

## ОГЛЯДИ

УДК 577.21:575.22:581.6

Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., ст. наук. співроб., гол. наук. співроб.  
СГІ–НЦНС, Одеса  
e-mail: natavolki@ukr.net

### РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМІВ У СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН (МІНІОГЛЯД)

*В постгеномну епоху активно розвиваються методи, що дозволяють маніпулювати з ДНК в геномах, керувати експресією генів та роботою регуляторних елементів. Останніми роками з'явилися найсучасніші методи редагування геномів — системи точного та сайт-специфічного додавання, зміни або видалення генів з використанням сконструйованих нуклеаз («молекулярні ножиці»). Найбільш досконалою є технологія на основі кластеризованих регулярно інтерсперованих коротких паліндромних повторів (англ. clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR), яка успішно протягом чотирьох років з часу її дебюту застосована для редагування клітин людини, рослин, комах, дріжджів і багатьох інших організмів. У мініогляді висвітлені основні технології редагування геномів та наведені приклади їхнього застосування в селекції рослин.*

Ключові слова: редагування геномів, CRISPR, селекція рослин.

**Вступ.** З урахуванням динаміки росту населення та зміни клімату очевидно, що за використання існуючих технологій сільського господарства нагодувати світ не вдасться. Технологія ж нового покоління — редагування геномів дозволяє точно і сайт-специфічно модифікувати геноми і швидко створювати організми з необхідними ознаками. На цей огляд мене надихнула стаття «Як редагування геномів змінить сільське господарство, якщо ми дозволимо це» Devang Mehta, співробітника Швейцарського федерального інституту технологій Цюріха (нім. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich) [1].

За даними Продовольчої та сільськогосподарської Організації Об'єднаних Націй (Food and Agriculture Organization of the United Nations, ФАО) [2], 870 мільйонів людей на даний час хронічно голодують, 2 мільярди недоїдають. Темпи зростання врожайності знизилися після значного внеску зелених революцій 1960-х років для пшениці й рису. Тепер очевидно, що традиційні селекційні технології самі по собі не забезпечать харчуванням більше 9 мільярдів людей у 2050 році. ФАО визнає, що за належного поєднання з іншими технологіями для виробництва продовольства сільськогосподарських продуктів і послуг молекулярно-мар-

кernі технології можуть значно сприяти задоволенню потреб зростаючого і дедалі більш урбанізованого населення Земної кулі.

Глобальна мета селекції рослин — створення нових та удосконалення наявних сортів з підвищеною врожайністю та поліпшеними властивостями. Фундаментальним для цього є існування генетичного різноманіття та мінливості. Фактично без великого набору різних варіантів генетичного матеріалу схрещування рослин у селекційних пошуках взагалі не мало б сенсу, оскільки одержували б одне і те саме.

Значна частка рослин має досить значний відсоток загальної ДНК. Це очевидно, якщо врахувати, скільки базових фізіологічних функцій (від фотосинтезу до розмноження) об'єднують різні види рослин. Однак ті ж самі гени, навіть у межах одного і того ж виду, можуть відрізнитися — від заміни одного нуклеотиду на інший до втрати цілого регіону гена. Мутації призвели до існування різних версій одного і того ж гена — алелів. Різноманіття алелів проявляється по-різному: від виключення гена аж до зміни його продукту. У такому сенсі вся історія сільського господарства — це спроби обрати найбільш ефективні і відкинути менш корисні алелі.

Отримання рослини з правильною комбінацією «корисних» алелів різних генів за традиційних підходів селекціонери здійснюють не дуже ефективно — вивчають великі популяції рослин і схрещують їх до тих пір, поки не отримають рослину з бажаними ознаками. Незважаючи на те, що цей підхід використовується вже понад століття, процес створення нових сортів залишається надто трудомістким і потребує багатьох років напруженої роботи. Отож традиційну селекцію рослин навіть тепер описують у підручниках як «мистецтво і наука». І передусім через те, що кінцевий результат залежить від навичок фахівця з селекції у його доборі рослин з різними властивостями — так зване «око селекціонера» (*англ. breeder eye*).

**Мета** даного огляду: надати інформацію щодо найсучаснішої технології модифікації геному — редагування геному та навести приклади її ефективного застосування в селекції рослин.

Сучасне сільське господарство нагадує зигзагоподібну модель ко-еволюції рослин і фітопатогенів, а саме «гонку озброєнь» між рослиною і патогенами, які її атакують, причому багато з них швидше набувають еволюційних змін, ніж сама рослина. Сільське господарство має нагодувати популяцію людей, що невпинно зростає, впоратися з впливом змін клімату (збільшенням кількості екстремальних природних явищ в ближній перспективі і глобальними змінами клімату у подальшому) та, крім цього, впоратися з швидко змінюваними фітопатогенами. І все це за вимоги сталості даної системи.

Історія селекції рослин — це розвиток від «чорної скриньки» до більш повного розуміння того, що робить рослина і як краще використовувати її унікальні властивості. Наші предки вибирали найкращі плоди і найкрупніше зерно, несвідомо змінюючи при цьому рослини в потрібному на-

прямку. Далі вони зрозуміли, що методом простого добору неможливо отримати принципово нові властивості в організмів, оскільки при доборі маніпулюють тільки тим, що вже існує. Тому для отримання нових сортів рослин почали застосовувати гібридизацію — штучне схрещування організмів з бажаними ознаками. З відкриттям законів спадковості і мінливості та розвитком генетики з'явилася можливість усвідомлено керувати передачею необхідних ознак. І тепер, з недавнім впровадженням *-omics* технологій, ми можемо читати (сиквенування) ДНК рослин, вивчати, як кожен ген відповідає на різні умови середовища (експресія), і прогнозувати, наскільки ефективно рослина може виробляти хімічні речовини, заради яких ми їх і споживаємо.

Слід нагадати, що значна кількість сучасних популярних сільськогосподарських культур є результатом реалізації програм дослідження мутагенезу на початку і в середині ХХ століття; частково це — побічний продукт розвитку ядерних технологій і державної програми США «Atoms for Peace» [3]. Деякі з цих продуктів мутаційної селекції досі широко застосовуються, наприклад, карликова пшениця знаменита завдяки Зеленій Революції, карликовий рис в Каліфорнії (США), резистентний до вірусів кокос у Гані, злаки, які краще осолоджуються, в Європі.

Класичний мутагенез полягає в створенні мутацій в насінні рентген- / гамма-випромінюванням або за дією хімічних мутагенів. Результатом є нові, мутантні алелі. Мутації за такої технології неточні, в геномі відбуваються мільйони мутаційних подій і лише деяка їхня частка потрібна для схрещування. Тому первинні продукти мутагенезу мають пройти селекцію і серію схрещувань з тим, щоб дібрати потенційно корисні алелі і привнести їх у рослину; цей процес довготривалий і може сягати десятків років. Редагування геному є іншою формою мутагенезу та за своєю суттю є зміною (мутацією) у певних регіонах геному, зазвичай у генах. Отже старі методики спираються на випадкові події, в той час як редагування геному точне і цілеспрямоване, що призводить до різкого зменшення часових витрат на шляху «від мутації до посіву».

Редагування геному призначене для точного й сайт-специфічного (замість випадкового) додавання, зміни або видалення генів з використанням сконструйованих нуклеаз («молекулярні ножиці»). До 2013 р. домінуючими були системи цинк-пальцевих нуклеаз (*англ.* zinc-finger nucleases, ZFNs) [4; 5] та транскрипційних активатор-подібних ефекторів нуклеаз (*англ.* transcription activator-like effector nucleases, TALENs) [6]. Прикладами їхнього успішного застосування у рослинництві є створення гербіцидостійкої кукурудзи за системою ZFNs [7], TALENs використано для видалення гена, який надає сприйнятливості до бактеріального захворювання — опіку рису та створення ароматичного рису [8].

Але протягом останніх чотирьох років редагування геномів зробилося широко відомим і знаменитим через відкриття та вдосконалення технології CRISPR/Cas9 — кластеризованих регулярно інтерсперованих

коротких паліндромних повторів (англ. clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated system (Cas9) з *Streptococcus pyogenes*) [9]. Ця технологія зробила редагування геному доступним для більшої частини біологічних лабораторій в усьому світі. До CRISPR було практично неможливо створити мутацію тільки у цільовому гені і зробити це з відносною легкістю.

За чотири роки з часу дебюту CRISPR-технологію застосували для редагування клітин людини, комах, дріжджів і багатьох інших організмів. Дана технологія успішно використовується й у редагуванні геномів рослин [10–12], зокрема й декоративних (наприклад, петунії [13]) і багатьох важливих сільськогосподарських культур — рису [14], сої [15], пшениці [16], сорго, кукурудзи, померанця, томату [17]. Досліджуються можливості редагування геномів культурних рослин для надання їм противірусного імунітету [18; 19].

У перспективі редагування геномів на базі CRISPR можна буде застосовувати для одночасного редагування кожного гена в геномах рослин (або кожного гена певного типу — наприклад, R-генів, що відповідають за стійкість до захворювань), створюючи і/або відкриваючи у такий спосіб корисні алелі, які можна додати в існуючі сорти. Справжня ж вершина редагування геному за CRISPR-технологією полягає в можливості створення різних алелів незалежно від статевого розмноження.

Уявлення Devang Mehta щодо перспектив селекції рослин у тому, що редагування геномів може забезпечити модель «plug-and-play» («підключи і грай»), і селекційний «пайплайн» майбутнього буде схожий на сучасні конвеєри. Взавши дані з 1000 наукових статей та ініціатив (наприклад, таких, як DivSeek), дослідники будуть тестувати різні комбінації алелів у модельних сортах рослин, безпосередньо редагуючи їх геном. Після добору алелів на основі цих результатів вчені зможуть використовувати ці зміни на великій кількості немодельних сортів рослин, провести польові тестування і приступити до виробництва насіння нових сортів. Хоча факторів, що впливають на цей процес, досить багато, найбільший ефект у сільському господарстві дасть зменшення кількості необхідних поколінь для тестування нового сорту, тобто більш швидке створення кінцевого продукту [20].

Виникає питання — чи геноморедатовані рослини є генномодифікованими організмами (ГМО)? Ні. Визначити різницю між відредатованою рослиною та природним варіантом неможливо. Результат редагування геномів не містить ніяких трансгенів та ніяких «слідів» використання методу, яким отримано сорт відредатованої рослини. Редагування проводиться за допомогою біохімічних агентів (РНК і протеїни), які діють більш точно, ніж ультрафіолет або хімічні мутагени. Тобто результати класичного мутагенезу теж можливо розглядати як генетичну модифікацію, але жодна країна не класифікує рослини, отримані в результаті такого мутагенезу, як ГМО.

З точки зору державного регулювання [21; 22] це питання повністю визначає роль і місце даної технології в сільськогосподарському виробництві. Наприкінці статті Devang Mehta пише «Для створення більш сталого сільського господарства треба бути більш відкритими для нових технологій та не зосереджуватися на менш ефективних. Швидше за все, не вдасться зменшити кількість споживаної їжі, але можна підвищити ефективність, з якою ми її виробляємо». Немоżliво не погодитися з цими словами.

**Висновки.** Найсучасніша CRISPR-технологія редагування геномів для створення рослин з необхідними властивостями і ознаками може розв'язати проблему забезпечення продовольством постійно зростаюче населення Землі за умови правильного підходу до регуляторного статусу геноморедатованих культур.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Mehta D. Rewriting our food supply. How genome editing will revolutionise agriculture and secure our future, if we let it [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <https://devang.atavist.com/rewriting-our-food-supply>.
2. Сайт Food and Agriculture Organization of the United Nations [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <http://www.fao.org/>.
3. Сайт International Atomic Energy Agency [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <https://www.iaea.org/>.
4. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger / D. Carroll // *Genetics*. — 2011. — Vol. 188, N 4. — P. 773–782.
5. Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases / Y. Qi, X. Li, Y. Zhang [et al.] // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. — 2013. — Vol. 3, № 10. — P. 1707–1715.
6. Voytas D. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases / D. Voytas // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2013. — Vol. 64. — P. 327–350.
7. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases / V. Shukla, Y. Doyon, J. Miller [et al.] // *Nature*. — 2009. — Vol. 459. — P. 437–441.
8. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology / Q. Shan, Y. Zhang, K. Chen [et al.] // *Plant Biotech. J.* — 2015. — Vol. 13, № 6. — P. 791–800.
9. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara [et al.] // *Science*. — 2012. — Vol. 337. — P. 816–821.
10. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9 / K. Belhaj, A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun [et al.] // *Curr. Opin. Biotech.* — 2015. — Vol. 32. — P. 76–84.
11. The Power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to speed up plant breeding / H. Cao, W. Wang, H. Le [et al.] // *Int. J. Genomics*. — 2016. — Vol. 2016, Article ID 5078796. — 10 p.
12. Ishii T. Consumer acceptance of food crops developed by genome editing / T. Ishii, M. Araki // *Plant Cell Rep.* — 2016. — Vol. 35, № 7. — P. 1507–1518.
13. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in *Petunia* / Z. Bin, Y. Xia, Y. Chunping [et al.] // *Sci. Rep.* — 2016. — Vol. 6. — P. 20315–20320.

14. Generation of artificial drooping leaf mutants by CRISPR-Cas9 technology in rice / T. Ikeda, W. Tanaka, M. Mikami M. [et al.] // *Gen. Genet. Syst.* — 2016. — Vol. 90, № 4. — P. 231–235.
15. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9 / D. Hongyang, Z. Xuanrui, Z. Meng [et al.] // *J. Biotech.* — 2016. — Vol. 217. — P. 90–97.
16. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system / Q. Shan, Y. Wang, J. Li [et al.] // *Nat. Protoc.* — 2014. — Vol. 9. — P. 2395–2410.
17. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening / Y. Ito, A. Nishizawa-Yokoi, M. Endo [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2015. — Vol. 467, № 1. — P. 76–82.
18. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants / Z. Ali, A. Abulfaraj, A. Idris [et al.] // *Gen. Biol.* — 2015. — Vol. 16. — P. 238–245.
19. Engineering plant immunity: Using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance / S. Zaidi, M. Tashkandi, S. Mansoor [et al.] // *Front. Plant Sci.* — 2016. — Vol. 7. — Article 1673.
20. Schiml S. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas / S. Schiml, H. Puchta // *Plant Methods.* — 2016. — Vol. 12 : 8. — 9 p.
21. Voytas D. Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges / D. Voytas, C. Gao // *PLOS Biol.* — 2014. — Vol. 12, № 6. — e1001877.
22. Wolt J. The Regulatory status of genome-edited crops / J. Wolt, K. Wang, B. Yang // *Plant Biotech. J.* — 2016. — Vol. 14. — P. 510–518.

Надійшла 13.12.2016

UDC 577.21:575.22:581.6

**Volkova N. E.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **GENOMIC EDITING IN PLANT BREEDING (MINI REVIEW)**

Information on the modern methods of genomes editing — systems of accurate and site-specific genes addition, changing or deleting by engineered nucleases («molecular scissors») is presented, including technology on basic of clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR). There are examples of their using for the plant breeding tasks.

УДК 577.21:575.22:581.6

**Волкова Н. Э.** Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения

### **РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ (МИНИОБЗОР)**

Представлена информация о самых современных методах редактирования геномов — систем точного и сайт-специфического добавления, изменения или удаления генов с использованием сконструированных нуклеаз («молекулярные ножницы»), в частности технологии на основе кластеризованных регулярно интерсперсированных коротких палиндромных повторов (*англ.* clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR). Приведены примеры их использования для решения задач селекции растений.