторам (см. таблицу). Например, с использованием технологии протопластов у пшеницы были мутированы два гена, связанные со стрессом засухи, *TaDREB2* и *TaERF3* (Kim D. et al., 2017). Подобная работа выполнена на сое *Glycine max* L., в которой проведен мутагенез двух генов, связанных с устойчивостью к стрессам засухи и засоления (Curtin et al., 2018).

Можно привести также примеры работ фундаментальной направленности. Так, митоген-активируемые протеинкиназы (МПК) реагируют на стресс засухи, защищая мембрану клеток от окислительного разрушения и регулируя транскрипцию других генов. Роль одного из МПК-генов у томата была установлена путем создания нокаут-мутантов по этому гену с помощью метода CRISPR/Cas (Wang et al., 2017). Аналогичным образом была подтверждена роль в стрессоустойчивости трех генов риса, кодирующих митоген-активированную протеинкиназу (*OsMPK2*), фитоен-десатуразу (*OsPDS*) и бетаин-альдегид дегидрогеназу (*OsBADH2*) (Shan et al., 2013).

Урожайность

Примеры работ представлены в таблице. Увеличения размеров зерновки и показателя «масса 1000 зерен» у мягкой пшеницы удалось достичь при внесении нонсенс-мутаций в гомеологичные копии гена *GW2*, который является негативным регулятором данных признаков; при этом степень возрастания этих показателей определялась дозой мутированных гомеологичных генов (Wang W. et al., 2018). Позднее эти же исследователи смогли изменить размер и вес зерновки пшеницы за счет мутации последовательности другого гена из той же группы – *GW7* – в субгеномах В и D (Wang et al., 2019).

Увеличить такой показатель продуктивности пшеницы, как «число зерен в колосе», удалось за счет редактирования четырех генов-мишеней, *CKX2-1*, *GLW7*, *GW2* и *GW8* (Zhang A. et al., 2019). При этом линия, гомозиготная по крупной делеции в гене *CKX2-1*, показала максимальное увеличение числа зерен в колосе и его плотности, что указывает на то, что данный ген является негативным регулятором признака «число зерен в колосе».

У риса был нокаутирован целый ряд генов – негативных регуляторов признаков урожайности, контролирующих такие показатели, как «число побегов» (*OsAAP3*), «размер метелки» (*OsDEP1*), «вес зерна» (*OsGW5*), «размер зерна» (*OsGS3*, *OsGRF4*) и «число зерен» (*OsGn1a*) (Li M. et al., 2016; Li S. et al., 2016; Liu et al., 2017; Lu et al., 2018). Также на рисе был разработан подход, который за счет интеграции инструментов полногеномного секвенирования, анализа родословных и метода CRISPR/Cas позволяет полномасштабно идентифицировать гены-мишени, контролирующие сложные количественные признаки, включая урожайность (Huang et al., 2018).

На первом этапе в ходе анализа родословных было установлено множество QTL, ассоциированных с уро-

Использование CRISPR/Cas для геномного редактирования у растений

Вид	Ген-мишень	Приобретенный признак	Результат редактирования	Метод трансформации	Литературный источник
Устойчивость к патогенам					
<i>O. sativa</i>	<i>OsSWEET13</i>	Устойчивость к <i>X. oryzae</i> (бактериальный ожог)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhou et al., 2015
<i>O. sativa</i>	<i>elf4G</i>	Устойчивость к вирусу тунгро риса	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Macovei et al., 2018
<i>O. sativa</i>	<i>OsERF922</i>	Устойчивость к <i>Magnaporthe oryzae</i> (пирикулярриоз)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Wang et al., 2016
<i>T. aestivum</i>	<i>MLO</i>	Устойчивость к <i>Blumeria graminis</i> (мучнистая роса)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Wang et al., 2014
<i>T. aestivum</i>	<i>EDR1</i>	Устойчивость к <i>Blumeria graminis</i> (мучнистая роса)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhang et al., 2017
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIJAZ2</i>	Устойчивость к <i>Pseudomonas syringae</i> (бактериальная пятнистость)	Мутация усиления функции	Агробактериальная трансформация	Ortigosa et al., 2018
<i>S. lycopersicum</i>	<i>CP-</i> и <i>Rep-</i> гены	Устойчивость к вирусу скручивания желтых листьев	Интерференция с вирусной ДНК	Агробактериальная трансформация	Tashkandi et al., 2018
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIMlo1</i>	Устойчивость к <i>Oidium neolycopersici</i> (мучнистая роса)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Nekrasov et al., 2017
<i>Vitis vinifera</i>	<i>VvWRKY52</i>	Устойчивость к <i>Botrytis cinerea</i>	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Wang X. et al., 2018
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Gh14-3-3d</i>	Устойчивость к <i>Verticillium dahliae</i> (вертициллезное увядание)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhang Z. et al., 2018
<i>Citrus sinensis</i>	<i>CsLOB1</i>	Устойчивость к <i>Xanthomonas citri</i> (язва цитрусовых)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Jia et al., 2017
<i>Cucumis sativus</i>	<i>elf4E</i>	Широкая устойчивость к вирусам	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Chandrasekaran et al., 2016
Устойчивость к абиотическим факторам					
<i>T. aestivum</i>	<i>TaDREB2, TaDREB3</i>	Устойчивость к засухе	Нокаут	ПЭГ-опосредованная трансформация	Kim D. et al., 2017
<i>Glycine max</i>	<i>Drb2a, Drb2b</i>	Устойчивость к засухе	Нокаут	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> -опосредованная трансформация	Curtin et al., 2018
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIMAPK3</i>	Устойчивость к засухе	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Wang et al., 2017
<i>O. sativa</i>	<i>OsMPK2, OsPDS, OsBADH2</i>	Множественная стрессоустойчивость	Нокаут	Биобаллистика	Shan et al., 2013
<i>O. sativa</i>	<i>SAPK2</i>	Устойчивость к засухе и засолению	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Lou et al., 2017
<i>O. sativa</i>	<i>SAPK1, SAPK2</i>	Солеустойчивость	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Lou et al., 2018
<i>O. sativa</i>	<i>OsNAC14</i>	Устойчивость к засухе	Сверхэкспрессия	Агробактериальная трансформация	Shim et al., 2018
<i>O. sativa</i>	<i>OsRR22</i>	Солеустойчивость	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhang A. et al., 2019
Урожайность					
<i>T. aestivum</i>	<i>TaGW2</i>	Вес зерна	Нокаут	Биобаллистика	Wang W. et al., 2018
<i>T. aestivum</i>	<i>TaGW7</i>	Вес зерна	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Wang et al., 2019
<i>T. aestivum</i>	<i>CKX2-1, GLW7, GW2, GW8</i>	Число зерен	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhang Z. et al., 2019
<i>O. sativa</i>	<i>OsAAP3</i>	Количество побегов	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Lu et al., 2018
<i>O. sativa</i>	<i>OsDEP1, OsGS3, OsGn1a</i>	Размер метелки, размер зерна, число зерен	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Li S. et al., 2016

Окончание таблицы

Вид	Ген-мишень	Приобретенный признак	Результат редактирования	Метод трансформации	Литературный источник
<i>O. sativa</i>	<i>GW5</i>	Вес зерна	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Liu et al., 2017
<i>O. sativa</i>	<i>OsGRF4</i>	Размер зерна	Сверх-экспрессия	Агробактериальная трансформация	Li M. et al., 2016
<i>Zea mays</i>	<i>ARGOS8</i>	Высокий урожай в условиях засухи	Сверх-экспрессия	Биобаллистика	Shi et al., 2017
Питательная ценность					
<i>Zea mays</i>	<i>ZmIPK</i>	Пониженное содержание фитиновой кислоты	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Liang et al., 2014
<i>Zea mays</i>	<i>PPR, RPL</i>	Повышенное содержание лизина и триптофана	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Qi et al., 2016
<i>T. aestivum</i>	<i>α-gliadin</i>	Пониженное содержание глютена (глиадин α)	Нокаут	Биобаллистика	Sánchez-León et al., 2018
<i>T. aestivum</i>	<i>α-gliadin, γ-gliadin</i>	Пониженное содержание глютена (глиадин α, γ)	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Jouanin et al., 2019
<i>O. sativa</i>	<i>Waxy</i>	Пониженное содержание амилозы	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhang J. et al., 2018
<i>O. sativa</i>	<i>SBE1b</i>	Повышенное содержание амилозы	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Sun et al., 2017
<i>S. tuberosum</i>	<i>GBSS</i>	Пониженное содержание амилозы	Нокаут	ПЭГ-опосредованная трансформация	Andersson et al., 2017
<i>Glycine max</i>	<i>FAD2-1A, FAD2-1B</i>	Повышенное содержание олеиновой кислоты	Нокаут	ПЭГ-опосредованная трансформация	Kim H. et al., 2017
<i>Sorghum bicolor</i>	Гены <i>k1C</i>	Высокое содержание лизина и переваривание белка	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Li A. et al., 2018
<i>Brassica napus</i>	<i>FAD2</i>	Повышенное содержание олеиновой кислоты	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Okuzaki et al., 2018
<i>S. lycopersicum</i>	<i>ncRNA1459</i>	Повышенная лежкость плодов	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Li R. et al., 2018
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SGR1, LCY-E, B1c, LCY-B1</i>	Повышенное содержание ликопина	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Li X. et al., 2018
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SIGAD2, SIGAD3</i>	Повышенное содержание γ-аминобутировой кислоты	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Nonaka et al., 2017
<i>Glycine max</i>	<i>GmGOLS1A, GmGOLS1B</i>	Пониженное содержание раффинозы в бобах	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Le et al., 2020
<i>Glycine max</i>	<i>F3H1, F3H2, FNSII-1</i>	Повышенное содержание изофлавоноидных соединений	Нокаут	Агробактериальная трансформация	Zhang P. et al., 2019

жайностью, и проведено их ассоциативное картирование. На основе сопоставления данных QTL-картирования с полной последовательностью генома риса были отобраны гены-кандидаты, а затем осуществлены нокаут каждого из этих генов с помощью CRISPR/Cas и оценка фенотипического эффекта. В результате был отобран целый ряд генов, имеющих решающее значение в контроле признаков урожайности.

Возможность сохранения урожайности в условиях стресса за счет изменения гена *ARGOS8* показана на кукурузе *Zea mays* L. Этот ген является негативным регулятором этиленового ответа. В работе (Shi et al., 2017) с использованием технологии CRISPR/Cas нативный промотор гена *ARGOS8* был заменен на промотор другого гена кукурузы, что обеспечило повышенный уровень экс-

прессии *ARGOS8*. Полевые исследования показали, что растения с отредактированным геном имели более высокий урожай в условиях засухи в сравнении с исходными растениями.

Питательная ценность

Фитиновая кислота содержится в больших количествах в семенах злаковых, бобовых и масличных культур и является антинутриентом, поскольку не переваривается животными с однокамерным желудком и может вызывать загрязнение окружающей среды. С целью снижения содержания этой кислоты в зерновках кукурузы с помощью CRISPR/Cas был нокаутирован ген фермента, катализирующего один из этапов биосинтеза данного соединения, благодаря чему его синтез был блокирован у мутантной

линии (Liang et al., 2014). У того же объекта получены растения с повышенным уровнем незаменимых аминокислот – лизина и триптофана – путем нокаута генов, негативно влияющих на содержание этих аминокислот (Qi et al., 2016).

Изменение содержания и состава глютена в зерновках пшеницы – также актуальная задача ввиду распространения среди людей целиакии, связанной с непереносимостью глютена, запасного белка эндосперма. Некоторые разновидности глютена, α - и γ -глиадины, вызывают патологические реакции у восприимчивых людей. На сегодняшний день имеются две работы, направленные на снижение содержания глиадинов в зерне пшеницы при помощи CRISPR/Cas. Одной из групп исследователей были созданы мутантные линии, демонстрирующие сильное снижение содержания α -глиадина в зерне (Sánchez-León et al., 2018). Другая группа ученых создала линии с низким содержанием α - и γ -глиадина (Jouanin et al., 2019). Полученные линии пшеницы могут служить исходным материалом для создания элитных сортов пшеницы, используемых для производства продуктов с низким содержанием глютена.

Применение метода CRISPR/Cas позволило улучшить пищевые и кулинарные качества риса за счет мутации гена *Waxy*, что привело к изменению соотношения компонентов крахмала амилоза/амилопектин в сторону амилопектина (Zhang J. et al., 2018). Последний определяет восковидные (клейкие) свойства крахмала в зернах риса, которые очень важны для приготовления суши. В другой работе, наоборот, было достигнуто большее содержание амилозы, за счет выключения гена, который отвечает за супрессию синтеза амилозы (Sun et al., 2017).

У картофеля *Solanum tuberosum* L. был нокаутирован ген гранулярной синтазы крахмала (GBSS), нокаутированные линии показали снижение уровня амилозы (Andersson et al., 2017).

Для улучшения качества масла у сои система CRISPR/Cpf1 использована для нокаута генов *FAD2-1B* и *FAD2-1A*, в результате чего были получены высокоурожайные растения сои с повышенным уровнем олеиновой кислоты (Kim H. et al., 2017).

У сорго *Sorghum bicolor* L. ГР было направлено на нокаут генов, ответственных за плохую перевариваемость и супрессию синтеза ценных аминокислот (Li A. et al., 2018).

С помощью CRISPR/Cas получены растения рапса *Brassica napus* L. с высокой концентрацией олеиновой кислоты (Okuzaki et al., 2018), растения томата с повышенной лежкостью плодов (Li R. et al., 2018), а также с повышенным содержанием предшественника витамина А ликопина, ценного вещества плодов с мощным антиоксидантным действием (Li X. et al., 2018). Список работ представлен в таблице.

Доместикация *de novo*

Суть доместикации *de novo* заключается в ускоренном одомашнивании дикого родственника сельскохозяйственной культуры. Дикие родственники культурных растений активно вовлекаются в селекцию в качестве доноров генов устойчивости к различным био- и абиотическим неблагоприятным факторам. Однако простое скрещивание с

«дикарем» ведет к получению «полукультурок», которые часто не сохраняют признаков сорта и теряют многие полезные для человека свойства.

Современные знания о геномах диких и домашних растений выявили так называемые «гены доместикации», мутации в которых превращают дикую форму в пригодную для возделывания.

Идея доместикации *de novo* состоит в направленном внесении нужных мутаций в гены доместикации дикого родича растения. Ускоренная доместикация стала одной из главных новостей науки 2018 г., когда с помощью CRISPR/Cas за одно поколение дикий родственник томата удалось превратить в близкую к культурному виду форму. Предварительно был составлен список генов, которые необходимо модифицировать у дикого томата, чтобы получить его культурный вариант *de novo* (Zsögön et al., 2017).

На основе сравнения последовательностей этих генов у культурного томата и у дикого вида были установлены структурные модификации, которые необходимо внести в гены дикого типа. На заключительном этапе была частично реализована стратегия доместикации *de novo* путем мультиплексного редактирования четырех генов, *SP*, *SP5G*, *SICLV3* и *SIWUS*, контролирующих архитектуру растения (переход к детерминантному типу), время цветения и размер плодов (Li T. et al., 2018).

Другим примером служит работа по изменению морфологии колоса ячменя. Голая зерновка, в отличие от пленчатой, у ячменя является признаком, связанным с одомашниванием. Голозерный ячмень традиционно использовался в пищу и в настоящее время рассматривается как диетический компонент функционального питания. В природе этот переход от пленчатого ячменя к голозерному был обусловлен потерей функции гена *NUD* в результате делеции 17 т. п. н. в соответствующем локусе. С помощью CRISPR/Cas-технологии экспериментально получен голозерный ячмень в результате нокаута *NUD* у пленчатого ячменя (Gerasimova et al., 2020).

Таким образом, подход доместикации *de novo* открывает огромные перспективы для селекции, фактически позволяя получить результат сотен и тысяч лет эволюции за одно поколение.

Заключение

В настоящее время технологии геномного редактирования интенсивно совершенствуются, что даст возможность уже в ближайшем будущем снять многие ограничения на их широкое практическое использование. Развитие происходит в сторону повышения специфичности модификаций, исключения off-target-эффектов путем использования различных типов нуклеаз, в частности ортологов Cas9, взаимодействующих с разными PAM (Fonfara et al., 2014), или же принципиально новых нуклеаз, таких как Cas12a (Zetsche et al., 2015).

Появляются подходы, которые позволяют не ограничиваться только нокаутами генов, но осуществлять другие модификации, такие как замены нуклеотидов и целых последовательностей. Так, были продемонстрированы возможности редактирования одного основания ДНК, а именно замены цитозин/тимин или аденин/гуанин. Такие замены возможны при использовании специфических

ферментов – цитозиндезаминазы и аденозиндезаминазы – в комплексе с никазой (Zong et al., 2017; Li C. et al., 2018).

Разрабатываются методы гомологичной рекомбинации, когда вместе с экспрессирующим вектором в клетку доставляется донорная ДНК, фланкированная последовательностями, гомологичными месту замены эндогенной ДНК на донорную (Jasin, Haber, 2016).

Кроме того, совершенствуются способы трансформации, поскольку классические способы, агробактериальная трансформация и бомбардировка частицами, во многих случаях дают невысокий выход трансформантов. Так, была показана возможность использования модифицированных геномов вирусов для переноса экспрессионных кассет, в частности геминивирусов. Высокая эффективность редактирования при использовании данного подхода продемонстрирована на ряде культур (Baltes et al., 2014; Čermák et al., 2015; Butler et al., 2016).

Наряду с технологическими достижениями развитие биоинформатических подходов, в частности расширение генетических баз данных и методов анализа генных сетей, закладывает фундаментальную основу для мультиплексного ГР с целью модификации сразу нескольких признаков в нужном для человека направлении.

Список литературы / References

- Дудин М.Н. Трансгенные организмы (ГМО) в сельском хозяйстве: объективная необходимость в целях обеспечения глобальной продовольственной безопасности или способ увеличения прибыли ТНК АПК? *Продовольственная политика и безопасность*. 2020;7(2):107-120. DOI 10.18334/ppib.7.2.100666. [Dudin M.N. Transgenic organisms (GMOs) in agriculture: an objective need to ensure global food security or a way to increase the profits of TNCs in agro-industrial complex? *Prodovolstvennaya Politika i Bezopasnost = Food Policy and Security*. 2020;7(2):107-120. DOI 10.18334/ppib.7.2.100666. (in Russian)]
- Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):104-111. DOI 10.18699/VJ17.228. [Zlobin N.E., Ternovoy V.V., Grebenkina N.A., Taranov V.V. Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):104-111. DOI 10.18699/VJ17.228. (in Russian)]
- Рапопорт И.А. Карбонильные соединения и химический механизм мутаций. *Докл. АН СССР*. 1946;54:65-68. [Rapoport I.A. Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutations. *Doklady AN SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1946;54:65-68. (in Russian)]
- Российский солнечный цветок. Краснодар: Совет. Кубань, 2007. [Russian Sun Flower. Krasnodar: Sovetskaya Kuban Publ., 2007. (in Russian)]
- Савицкая Е.Е., Мушарова О.С., Северинов К.В. Разнообразие механизмов CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот и возможности их применения в биотехнологии. *Биохимия*. 2016;81(7):870-880. [Savitskaya E.E., Musharova O.S., Severinov K.V. Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81(7):653-661. DOI 10.1134/S0006297916070026.]
- Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Редактирование генов пшеницы, ячменя и кукурузы с использованием системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):46-55. DOI 10.30901/2658-6266-2020-1-02. [Strygina K.V., Khlestkina E.K. Wheat, barley and maize genes editing using the CRISPR/Cas system. *Biotechnologiya i Seleksiya*

- Rasteniy = Biotechnology and Plant Breeding*. 2020;3(1):46-55. DOI 10.30901/2658-6266-2020-1-02. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования про-ривных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. *Генетика*. 2016;52(7):774-787. DOI 10.7868/S0016675816070055. [Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Russ. J. Genet.* 2016;52(7):676-687. DOI 10.1134/S102279541607005X.]
- Черный И.В. Создание и внедрение в сельскохозяйственное производство Западной Сибири радиационного сорта яровой пшеницы Новосибирская-67. Новосибирск: Институт цитологии и генетики, 1982. [Cherny I.V. Novosibirskaya-67 common wheat radiation variety: creation and introduction into agricultural production in West Siberia. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics, 1982. (in Russian)]
- Ahloowalia B.S., Maluszynski M., Nichterlein K. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*. 2004;135(2):187-204. DOI 10.1023/B:EUPH.0000014914.85465.4f.
- Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P.E. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2017;36(1):117-128. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.-S., Ohlsson P., Gonzalez M.N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plant.* 2018; 164(4):378-384. DOI 10.1111/ppl.12731.
- Bak R.O., Gomez-Ospina N., Porteus M.H. Gene editing on center stage. *Trends Genet.* 2018;34(8):600-611. DOI 10.1016/j.tig.2018.05.004.
- Baltes N.J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P.A., Voytas D.F. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell.* 2014;26(1): 151-163. DOI 10.1105/tpc.113.119792.
- Banerjee S.K., Borden A., Christensen R.B., LeClerc J.E., Lawrence C.W. SOS-dependent replication past a single trans-syn T-T cyclobutane dimer gives a different mutation spectrum and increased error rate compared with replication past this lesion in unduced cell. *J. Bacteriol.* 1990;172(4):2105-2112. DOI 10.1128/jb.172.4.2105-2112.1990.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(15):8774-8778. DOI 10.1073/pnas.96.15.8774.
- Burkhardt P.K., Beyer P., Wünn J., Klöti A., Armstrong G.A., Schledz M., von Lintig J., Potrykus I. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J.* 1997;11(5):1071-1078. DOI 10.1046/j.1365-313x.1997.11051071.x.
- Butler N.M., Baltes N.J., Voytas D.F., Douches D.S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1045. DOI 10.3389/fpls.2016.01045.
- Capecchi M.R. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288-1292. DOI 10.1126/science.2660260.
- Čermák T., Baltes N.J., Čegan R., Zhang Y., Voytas D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* 2015; 16:232. DOI 10.1186/s13059-015-0796-9.
- Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlman M., Sherman A., Arazi T., Gal-On A. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 2016;17(7):1140-1153. DOI 10.1111/mp.12375.
- 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 Biotechnol. J.* 2016;14(1):169-176. DOI 10.1111/pbi.12370.
- Curtin S.J., Xiong Y., Michno J.M., Campbell B.W., Stec A.O., Čermák T., Starker C., Voytas D.F., Eamens A.L., Stupar R.M. CRISPR/Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(6):1125-1137. DOI 10.1111/pbi.12857.
- 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 Physiol.* 2011;156(2):466-473. DOI 10.1104/pp.111.172981.
- 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 Biotechnol. J.* 2013;11(8):933-941. DOI 10.1111/pbi.12085.
- 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 Biotechnol. J.* 2008;6(1):93-102. DOI 10.1111/j.1467-7652.2007.00305.x.
- Dong C., Beetham P., Vincent K., Sharp P. Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep.* 2006;25(5):457-465. DOI 10.1007/s00299-005-0098-x.
- Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K., Makarova K.S., Lécivain A.L., Bzdrenga J., Koonin E.V., Charpentier E. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(4):2577-2590. DOI 10.1093/nar/gkt1074.
- Gaud W.S. The Green Revolution: Accomplishments and Apprehensions. 1968. No. REP-11061. CIMMYT. www.agbioworld.org.
- Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects. Washington (DC): National Academies Press, 2016. DOI 10.17226/23395.
- Gerasimova S., Hertig C., Korotkova A.M., Kolosovskaya E.V., Otto I., Hiekel S., Kochetov A.V., Khlestkina E.K., Kumlehn J. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the *NUD* gene. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1):255. DOI 10.1186/s12870-020-02454-9.
- Guirouilh-Barbat J., Huck S., Bertrand P., Pirzio L., Desmaze C., Sabatier L., Lopez B.S. Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell.* 2004;14(5):611-623. DOI 10.1016/j.molcel.2004.05.008.
- Hall B., Limaye A., Kulkarni A. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2009;19(1):19.12.1-19.12.17. DOI 10.1002/0471143030.cb1912s44.
- Haun W., Coffman A., Clasen B.M., Demorest Z.L., Lowy A., Ray E., Retterath 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 Biotechnol. J.* 2014;12(7):934-940. DOI 10.1111/pbi.12201.
- 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 Rep.* 2016;35(11):2241-2255. DOI 10.1007/s00299-016-2031-x.
- Huang J., Li J., Zhou J., Wang L., Yang S., Hurst L.D., Li W.-H., Tian D. Identifying a large number of high-yield genes in rice by pedigree analysis, whole-genome sequencing, and CRISPR-Cas9 gene knockout. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(32):E7559-E7567. DOI 10.1073/pnas.1806110115.
- Jasin M., Haber J.E. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair.* 2016;44:6-16. DOI 10.1016/j.dnarep.2016.05.001.
- Jia H., Zhang Y., Orbović V., Xu J., White F.F., Jones J.B., Wang N. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15(7):817-823. DOI 10.1111/pbi.12677.
- Jonczyk P., Fijałkowska I., Ciesla Z. Overproduction of the subunit of DNA polymerase III counteracts the SOS-mutagenic response of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85(23):2124-2127. DOI 10.1073/pnas.85.23.9124.
- Jouanin A., Schaart J.G., Boyd L.A., Cockram J., Leigh F.J., Bates R. Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC Plant Biol.* 2019;19:333. DOI 10.1186/s12870-019-1889-5.
- 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 Mol. Biol.* 2016;92(1-2):131-142. DOI 10.1007/s11103-016-0499-y.
- Karthik K., Nandiganti M., Thangaraj A., Singh S., Mishra P., Rathinam M., Sharma M., Singh N.K., Dash P.K., Sreevathsa R. Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to combat weed vagaries: utility of an apical meristem-targeted in planta transformation strategy to introgress a modified *CP4-EPSPS* gene for glyphosate tolerance. *Front. Plant Sci.* 2020;11:768. DOI 10.3389/fpls.2020.00768.
- Khush G.S. Genetically modified crops: the fastest adopted crop technology in the history of modern agriculture. *Agric. Food Secur.* 2012;1:14. DOI 10.1186/2048-7010-1-14.
- Kilian B., Mammen K., Millet E., Sharma R., Graner A., Salamini F., Hammer K., Özkan H. Aegilops. In: Kole C. (Ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Berlin: Springer, 2011; 1-76. DOI 10.1007/978-3-642-14228-4_1.
- Kim D., Alptekin B., Budak H. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Funct. Integr. Genomics.* 2017;18(1):31-41. DOI 10.1007/s10142-017-0572-x.
- Kim H., Kim S.T., Ryu J., Kang B.C., Kim J.S., Kim S.G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat. Commun.* 2017;8:14406. DOI 10.1038/ncomms14406.
- Kochevenko A., Willmitzer L. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol.* 2003;132(1):174-184. DOI 10.1104/pp.102.016857.
- König A., Cockburn A., Crevel R.W., Debruyne E., Grafstroem R., Hammerling U., Kimber I., Knudsen I., Kuiper H.A., Peijnenburg A.A., Penninks A.H., Poulsen M., Schauzu M., Wal J.M. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem. Toxicol.* 2004;42(7):1047-1088. DOI 10.1016/j.fct.2004.02.019.
- Le H., Nguyen N.H., Ta D.T., Le T.N.T., Bui T.P., Le N.T., Bui T.P., Le N.T., Nguyen C.X., Rolletschek H., Stacey G., Stacey M.G., Pham N.B., Do P.T., Chu H.H. CRISPR/Cas9-mediated knockout of galactinol synthase-encoding genes reduces raffinose family oligosaccharide. *Front. Plant Sci.* 2020;11:612942. DOI 10.3389/fpls.2020.612942.
- Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S., Zhang C., Angelovici R., Clemente T.E., Holding D.R. Editing of an alpha-kafrin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiol.* 2018;177(4):1425-1438. DOI 10.1104/pp.18.00200.
- Li C., Zong Y., Wang Y., Jin S., Zhang D., Song Q., Zhang R., Gao C. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol.* 2018;19:59. DOI 10.1186/s13059-018-1443-z.
- Li J., Aach J., Norville J.E., McCormack M., Bush J., Church G.M., Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated plant genome editing via guide RNA/Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(8):688-691. DOI 10.1038/nbt.2654.
- Li M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G., Li H. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.* 2016;7:377. DOI 10.3389/fpls.2016.00377.
- Li R., Fu D., Zhu B., Luo Y., Zhu H. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *lncRNA1459* alters tomato fruit ripening. *Plant J.* 2018;94(3):513-524. DOI 10.1111/tpj.13872.
- Li S., Gao F., Xie K., Zeng X., Cao Y., Zeng J., He Z., Ren Y., Li W., Deng Q., Wang S., Zheng A., Zhu J., Liu H., Wang L., Li P. The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14(11):2134-2146. DOI 10.1111/pbi.12569.

- Li T., Yang X., Yu Y., Si X., Zhai X., Zhang H., Dong W., Gao C., Xu C. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2018;36:1160-1163. DOI 10.1038/nbt.4273.
- Li X., Wang Y., Chen S., Tian H., Fu D., Zhu B., Luo Y., Zhu H. Lycopen is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front. Plant Sci.* 2018;9:559. DOI 10.3389/fpls.2018.00559.
- Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y., Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 2017;8:14261. DOI 10.1038/ncomms14261.
- Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J. Genet. Genomics.* 2014;41(2):63-68. DOI 10.1016/j.jgg.2013.12.001.
- Liu J., Chen J., Zheng X., Wu F., Lin Q., Heng Y., Tian P., Cheng Z., Yu X., Zhou K., Zhang X., Guo X., Wang J., Wang H., Wan J. *GW5* acts in the brassinosteroid signalling pathway to regulate grain width and weight in rice. *Nat. Plants.* 2017;3:17043. DOI 10.1038/nplants.2017.43.
- Liu Q., Segal D.J., Ghiara J.B., Barbas C.F. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94(11):5525-5530. DOI 10.1073/pnas.94.11.5525.
- Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D., Drews G.N. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(6):2232-2237. DOI 10.1073/pnas.0409339102.
- Lou D., Wang H., Liang G., Yu D. OsSAPK2 confers abscisic acid sensitivity and tolerance to drought stress in rice. *Front. Plant Sci.* 2017;8:993. DOI 10.3389/fpls.2017.00993.
- Lou D., Wang H., Yu D. The sucrose non-fermenting-1-related protein kinases SAPK1 and SAPK2 function collaboratively as positive regulators of salt stress tolerance in rice. *BMC Plant Biol.* 2018;18(1):203. DOI 10.1186/s12870-018-1408-0.
- Lu K., Wu B., Wang J., Zhu W., Nie H., Qian J., Huang W., Fang Z. Blocking amino acid transporter OsAAP3 improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(10):1710-1722. DOI 10.1111/pbi.12907.
- Lundmark K. Genetically modified maize. *BioScience.* 2007;57(11):996. DOI 10.1641/B571115.
- Macovei A., Sevilla N.R., Cantos C., Jonson G.B., Slamet-Loedin I., Čermák T., Voytas D.F., Choi I.-R., Chadha-Mohanty P. Novel alleles of rice *eIF4G* generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to *Rice tungro spherical virus*. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16:1918-1927. DOI 10.1111/pbi.12927.
- Malzahn A., Lowder L., Qi Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell Biosci.* 2017;7:21. DOI 10.1186/s13578-017-0148-4.
- Martin-Ortigosa S., Peterson D.J., Valenstein J.S., Lin V.S.-Y., Trewn B.G., Lyznik L.A., Wang K. Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular Cre protein delivery for maize genome editing via *loxP* site excision. *Plant Physiol.* 2014;164(2):537-547. DOI 10.1104/pp.113.233650.
- Marvier M., McCreedy C., Regetz J., Kareiva P. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science.* 2007;316(5830):1475-1477. DOI 10.1126/science.1139208.
- Muller H.J. Artificial transmutation of the gene. *Science.* 1927;66(1699):84-87. DOI 10.1126/science.66.1699.84.
- Nadson G., Philippov G. Influence des rayons X sur la sexualité et la formation des mutants chez les *Champignons inférieurs* (Mucorinees). *Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie.* 1925;93(2):473-475.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(8):691-693. DOI 10.1038/nbt.2655.
- Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci. Rep.* 2017;7:482. DOI 10.1038/s41598-017-00578-x.
- Nonaka S., Arai C., Takayama M., Matsukura C., Ezura H. Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci. Rep.* 2017;7:7057. DOI 10.1038/s41598-017-06400-y.
- Okuzaki A., Ogawa T., Koizuka C., Kaneko K., Inaba M., Imamura J., Koizuka N. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 2018;131:63-69. DOI 10.1016/j.plaphy.2018.04.025.
- Okuzaki A., Toriyama K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep.* 2004;22(7):509-512. DOI 10.1007/s00299-003-0698-2.
- Ortigosa A., Gimenez-Ibanez S., Leonhardt N., Solano R. Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SlJAZ2*. *Plant Biotechnol. J.* 2018;17(3):665-673. DOI 10.1111/pbi.13006.
- 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;241(4):941-951. DOI 10.1007/s00425-014-2224-x.
- Qi W., Zhu T., Tian Z., Li C., Zhang W., Song R. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.* 2016;16:58. DOI 10.1186/s12896-016-0289-2.
- 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 Mol. Biol.* 2003;53(5):715-729. DOI 10.1023/B:PLAN.0000019111.96107.01.
- Sakuraba Y., Sezutsu H., Takahashi K.R., Tsuchihashi K., Ichikawa R., Fujimoto N., Kaneko S., Nakai Y., Uchiyama M., Goda N., Motoi R., Ikeda A., Karashima Y., Inoue M., Kaneda H., Masuya H., Minowa O., Noguchi H., Toyoda A., Sakaki Y., Wakana S., Noda T., Shiroishi T., Gondo Y. Molecular characterization of ENU mouse mutagenesis and archives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;336(2):609-616. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.08.134.
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(4):902-910. DOI 10.1111/pbi.12837.
- Sapehin A.A. Röntgen-Mutationen beim Weizen (*Triticum vulgare*). *Der Züchter.* 1930;2:257-259.
- Schütte G., Eckerstorfer M., Rastelli V., Reichenbecher W., Restrepo-Vassalli S., Ruohonen-Lehto M., Saucy A.-G.W., Mertens M. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environ. Sci. Eur.* 2017;29(1):5. DOI 10.1186/s12302-016-0100-y.
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.-L., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(8):686-688. DOI 10.1038/nbt.2650.
- Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H.R., Archibald R.L., Yang M., Hakimi S.M., Mo H., Habben J.E. *ARGOS8* variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15(2):207-216. DOI 10.1111/pbi.12603.
- Shim J.S., Oh N., Chung P.J., Kim Y.S., Choi Y.D., Kim J.K. Overexpression of *OsNAC14* improves drought tolerance in rice. *Front. Plant Sci.* 2018;9:310. DOI 10.3389/fpls.2018.00310.
- Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., DeKolver R.C., Moehle E.A., Worden S.E., ... Gregory P.D., Urnov F.D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.* 2009;459(7245):437-441. DOI 10.1038/nature07992.
- Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature.* 1985;317(6034):230-234. DOI 10.1038/317230a0.
- Stubbe H. Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller I. *Die Kulturpflanze.* 1957;5:190-220. DOI 10.1007/BF02095495.

- Sun Y., Jiao G., Liu Z., Zhang X., Li J., Guo X., Du W., Du J., Francis F., Zhao Y., Xia L. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.* 2017;8:298. DOI 10.3389/fpls.2017.00298.
- Sur S., Pagliarini R., Bunz F., Rago C., Diaz L.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Papadopoulos N. A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(10):3964-3969. DOI 10.1073/pnas.0813333106.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K., Cigan A.M. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 2016;7:13274. DOI 10.1038/ncomms13274.
- Tan S., Evans R.R., Dahmer M.L., Singh B.K., Shaner D.L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 2005;61(3):246-257. DOI 10.1002/ps.993.
- Tashkandi M., Ali Z., Aljedaani F., Shami A., Mahfouz M.M. Engineering resistance against *Tomato yellow leaf curl virus* via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signal. Behav.* 2018;13(10):e1525996. DOI 10.1080/15592324.2018.1525996.
- Timofeeff-Ressovsky N.W. The effect of X-rays in producing somatic genovariations of a definite locus in different directions in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 1929;63(685):118-124.
- 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;459:442-445. DOI 10.1038/nature07845.
- Wang F., Wang C., Liu P., Lei C., Hao W., Gao Y., Liu Y.-G., Zhao K. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154027. DOI 10.1371/journal.pone.0154027.
- Wang L., Chen L., Li R., Zhao R., Yang M., Sheng J., Shen L. Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated *SIMAPK3* mutagenesis in tomato plants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65(39):8674-8682. DOI 10.1021/acs.jafc.7b02745.
- Wang W., Pan Q., Tian B., He F., Chen Y., Bai G., Akhunova A., Trick H.N., Akhunov E. Gene editing of the wheat homologs of TONNEAU1-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *Plant J.* 2019;100(2):251-264. DOI 10.1111/tbj.14440.
- Wang W., Simmonds J., Pan Q., Davidson D., He F., Battal A., Akhunova A., Trick H.N., Uauy C., Akhunov E. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(11):2463-2475. DOI 10.1007/s00122-018-3166-7.
- Wang X., Tu M., Wang D., Liu J., Li Y., Li Z., Wang Y., Wang X. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(4):844-855. DOI 10.1111/pbi.12832.
- 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;32(9):947-951. DOI 10.1038/nbt.2969.
- Watanabe K., Breier U., Hensel G., Kumlehn J., Schubert I., Reiss B. Stable gene replacement in barley by targeted double-strand break induction. *J. Exp. Bot.* 2015;67(5):1433-1445. DOI 10.1093/jxb/erv537.
- Weising K., Schell J., Kahl G. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.* 1988;22:421-477. DOI 10.1146/annurev.ge.22.120188.002225.
- Woo J.W., Kim J., Kwon S., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.-G., Kim S.-T., Choe S., Kim J.-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 2015;33:1162-1164. DOI 10.1038/nbt.3389.
- Wu K.-M., Lu Y.-H., Feng H.-Q., Jiang Y.-Y., Zhao J.-Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science.* 2008;321(5896):1676-1678. DOI 10.1126/science.1160550.
- Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Markarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759-771. DOI 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- Zhang A., Liu Y., Wang F., Li T., Chen Z., Kong D., Bi J., Zhang F., Luo X., Wang J., Tang J., Yu X., Liu G., Luo L. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene. *Mol. Breed.* 2019;39:47. DOI 10.1007/s11032-019-0954-y.
- Zhang J., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.-K. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. *J. Integr. Plant Biol.* 2018;60(5):369-375. DOI 10.1111/jipb.12620.
- Zhang P., Du H., Wang J., Pu Y., Yang C., Yan R., Yang H., Cheng H., Yu D. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotechnol. J.* 2019;18(6):1384-1395. DOI 10.1111/pbi.13302.
- Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* 2017;91(4):714-724. DOI 10.1111/tbj.13599.
- Zhang Z., Ge X., Luo X., Wang P., Fan Q., Hu G., Xiao J., Li F., Wu J. Simultaneous editing of two copies of *Gh14-3-3d* confers enhanced transgene-clean plant defense against *Verticillium dahliae* in allotetraploid upland cotton. *Front. Plant Sci.* 2018;9:842. DOI 10.3389/fpls.2018.00842.
- Zhang Z., Hua L., Gupta A., Tricoli D., Edwards K.J., Yang B., Li W. Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17(8):1623-1635. DOI 10.1111/pbi.13088.
- Zhou J., Peng Z., Long J., Sosso D., Liu B., Eom J.S., Huang S., Liu S., Cruz C.V., Frommer W.B., White F.F., Yang B. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 2015;82:632-643.
- Zhu T., Mettenberg K., Peterson D.J., Tagliani L., Baszczynski C.L. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 2000;18:555-558. DOI 10.1038/75435.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(15):8768-8773. DOI 10.1073/pnas.96.15.87.
- Zong Y., Wang Y., Li C., Zhang R., Chen K., Ran Y., Qiu J.-L., Wang D., Gao C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(5):438-440. DOI 10.1038/nbt.3811.
- Zsögön A., Cermak T., Voytas D., Peres L.E. Genome editing as a tool to achieve the crop ideotype and *de novo* domestication of wild relatives: Case study in tomato. *Plant Sci.* 2017;256:120-130. DOI 10.1016/j.plantsci.2016.12.012.

ORCID ID

A.B. Shcherban orcid.org/0000-0003-1000-8228

Благодарности. Работа поддержана бюджетным проектом FWNR-2022-0041.**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.07.2022. После доработки 20.09.2022. Принята к публикации 20.09.2022.