

CRISPR/Cas-технологія для поліпшення сільськогосподарських рослин (огляд)

Н. Е. Волкова*, О. О. Захарова

ТОВ «Котекна Україна Лімітед», вул. Люстдорфська дорога, 140-А, м. Одеса, 65114, Україна,
*e-mail: natalia.volkova@cotecna.com

Мета. Проаналізувати сучасний стан поліпшення сільськогосподарських культур за допомогою CRISPR/Cas-технології генетичної модифікації геномів. **Результати.** Наведено історію розвитку технологій редагування генома із сайт-специфічними ендонуклеазами. Проаналізовано сучасний стан створення сортів рослин за допомогою цих технологій. Показано, що технологія редагування генів CRISPR/Cas уже адаптована для 20 видів сільськогосподарських культур для більш ніж 150 генів, пов'язаних із важливими ознаками. Практичне впровадження цієї технології представлено на прикладі рису, для якого спостерігається найбільший прогрес у дослідженнях та використанні CRISPR/Cas-технології: модифіковано найбільшу кількість генів – 78; отримано понад 20 сортів. Редаговано гени рису, що пов'язані з такими ознаками як розмір зерна, озерненість, висота рослини, чоловіча стерильність, накопичення цезію, толерантність до абіотичних та біотичних стресів, стійкість до гербіцидів. Підкреслено можливість мультиплексного редагування потенційно необмеженої кількості генів. Обговорено ситуацію щодо регулювання рослин, створених за технологією редагування генома: за рішенням суду Європейського Союзу (ЄС) на продукцію, отриману за допомогою методик редагування геномів, зокрема сорти рослин, поширюються всі нормативні правила та обмеження ЄС на вирощування і продаж, що й на ГМО, тоді як Міністерство сільського господарства США визначило, що такі рослини, крім рослин-паразитів, не регулюються як ГМО. Надано інформацію про заяву, схвалену провідними вченими, які представляють понад 90 європейських дослідницьких центрів та інститутів з досліджень рослин та біологічних наук, у підтримку технології редагування геномів. **Висновки.** Серед технологій редагування генома CRISPR/Cas-технологія є одним із найпотужніших підходів, який став дуже швидко застосовуватися в селекції рослин завдяки таким перевагам над іншими методами як висока точність і якість, ефективність та технічна гнучкість, відносно низька вартість. Цей доступний метод дає змогу отримувати нетрансгенні рослини із заданими модифікаціями, причому можна одночасно «виробляти» мутації в кількох мішенях.

Ключові слова: генетична модифікація; редагування генома; сайт-специфічні ендонуклеази; нокаут генів.

Вступ

За даними, наведеними в доповіді Продовольчої та сільськогосподарської Організації Об'єднаних Націй (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), проблема голоду у світі дедалі загострюватися, нівелюючи досягнення попередніх років, коли його масштаби неухильно знижувалися [1]. Згідно з оцінками, кількість людей, що зіткнулися з проблемою недоїдання, досягло більш ніж 820 млн осіб (приблизно кожна дев'ята людина у світі).

FAO визначила 17 цілей у галузі сталого розвитку на період до 2030 року (Sustainable

Development Goals) [2]. Вони є новими міжнародними цілями, що змінили Цілі розвитку 01.01.2016 року. Вони будуть визначати національну політику в галузі розвитку в найближчі 15 років. Продовольство і сільське господарство перебувають у центрі уваги, починаючи з ліквідації бідності й голоду до боротьби зі зміною клімату та збереження природних ресурсів. Другою метою є ліквідація голоду, забезпечення продовольчої безпеки, поліпшення харчування і сприяння сталому розвитку сільськогосподарства («ZeroHunger world»).

Оскільки чисельність населення зростає (до 2050 року прогнозується 10 млрд людей), виробництво продуктів харчування, кормів та біопалива має збільшитися на 50%. Екстремальні погодні умови, скорочення доступності сільськогосподарських земель, біотичні й абіотичні стреси лімітують сільське господарство і виробництво продуктів харчування.

Nataliia Volkova

<http://orcid.org/0000-0002-9333-4872>

Olga Zakharova

<https://orcid.org/0000-0003-1828-9044>

Розроблення і впровадження технологій, які сприяють збільшенню врожаю, відіграє важливу роль у вирішенні проблем людства. Трансгенні технології безумовно зробили значний внесок для поліпшення сільськогосподарських культур, але, незважаючи на величезне значення генномодифікованих рослин для забезпечення продовольством, не припиняються обговорення щодо їх безпечності.

Мета огляду – проаналізувати сучасний стан поліпшення сільськогосподарських культур за допомогою CRISPR/Cas-технологій генетичної модифікації геномів.

Результати дослідження

В останнє десятиліття для точних змін у геномах рослин і тварин використовують технології редагування генома із сайт-специфічними ендонуклеазами. Ці нуклеази розпізнають унікальну послідовність та створюють дволанцюгові розриви у цільовій ДНК. Подальше відновлення цілісності ДНК відбувається через клітинні механізми репарації: шляхом негомологічного спаровування кінців або гомологічної рекомбінації, що результується в появу інсерцій/делецій (інделів) та заміщення мутацій у регіоні цільового призначення відповідно [3].

Перше покоління технології редагування генома використовує три типи нуклеаз: мегануклеази, нуклеази із «цинковими пальцями» (zinc finger nucleases, ZFN) та нуклеази, сконструйовані на базі бактеріальних протеїнів – TAL-ефекторів (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) [4]. Процедури з нуклеазами першого покоління трудомісткі та часозатратні.

Друге покоління технології редагування генома пов'язане із CRISPR-системами (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats, короткі паліндромні повтори, розташовані групами, рівномірно віддаленими одна від одної). Перший локус CRISPR виявлений у геномі *Escherichia coli* ще в 1987 році [5]. У 2002 році відкрито гени *cas*-гени локусів CRISPR, що кодують протеїни Cas (CRISPR associated protein, CRISPR-асоційований протеїн) [6]. CRISPR-Cas-системи забезпечують адаптивний імунітет у прокариот. У 2013 році показано, що штучні системи CRISPR-Cas можуть працювати не тільки в клітинах бактерій та *in vitro*, але й у клітинах еукаріот [7]. Сьогодні CRISPR-технології вважаються найважливішим технологічним нововведенням у науках про життя з часів винаходу полімеразної ланцюгової реакції. Системи CRISPR-Cas відрізняються як структурно, так і функціонально. Найпопулярніша

CRISPR-технологія пов'язана з нуклеазою Cas9 і характеризується відносною простотою та високою ефективністю роботи в клітинах [8].

Докладні описи технологій редагування достатньо представлені в наукових статтях [9–13] та більш цікаві для вузьких спеціалістів з молекулярної генетики. Тому увагу в цьому огляді присвячено практичному використанню цих технологій у поліпшенні сільськогосподарських культур (докладніше – на прикладі рису).

Технологія редагування генів CRISPR/Cas уже адаптована майже для 20 видів сільськогосподарських культур для більш ніж 150 генів-мішеней різних ознак [14]. Основний використаний варіант модифікації – нокаут генів, а мішенями – негативні регулятори росту, втрата функціональності яких призводить до підвищення продуктивності рослин, або чинників, що визначають чутливість до патогенів. Інтенсивне використання цього підходу пов'язано, по-перше, із тим, що це найбільш простий і доступний спосіб модифікації, по-друге, з наявністю достатньо різноманітних генів-мішеней, що негативно впливають на господарсько-цінні ознаки. Узагальнені списки культур та модифікованих генів можна знайти в оглядах (наприклад, [15, 16]).

Найбільший прогрес у дослідженнях та використанні CRISPR/Cas-технології спостерігається в рису: модифіковано найбільшу кількість генів – 78; отримано понад 20 генноредагованих сортів. Рис (*Oryza sativa* L.) для більш ніж половини населення Землі є основною сільськогосподарською культурою. Також, завдяки малому розміру генома, це добре вивчена з генетичного погляду культура, яка є модельним об'єктом для однодольних рослин. Технологію CRISPR/Cas використано для редагування генів рису, пов'язаних з агрономічно важливими ознаками, стійкістю до біотичних та абіотичних стресів.

Продуктивність. Одночасно нокаутовано три негативних регулятори генів, пов'язаних із розміром зерна – *GW2*, *GW5*, *TGW6* [17]. Одночасно три нокаутовані гени призводили до значного подовження зерна порівняно з результатом, отриманим у разі нокауту одного або двох генів.

Чотири гени, потенційно пов'язаних із продуктивністю, нокаутовано в рису: негативний регулятор озерненості *Gn1a*; ген *DEP1* (нокаут призводить до формування щільної прямої волоті); негативний регулятор розміру зерна *GSS3*; регулятор архітектури рослини *IPA1* (нокаут призводить до зниження інтенсивності кущення, зменшення кількості непродуктивних пагонів, підвищення озерне-

ності, потовщення й щільність стебла) [18]. Надалі отримано нокаутні генотипи семи сортів рису за *GS3* та подвійні – за *Gn1a* й *GS3*. У нокаутних рослин зареєстровано збільшення зерна та підвищення озерненості. Продуктивність підвищилася (на 3–7%) лише у трьох отриманих варіантів, тоді як у семи знизилася внаслідок зменшення кількості продуктивних пагонів [19].

Висота рослини. Збільшення маси зерна й підвищення озерненості потребує стійкості до вилягання, що забезпечується низькорослістю або міцністю стебла. У рису через нокаут гена *DEP1* знижено висоту рослини [18]. Також низкорослий фенотип отримано внаслідок одонуклеотидної заміни в гені *SLR1* – репресорі відповіді на гіберелін [20].

Контрольована чоловіча стерильність. Для використання в гібридній селекції необхідні форми з контрольованою чоловічою стерильністю. Так, у 11 ліній рису нокаутвано ген *TMS5* – негативний регулятор термочутливої генної чоловічої стерильності та отримано форми, фертильні за оптимальної температури, але повністю стерильні за температури 28 °C, що дасть змогу контролювати процес самозапилення в разі використання цих ліній у гібридній селекції [21]. Від трьох сортів рису отримано лінії, нокаутні за геном *GSA* – негативним регулятором фотоперіод-чутливої генної чоловічої стерильності [22]. В умовах короткого дня у цих ліній досягали стерильності пилку, тоді як за тривалого дня рослини були фертильні.

Толерантність до абіотичних стресів. Модифіковано три гени рису *OsPDS*, *OsBADH2*, *OsMPK*, що кодують ензими, – фітоїндесатуразу, бетаїнальдегіддегідрогеназу та мітоген-активовану протеїнкіназу, які беруть участь у контрольованих відповідях на різні абіотичні стреси [23–25]. Анексини рослин відіграють значну роль у їх розвитку й захисті від стресів довкілля. Вивчено роль гена анексину *OsAnn3* під дією холодового стресу [26]. Установлено, що виживання *CRPISR-T₁*-мутантних ліній зменшується порівняно з рослинами дикого типу за холодової обробки.

Стійкість до гербіцидів. Одонуклеотидні заміни в гені *ALS*, що кодує ацетолактатсинтазу, призвели до підвищення стійкості до гербіциду хлорсульфурону [27]. Виконано модифікацію гена *C287*, що відповідає за стійкість до гербіцидів [28].

Накопичення цезію. Поява радіоактивного цезію в їжі після ядерних аварій викликає занепокоєння з погляду загрози для здоров'я людини. Незважаючи на присутність за низьких концентрацій (нижче мкм) у заб-

руднених ґрунтах, цезій може засвоюватися сільськогосподарськими культурами і транспортуватися до їх їстівних частин. Така здатність рослини поглинати цезій навіть за низьких концентрацій значно вплинула на виробництво рису у Японії після аварії на Першій Фукусімській атомній електростанції у 2011 році. На практиці було впроваджено декілька стратегій зменшення вмісту цезію в рисі, таких як видалення забрудненого ґрунту або адаптація методів ведення сільського господарства, включно зі спеціальним управлінням мінеральними добривами, що мають обмежений вплив або шкідливі побічні ефекти. З іншого боку, розвиток біотехнологічних підходів, спрямованих на зниження накопичення цезію в рисі, залишався складним завданням. За допомогою CRISPR-Cas-редагування щодо інактивації гена калієвого транспортеру *OsHAK1* різко знизили поглинання цезію рослинами рису [29]. В експерименті з ґрунтом, дуже забрудненим ¹³⁷Cs+, рослини із заблокованим функціонуванням *OsHAK1* демонстрували значне зниження рівнів ¹³⁷Cs+ у коренях та пагонах. Ці результати демонструють можливість виробництва безпечної їжі в регіонах, забруднених унаслідок ядерних аварій.

Толерантність до дефіциту калію. Пероксидоксини (Prxs) захищають клітини від різних пероксидів, відіграють важливу роль у підтриманні окисно-відновного гомеостазу, беруть участь у передачі внутрішньоклітинних і міжклітинних сигналів. З використанням CRISPR/Cas9-технології досліджено ген *OsPRX2* рису для характеристики дії 2-Cys Prxs на толерантність до дефіциту K+ [30]. Надекспресія *OsPRX2* зумовлює закриття продихів та збільшення толерантності до дефіциту K+, тоді як нокаут *OsPRX2* призводить до серйозних дефектів фенотипу листя та отвору продихів у разі дефіциту K+. Виявлення накопичення K+, антиоксидантної активності трансгенних рослин за дефіциту K+ підтвердило, що *OsPRX2* є потенційною мішенню для створення рослин з підвищеною толерантністю до дефіциту калію.

Засвоєння азоту. Одонуклеотидна заміна в гені *NRT1.1B*, що кодує транспортер азоту, дала змогу підвищити ефективність засвоєння азоту [20].

Толерантність до біотичних стресів. Мутація в етилен-залежному транскрипційному факторі *OsERF922* призвела до підвищення стійкості проти основного захворювання рису – пірикуляріозу, збудником якого є гриб *Magnaporthe oryzae* [31]. Мішенями для CRISPR/Cas-направленого нокауту є гени,

що зумовлюють чутливість до захворювання. Розроблено два нокаутних мутанти за геном *OsSWEET13* сприйнятливості до бактеріального опіку, що викликаний *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [32]. Це призвело до підвищення стійкості в рисі *indica* IR24. Унаслідок нокауту гена *ERF922* отримано форми, стійкі проти пірикуляріозу [33].

Редагування локусів кількісної ознаки. Слід зазначити, що такі важливі ознаки як врожайність та толерантність до абіотичних стресів, контрольовані двома або більше генами. Численні дослідження спрямовані на картування локусів кількісної ознаки (quantitative trait loci, QTL), що контролюють ці агрономічно важливі ознаки. Такі ідентифіковані регіони QTL почали впроваджувати в елітні лінії для розроблення ефективніших сортів. Проте така інтрогресія є непринятною, якщо QTL тісно пов'язані з нецільовими регіонами, введення яких в елітну лінію може призвести до шкідливих наслідків. CRISPR/Cas-технологія є потужним інструментом для вивчення рідкісних мутацій у таких випадках. Так, функціонування QTL, пов'язаних із розміром (*GS3*) та кількістю (*Gn1a*) зерен у сортах рису, дослідили за допомогою підходу QTL-редагування на основі CRISPR [19]. Виявлено, що однакові QTL можуть мати дуже різноманітні та протилежні ефекти на різних генетичних фонах.

Мультиплексне редагування генів. Технологія CRISPR/Cas також дає можливість мультиплексного редагування потенційно необмеженої кількості генів [34, 35]. Це продемонстровано успішним редагуванням одночасно восьми агрономічно важливих генів рису: *BADH2* (betaine aldehyde dehydrogenase 2, бетаїнальдегіддегідрогеназа 2), *DEP1* (dense and erect panicle 1, щільна та пряма волоть), *Gn1a* (grain number, кількість зерен), *GS3* (довжина і маса зерна), *GW2* (ширина та маса зерна), *Hd1* (heading date 1), *EP3* (пряма волоть), *LPA1* (loose plant architecture 1) [26]. П'ять із цих генів (*DEP1*, *EP3*, *Gn1a*, *GS3*, *GW2*) пов'язані з урожаєм зерна, ген *BADH2* – з ароматом, ген *Hd1* – із фотоперіодом, а ген *LPA1* регулює архітектуру рослини. За допомогою єдиної генетичної трансформації не тільки отримано рослини, що містять мутації у восьми генах, але й створено мутанти з різними комбінаціями генів. Крім того, одержано як гомозиготні, так і гетерозиготні генотипи за вісьмома генами.

Отже, методи редагування генома вже стали потужним інструментом селекції рослин. Оскільки створення різноманіття для добору є одним із головних напрямів селекції, муль-

типлексне редагування потенційно необмеженої кількості генів за технологією CRISPR/Cas надало стратегію швидкого отримання генетичної різноманітності в процесі селекції.

Ще однією вагомою перевагою CRISPR/Cas-технології є відносно невисока вартість. Так, якщо розроблення й просування ГМ-продукту може коштувати до \$ 150 млн, то використання CRISPR/Cas обходиться на 90 % дешевше.

Щодо регулювання генноредагованих рослин. Національна академія наук США назвала редагування геномів найважливішим проривом, який дасть змогу прогнати щораз більше населення планети в умовах кліматичних змін.

За рішенням Міністерства сільського господарства США генноредаговані рослини (за винятком рослин-паразитів), «які в іншому випадку могли б бути розроблені за допомогою традиційних технологій культивування», та відповідні продукти харчування не регулюються як ГМО [36]. У США завдяки м'якому регулюванню вже розроблено сорти понад 20 видів рослин із відредагованими геномами, а перші продукти, вироблені з таких рослин, з'являться в американських магазинах уже у 2019 році (зокрема, заправки для салатів і батончики граноли).

Водночас, суд ЄС постановив (25.07.2018 р.), що на продукцію, яка отримана за допомогою методик редагування геномів CRISPR/Cas, зокрема сорти рослин, поширюються всі наявні нормативні правила та обмеження ЄС на вирощування і продаж, що й на генетично модифіковані організми: вони підлягають перевірці, а продукти харчування – маркуванню [37].

Історія питання така. У 2016 році уряд Франції після запиту коаліції екологічних організацій звернувся до суду ЄС визначити правовий статус живих організмів, створених за допомогою точкового редагування генома (зокрема, технологією CRISPR/Cas). Наукове співтовариство сподівалося, що, оскільки ці методи не використовують цілі гени з інших організмів, суд не прирівняє їх до генетичної модифікації. Але ж тепер за рішенням вищої судової інстанції ЄС на організми, модифіковані за допомогою CRISPR/Cas та інших подібних технологій, буде поширюватися директива ЄС 2001 року, що встановлює жорсткі обмеження з безпеки і попереднього схвалення регуляторними органами для ГМ-продуктів [38].

ЕуропаВіо, галузева асоціація європейських біотехнологічних компаній, через свого представника назвала рішення суду кроком назад і додала, що мільярди євро, вкладені держава-

ми і бізнесом в CRISPR-технології в сільському господарстві, тепер не зможуть принести практичні результати для європейських фермерів.

Журнал Nature, покликаючись на опитаних експертів, зазначає, що CRISPR-дослідження у Євросоюзі триватимуть, однак інтерес бізнесу і грантодавців до розроблення таких продуктів значно знизиться через фактичну відсутність у них короткострокових комерційних перспектив [39]. Журнал Science додає, що отримання всіх потрібних дозволів на роботу з ГМ рослинами обходиться в ЄС у середньому в 35 млн доларів, що зробить розроблення CRISPR-сортів занадто дорогим для невеликих компаній і дослідницьких організацій [40]. Унаслідок такого рішення низка європейських компаній уже переносять свої наукові розробки за межі ЄС, у більш вигідні юрисдикції, зокрема у Японію і США, де методи редагування генома не підпадають під правила регулювання ГМО.

У Фламандському інституті біотехнології (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) (Бельгія) ініційовано публікацію документу із закликом до європейських політиків терміново захистити технологію редагування геномів [41]. Учені глибоко стурбовані тим, що рішення суду ЄС позбавляє їх незамінного інструменту для інноваційного рослинництва, а європейських фермерів – нових культур, багатих поживними речовинами і сумісних зі зміною клімату. Та й усе інше суспільство потребує прогресивного рослинництва, з урахуванням поточних економічних і соціальних проблем. Вирок суду Європейського союзу не відповідає сучасному науковому прогресу, вважають учені. Сьогодні ця заява схвалена провідними вченими, які представляють понад 90 європейських дослідницьких центрів та інститутів з досліджень рослин та біологічних наук, а нові підписанти постійно додають свої імена до цього списку. Така обмежувальна регламентація інноваційних методів селекції рослин матиме неприйнятні наслідки для Європи та значно послаблює виробництво сільськогосподарської продукції у Європі.

Рішуча підтримка європейськими дослідницькими інститутами цього позиційного документа є доказом твердого консенсусу серед академічної спільноти наук про життя та підтвердженням, що ми повинні діяти для захисту інноваційних технологій у Європі для більш сталого сільського господарства та виробництва продуктів харчування.

Висновки

CRISPR/Cas-технологія редагування генома є одним із найпотужніших підходів ло-

кус-специфічних генетичних модифікацій, який став дуже швидко застосовуватися в селекції рослин завдяки таким перевагам над іншими методами як висока точність та якість, ефективність і технічна гнучкість. Цей доступний метод дає змогу отримувати нетрансгенні рослини із заданими модифікаціями, причому можна одночасно «виробляти» мутації в кількох мішенях. Уже описано CRISPR/Cas-модифікації для 20 видів сільськогосподарських культур для більш ніж 150 генів різних ознак.

Використана література

1. The State of food security and nutrition in the world 2018. Building climate resilience for food security and nutrition / FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. Rome : FAO, 2018. 202 p.
2. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. URL: http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E
3. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012. Vol. 337, Iss. 6096. P. 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
4. Govindan G., Ramalingam S. Programmable site-specific nucleases for targeted genome engineering in higher eukaryotes. *J. Cell. Physiol.* 2016. Vol. 231, Iss. 11. P. 2380–2392. doi: 10.1002/jcp.25367
5. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K. et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987. Vol. 169, Iss. 12. P. 5429–5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
6. Jansen R., Embden J., Gastra W., Schouls L. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 43, Iss. 6. P. 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
7. Sontheimer E., Barrangou R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. *Hum. Gene Ther.* 2015. Vol. 26, Iss. 7. P. 413–424. doi: 10.1089/hum.2015.091
8. Liu X., Wu S., Xu J. et al. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharm. Sinica B*. 2017. Vol. 7, Iss. 3. P. 292–302. doi: 10.1016/j.apsb.2017.01.002
9. Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci.* 2017. Vol. 8: 1932. doi: 10.3389/fpls.2017.01932
10. Langner T., Kamoun S., Belhaj K. CRISPR crops: plant genome editing toward disease resistance. *Ann. Review Phytopathol.* 2018. Vol. 56. P. 479–512. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-050158
11. CRISPR. Methods and Protocols / M. Lundgren, E. Charpentier, P. Fineran (eds). New York, USA : Humana Press, 2015. doi: 10.1007/978-1-4939-2687-9
12. Jung C., Capistrano-Gossmann G., Braatz J. et al. Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breed.* 2018. Vol. 137, Iss. 1. P. 1–9. doi: 10.1111/pbr.12526
13. Osakabe Y., Watanabe T., Sugano S. et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6: 26685. doi: 10.1038/srep26685
14. Riccio A., Clairand P., Harwood W. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg. Top. Life Sci.* 2017. Vol. 1, Iss. 2. P. 169–182. doi: 10.1042/ETLS20170085
15. Короткова А. М., Герасимова С. В., Шумный В. К., Хлесткина Е. К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas. *Вавиловский журнал генети-*

- ки и селекции. 2017. Т. 21, № 2. С. 250–258. doi: 10.18699/VJ17.244
16. Jaganathan D., Ramasamy K., Sellamuthu G. et al. CRISPR for crop improvement: an update review. *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9: 985. doi: 10.3389/fpls.2018.00985
 17. Xu R., Yang Y., Qin R. et al. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genomics.* 2016. Vol. 43, Iss. 4. P. 529–532. doi: 10.1016/j.jgg.2016.07.003
 18. Li M., Li X., Zhou Z. et al. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.* 2016. Vol. 7: 377. doi: 10.3389/fpls.2016.0037
 19. Shen L., Wang C., Fu Y. et al. QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *J. Integr. Plant Biol.* 2018. Vol. 60, Iss. 2. P. 89–93. doi: 10.1111/jipb.12501
 20. Lu Y., Zhu J. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.* 2017. Vol. 10, Iss. 3. P. 523–525. doi: 10.1016/j.molp.2016.11.013
 21. Zhou H., He M., Li J. et al. Development of commercial thermosensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6: 37395. doi: 10.1038/srep37395
 22. Li Q., Zhang D., Chen M. et al. Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. *J. Genet. Genomics.* 2016. Vol. 43, Iss. 6. P. 415–419. doi: 10.1016/j.jgg.2016.04.011
 23. Shan Q., Wang Y., Li J. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31, Iss. 8. P. 686–688. doi: 10.1038/nbt.2650
 24. Li J., Sun Y., Du J. et al. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.* 2017. Vol. 10, Iss. 3. P. 526–529. doi: 10.1016/j.molp.2016.12.001
 25. Xie K., Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant.* 2013. Vol. 6, Iss. 6. P. 1975–1983. doi: 10.1093/mp/sst119
 26. Shen L., Hua Y., Fu Y. et al. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci. China Life Sci.* 2017. Vol. 60, Iss. 5. P. 506–515. doi: 10.1007/s11427-017-9008-8
 27. Sun Y., Zhang X., Wu C. et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant.* 2016. Vol. 9, Iss. 4. P. 628–631. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.001
 28. Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M. et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 2017. Vol. 35, Iss. 5. P. 441–443. doi: 10.1038/nbt.3833
 29. Nieves-Cordones M., Mohamed S., Tanoi K. et al. Production of low-Cs+ rice plants by inactivation of the K+ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *Plant J.* 2017. Vol. 92, Iss. 1. P. 43–56. doi: 10.1111/tpj.13632
 30. Mao X., Zheng Y., Xiao K. et al. OsPRX2 contributes to stomatal closure and improves potassium deficiency tolerance in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. Vol. 495, Iss. 1. P. 461–467. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.045
 31. Liu D., Chen X., Liu J. et al. The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 2012. Vol. 63, Iss. 10. P. 3899–3911. doi: 10.1093/jxb/ers079
 32. Zhou J., Peng Z., Long J. et al. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 2015. Vol. 82, Iss. 4. P. 632–643. doi: 10.1111/tpj.12838
 33. Wang F., Wang C., Liu P. et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLoS ONE.* 2016. Vol. 11, Iss. 4: e0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027
 34. Lowder L., Zhang D., Baltes N. et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol.* 2015. Vol. 169, Iss. 2. P. 971–985. doi: 10.1104/pp.15.00636
 35. Zhang Z., Mao Y., Ha S. et al. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 2016. Vol. 35, Iss. 7. P. 1519–1533. doi: 10.1007/s00299-015-1900-z
 36. Secretary Perdue Issues USDA Statement on Plant Breeding Innovation. Press Release No 0070.18. URL: <https://www.usda.gov/media/press-releases/2018/03/28/secretary-perdue-issues-usda-statement-plant-breeding-innovation>
 37. Organisms obtained by mutagenesis are GMOs and are, in principle, subject to the obligations laid down by the GMO Directive / Court of Justice of the European Union. Press release No 111/18. URL: <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>
 38. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. URL: https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0004.02/DOC_1&format=PDF
 39. Wight A. Strict EU ruling on gene-edited crops squeezes science. *Nature.* 2018. Vol. 56, Iss. 7729. P. 15–16. doi: 10.1038/d41586-018-07166-7
 40. Kupferschmidt K. EU verdict on CRISPR crops dismays scientists. *Science.* 2018. Vol. 361, Iss. 6401. P. 435–436. doi: 10.1126/science.361.6401.435
 41. Regulating genome edited organisms as GMOs has negative consequences for agriculture, society and economy. URL: https://www.cnb.csic.es/images/temporal/Position_paper_on_the_ECJ_ruling_on_CRISPR_22_Oct_2018.pdf

References

1. FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2018). *The State of food security and nutrition in the world 2018. Building climate resilience for food security and nutrition*. Rome: FAO.
2. *Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development*. (2015). Retrieved from http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E
3. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
4. Govindan, G., & Ramalingam, S. (2016). Programmable site-specific nucleases for targeted genome engineering in higher eukaryotes. *J. Cell. Physiol.*, 231(11), 2380–2392. doi: 10.1002/jcp.25367
5. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the IAP gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, 169(12), 5429–5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
6. Jansen, R., Embden, J., Gaastera, W., & Schouls, L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, 43(6), 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
7. Sontheimer, E., & Barrangou, R. (2015). The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. *Hum. Gene Ther.*, 26(7), 413–424. doi: 10.1089/hum.2015.091
8. Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharm. Sin. B.*, 7(3), 292–302. doi: 10.1016/j.apsb.2017.01.002
9. Arora, L., & Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci.*, 8, 1932. doi: 10.3389/fpls.2017.01932
10. Langner, T., Kamoun, S., & Belhaj, K. (2018). CRISPR crops: plant genome editing toward disease resistance. *Ann. Review Phytopathol.*, 56, 479–512. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-050158

11. Lundgren, M., Charpentier, E., & Fineran, P. (Eds.). (2015). *CRISPR. Methods and Protocols*. New York, USA: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-4939-2687-9
12. Jung, C., Capistrano-Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N., & Melzer, S. (2018). Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breed.*, 137(1), 1–9. doi: 10.1111/pbr.12526
13. Osakabe, Y., Watanabe, T., Sugano, S., Ueta, R., Ishihara, R., Shinozaki, K., & Osakabe, K. (2016). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci. Rep.*, 6, 26685. doi: 10.1038/srep26685
14. Riccroch, A., Clairand, P., & Harwood, W. (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg. Top. Life Sci.*, 1(2), 169–182. doi: 10.1042/ETLS20170085
15. Korotkova, A. M., Gerasimova, S. V., Shumny, V. K., & Khlestkina, E. K. (2017). Crop genes modified using CRISPR/Cas system. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 21(2), 250–258. doi: 10.18699/VJ17.244
16. Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., & Venkataraman, G. (2018). CRISPR for crop improvement: an update review. *Front. Plant Sci.*, 9, 985. doi: 10.3389/fpls.2018.00985
17. Xu, R., Yang, Y., Qin, R., Li, H., Qiu, C., Li, L., ... Yang, J. (2016). Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genomics.*, 43(8), 529–532. doi: 10.1016/j.jgg.2016.07.003
18. Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., ... Li, H. (2016). Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.*, 7, 377. doi: 10.3389/fpls.2016.0037
19. Shen, L., Wang, C., Fu, Y., Wang, J., Liu, Q., Zhang, X., ... Wang, K. (2018). QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *J. Integr. Plant Biol.*, 60(2), 89–93. doi: 10.1111/jipb.12501
20. Lu, Y., & Zhu, J. (2017). Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.*, 10(3), 523–525. doi: 10.1016/j.molp.2016.11.013
21. Zhou, H., He, M., Li, J., Chen, L., Huang, Z., Zheng, S., ... Zhuang, C. (2016). Development of commercial thermosensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Sci. Rep.*, 6, 37395. doi: 10.1038/srep37395
22. Li, Q., Zhang, D., Chen, M., Liang, W., Wei, J., Qi, Y., & Yuan, Z. (2016). Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. *J. Genet. Genomics.*, 43(6), 415–419. doi: 10.1016/j.jgg.2016.04.011
23. Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., ... Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.*, 31(8), 686–688. doi: 10.1038/nbt.2650
24. Li, J., Sun, Y., Du, J., Zhao, Y., & Xia, L. (2017). Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.*, 10(3), 526–529. doi: 10.1016/j.molp.2016.12.001
25. Xie, K., & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant.*, 6(6), 1975–1983. doi: 10.1093/mp/sst119
26. Shen, L., Hua, Y., Fu, Y., Li, J., Liu, Q., Jiao, X., ... Wang, K. (2017). Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci. China Life Sci.*, 60(5), 506–515. doi: 10.1007/s11427-017-9008-8
27. Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., ... Xia, L. (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant.*, 9(4), 628–631. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.001
28. Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., ... Kondo, A. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.*, 35(5), 441–443. doi: 10.1038/nbt.3833
29. Nieves-Cordones, M., Mohamed, S., Tanoi, K., Kobayashi, N., Takagi, K., Vernet, A., ... Véry, A. (2017). Production of low-Cs+ rice plants by inactivation of the K+ transporter OSHAK1 with the CRISPR-Cas system. *Plant J.*, 92(1), 43–56. doi: 10.1111/tpj.13632
30. Mao, X., Zheng, Y., Xiao, K., Wei, Y., Zhu, Y., Cai, Q., ... Zhang, J. (2018). OsPRX2 contributes to stomatal closure and improves potassium deficiency tolerance in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495(1), 461–467. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.045
31. Liu, D., Chen, X., Liu, J., Ye, J., & Guo, Z. (2012). The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *J. Exp. Bot.*, 63(10), 3899–3912. doi: 10.1093/jxb/ers079
32. Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B., Eom, J., ... Yang, B. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.*, 82(4), 632–643. doi: 10.1111/tpj.12838
33. Wang, F., Wang, C., Liu, P., Zhang, Q., Li, L., Zhong, C., ... Zhao, K. (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLoS ONE.*, 11(4), e0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027
34. Lowder, L., Zhang, D., Baltus, N., Paul, J., Tang, X., Zheng, X., ... Qi, Y. (2015). A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol.*, 169(2), 971–985. doi: 10.1104/pp.15.00636
35. Zhang, Z., Mao, Y., Ha, S., Liu, W., Botella, J., & Zhu, J. (2016). A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*, 35(7), 1519–1533. doi: 10.1007/s00299-015-1900-z
36. Secretary Perdue Issues USDA Statement on Plant Breeding Innovation. Press Release No 0070.18. (2018). Retrieved from <https://www.usda.gov/media/press-releases/2018/03/28/secretary-perdue-issues-usda-statement-plant-breeding-innovation>
37. Court of Justice of the European Union. (2018). *Organisms obtained by mutagenesis are GMOs and are, in principle, subject to the obligations laid down by the GMO Directive*. Press release No 111/18. Retrieved from <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>
38. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. L 106/2 EN. Retrieved from https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0004.02/DOC_1&format=PDF
39. Wight, A. (2018). Strict EU ruling on gene-edited crops squeezes science. *Nature*, 56(7729), 15–16. doi: 10.1038/d41586-018-07166-7
40. Kupferschmidt, K. (2018). EU verdict on CRISPR crops dismays scientists. *Science*, 361(6401), 435–436. doi: 10.1126/science.361.6401.435
41. *Regulating genome edited organisms as GMOs has negative consequences for agriculture, society and economy* (2018). Retrieved from https://www.cnb.csic.es/images/temporal/Position_paper_on_the_ECJ_ruling_on_CRISPR_22_Oct_2018.pdf

УДК 577.21:575.22:581.6

Волкова Н. Э.*, **Захарова О. А.** CRISPR/Cas-технология для улучшения сельскохозяйственных растений (обзор) // *Plant Varieties Studying and Protection*. 2019. Т. 15, № 1. С. 24–31. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.1.2019.162478>

ООО «Котекна Украина Лимитед», ул. Люстдорфская дорога, 140-А, г. Одесса, 65114, Украина, *e-mail: natalia.volkova@cotecna.com

Цель. Проанализировать современное состояние улучшения сельскохозяйственных культур с помощью CRISPR/Cas-технологии генетической модификации геномов. **Результаты.** Представлена история развития технологий изменения генома с сайт-специфическими эндонуклеазами. Проанализировано современное состояние создания генноотредактированных растений. Показано, что технология изменения генов CRISPR/Cas уже адаптирована для 20 видов сельскохозяйственных культур для более 150 генов различных признаков. Практическое внедрение данной технологии дано на примере риса, для которого наблюдается наибольший прогресс в исследованиях и использовании CRISPR/Cas-технологии: модифицировано наибольшее число генов – 78; получено более 20 генноотредактированных сортов. Отредактированы гены риса, связанные с такими признаками, как размер зерна, озерненность, высота растения, мужская стерильность, накопление цезия, толерантность к абиотическим и биотическим стрессам, устойчивость к гербицидам. Подчеркнута возможность мультиплексного редактирования потенциально неограниченного числа генов. Представлена информация по регулированию растений, созданных по технологии редактирования генома: по решению суда Европейского

Союза (ЕС) на продукцию, полученную с помощью методик редактирования геномов, в частности, сорта растений, распространяются все нормативные правила и ограничения ЕС на выращивание и продажу, что и на ГМО, тогда как решением Министерства сельского хозяйства США такие растения, кроме растений-паразитов, не регулируются как ГМО. Приведена информация о заявлении, подписанном ведущими учеными, представляющими более 90 европейских исследовательских центров и институтов по исследованиям растений и биологических наук, в поддержку технологии редактирования геномов. **Выводы.** Среди технологий редактирования генома CRISPR/Cas-технология является одним из самых мощных подходов, который стал очень быстро применяться в селекции растений благодаря таким преимуществам перед другими методами, как высокая точность и качество, эффективность и техническая гибкость, относительно низкая стоимость. Этот доступный метод позволяет получать нетрансгенные растения с заданными модификациями, причем можно одновременно «производить» мутации в нескольких мишенях.

Ключевые слова: генетическая модификация; редактирование генома; сайт-специфические эндонуклеазы; нокаут генов.

UDC 577.21: 575.22: 581.6

Volkova, N. E.*, & **Zakharova, O. A.** (2019). CRISPR/Cas-technology for crop improvement (review). *Plant Varieties Studying and Protection*, 15(1), 24–31. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.1.2019.162478>

LLC "Cotecna Ukraine Limited", 140-A Lustdorfskaya Doroga St., Odesa, 65114, Ukraine, *e-mail: natalia.volkova@cotecna.com

Purpose. To analyze the current state of crop improvement by CRISPR/Cas-technology of genomes genetic modification. **Results.** The history of the development of genome change technologies with site-specific endonucleases is presented. The current state of genetically edited plants creation is analyzed. The CRISPR/Cas-technology for genes editing has already been adapted for 20 crops for more than 150 target genes of various traits. The practical implementation of this technology is given on the example of rice, for which the greatest progress in the research and use of CRISPR/Cas-technology is observed: the largest number of genes has been modified – 78; more than 20 genetically edited varieties were obtained. Edited rice genes associated with features such as grain size, plant height, male sterility, cesium accumulation, tolerance to abiotic and biotic stresses, resistance to herbicides. The possibility of multiplex editing of a potentially unlimited number of genes is underlined. Information on regulation of genome editing technology created plant: according to the EU court

decision, all the regulatory rules and EU restrictions on cultivation and sale that apply to GMOs apply to the products obtained using genome editing techniques, in particular, to as the resolution of the US Department of Agriculture, such plants, except for parasitic plants, are not regulated as GMOs. Information was provided on a statement signed by leading scientists representing more than 90 European biological research centers and institutes in support of genome editing technology. **Conclusions.** Among the genome editing technologies, CRISPR/Cas technology is one of the most powerful approaches that has become very quickly used in plant breeding due to advantages over other methods such as high accuracy and quality, efficiency and technical flexibility, relatively low cost. This available method allows to obtain non-transgenic plants with desired modifications, and it is possible to simultaneously “produce” mutations in several targets.

Keywords: genetic modification; genome editing; site-specific endonucleases; gene knockout.

Надійшла / Received 14.12.2018
Погоджено до друку / Accepted 08.02.2019