

Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas

А.М. Короткова¹✉, С.В. Герасимова¹, В.К. Шумный^{1, 2}, Е.К. Хлесткина^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Система CRISPR/Cas – один из самых перспективных способов геномного редактирования. Этот доступный метод позволяет получать нетрансгенные растения с заданными модификациями, причем можно одновременно производить мутации в нескольких мишенях. Цель настоящего обзора – анализ опубликованных работ, в которых система CRISPR/Cas использована для модификации генов сельскохозяйственных растений, с тем чтобы оценить потенциал этой технологии как нового метода селекции растений. Для 45 сельскохозяйственных культур проведен поиск по сочетанию ключевого слова CRISPR с названием культуры (поиск осуществлялся в названиях, аннотациях и ключевых словах статей из журналов, индексируемых в базе данных Scopus). Среди 206 результатов поиска только 88 содержали описание экспериментальных работ, в которых использована система CRISPR/Cas. В этих работах описаны 145 генов-мишеней у 15 сельскохозяйственных культур, включая рис, у которого модифицировано наибольшее число генов – 78. Возможность получения модифицированных нетрансгенных растений продемонстрирована в большинстве работ. Однако в основном исследования были нацелены на апробацию метода или на изучение функций целевых генов, и лишь редактирование 37 генов связано с улучшением свойств растений. В обзоре представлена таблица-каталог данных генов. Основной используемый вариант модификации – нокаут генов, преимущественно негативных регуляторов роста и развития растений или факторов, определяющих чувствительность к патогенам. В большинстве случаев проверен фенотип модифицированных растений и показано наличие заданных изменений признаков. Однако ввиду того, что негативные регуляторы – это ограниченная группа генов растений, можно предположить, что CRISPR/Cas-направленный нокаут как способ улучшения сельскохозяйственных культур имеет определенные рамки. В связи с этим целесообразно расширение апробации CRISPR/Cas для получения более сложных модификаций в геномах культурных растений, таких как замена дефектных аллелей функциональными или вставка в геном целевых генов (в настоящее время для улучшения свойств сельскохозяйственных растений известны лишь единичные примеры таких модификаций). Другое важное условие для широкого практического использования системы геномного редактирования CRISPR/Cas в селекции – возможность применения ко многим сортам одного и того же вида. В опубликованных работах пока еще используется весьма ограниченное число модельных сортов/линий. Тем не менее, несмотря на описанные ограничения, необходимо подчеркнуть, что за короткий срок (3.5 года с момента опубликования первых работ по модификации генома растений с помощью системы CRISPR/Cas) достигнуты значительные успехи.

Ключевые слова: геномное редактирование; зерновые; каталог генов; новые методы селекции; направленный мутагенез; овощные; плодовые; растения.

Crop genes modified using CRISPR/Cas system

A.M. Korotkova¹✉, S.V. Gerasimova¹,
V.K. Shumny^{1, 2}, E.K. Khlestkina^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The CRISPR/Cas system is the most promising among genome editing tools. It can provide the development of modified nontransgenic plants with the possibility of simultaneous multiple targeted mutations. The purpose of this review is to analyze published papers describing the utilization of the CRISPR/Cas system for crop gene modification in order to assess the potential of this technology as a new plant breeding technique. The search for “CRISPR & crop name” within article titles, abstracts and keywords in the Scopus database was carried out for 45 crops. Among a total of 206 search results, only 88 have been recognized as original articles describing editing crop genes with the CRISPR/Cas system. A total of 145 target genes of 15 crops are described in these 88 articles, including rice with the largest number of genes modified (78 genes). In these studies, the ability to get transgene-free modified plants was widely demonstrated. However, in most cases research was aimed at the approbation of the technology or was to elucidate target gene function, while modification of just 37 target genes was related with crop improvement. We present here a catalogue of these genes. In most of these cases, modifications resulted in knockout of the genes such as negative growth and development regulators or negative regulators of plant resistance. In most cases, the phenotype of modified plants was assessed, and the presence of desired changes was shown. However, since the estimated number of “negative regulators” is limited in plant genomes, the CRISPR-directed gene knockout has a restricted potential for crop improvement. Intensive application of the CRISPR/Cas system for more complicate modifications such as replacement of defect alleles by functional ones or insertion of a desired gene is required (so far reports about such modifications are very rare in crops). In addition, to provide a basis for broad practical application of CRISPR/Cas-based genome editing, more cultivars of crop species should be involved in ongoing studies. Just a few genotypes of crop species have been used for gene modifications thus far. Nevertheless, in spite of the restrictions mentioned, essential success has

been achieved over a short period (3.5 years since the first publications on CRISPR/Cas application in plants).

Key words: cereals; gene catalogue; genome editing; fruits; new breeding tools; site-directed mutagenesis; plants; vegetables.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):250-258. DOI 10.18699/VJ17.244

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using CRISPR/Cas system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(2):250-258. DOI 10.18699/VJ17.244

В августе 2013 г. почти одновременно вышли пять работ, сообщающих о первых успешных результатах редактирования геномов растений с помощью системы CRISPR/Cas. Первые исследования продемонстрировали универсальность данной технологии и возможность ее успешного применения не только на модельных, но и на возделываемых видах растений, при использовании разных методов трансформации (Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie, Yang, 2013).

Система CRISPR/Cas – один из самых перспективных способов геномного редактирования. Ее достоинства – доступность; высокая производительность; простота тестирования нескольких нРНК (направляющих РНК) для каждого гена-мишени; возможность делать одновременно несколько двуцепочечных разрывов (основа для редактирования нескольких генов одновременно); возможность редактировать метилированные участки ДНК (что важно при использовании регуляторных районов в качестве мишеней); наконец, по эффективности получения мутаций в геномах растений эта система не уступает и даже превосходит более ранние системы редактирования (ZFNs и TALENs). Принцип системы CRISPR/Cas, ее достоинства, варианты получаемых модификаций и используемые механизмы для редактирования, а также различные аспекты ее применения у растений (стабильность отредактированных геномов, наследуемость внесенных в геном изменений, частота возможных ошибочных модификаций, способы получения модифицированных нетрансгенных растений, а также правовые вопросы практического применения этого способа получения новых форм сельскохозяйственных растений) детально изложены в недавно опубликованных обзорных статьях (Хлесткина, Шумный, 2016; Герасимова и др., 2017; Злобин и др., 2017).

Цель настоящего обзора – анализ опубликованных работ, в которых система CRISPR/Cas была использована для модификации генов сельскохозяйственных растений, с тем чтобы оценить достигнутые за 3.5 года (с момента первых публикаций по применению этой системы на растениях) успехи и перспективу внедрения данного метода в практическую селекцию для улучшения сельскохозяйственных растений. До сих пор оставалась нерешенной задача систематической каталогизации селекционно-значимых генов сельскохозяйственных культур, модифицированных с применением системы CRISPR/Cas. Настоящий обзор – важный шаг на этом пути.

Поиск проводился в названиях, аннотациях и ключевых словах статей из журналов, индексируемых в базе данных Scopus (www.scopus.com), по сочетанию ключевого слова

CRISPR с названием культуры (последнее обновление найденных публикаций произведено нами 10.02.2017 г.). Дальнейший анализ найденных публикаций позволил выделить только статьи, содержащие результаты экспериментальных исследований, в которых использована система CRISPR/Cas. Избыток найденных статей (206) по сравнению с количеством опубликованных работ, непосредственно применяющих CRISPR/Cas (88), связан с интенсивным появлением большого числа обзорных статей в этой области, а также с тем, что многие авторы активно упоминают данную систему в вводной и заключительных частях аннотаций своих оригинальных работ. Поиск проведен для 45 продовольственных, кормовых и технических культур: апельсин (4/1)¹, арбуз (1/1), батат (1/0), бобы (1/0), виноград (3/2), горох (2/0), грейпфрут (2/2), груша (3/0), капуста (3/1), картофель (12/3), каассава (1/0), кукуруза (19/10), лен (1/1), лук (1/0), люцерна (1/0), огурец (4/1), пшеница (14/4), рис (73/46), рожь (1/0), сахарный тростник (2/0), свекла (1/0), слива (1/0), соя (12/6), томат (17/7), фасоль (4/0), хлопок (6/0), яблоня (6/2), ячмень (9/1). При поиске не найдено результатов для следующих культур: банан, вика, вишня, гречиха, дыня, кофе, лимон, конопля, морковь, нут, овес, перец, подсолнечник, просо, рапс, редис, чеснок.

Таким образом, согласно анализу публикаций, представленных в Scopus, система CRISPR/Cas прошла практическую апробацию на 15 сельскохозяйственных культурах, включая зерновые (пшеница, рис, кукуруза, ячмень), овощные (капуста, томат, огурец) и плодово-ягодные (виноград, яблоня) культуры, цитрусовые (апельсин, грейпфрут), а также картофель, арбуз, лен и сою. Всего у них описано 145 генов-мишеней. Однако детальный анализ найденных работ показал, что в большинстве случаев проведенные исследования были нацелены на апробацию метода или/и на изучение функций целевых генов. Редактирование лишь 37 генов у 12 культур связано с улучшением свойств растений. Составлен каталог данных генов (таблица).

Из возможных вариантов модификаций чаще всего использовали нокаут генов (см. таблицу). Наиболее востребованными генами-мишенями в случае применения данного типа модификации были негативные регуляторы роста, потеря функциональности которых может привести к повышению продуктивности растений. Например, у риса были одновременно нокаутированы три негативных регулятора размера зерна – гены *GW2*, *GW5*, *TGW6*. Таким

¹ После каждой культуры в скобках указано: общее число найденных для нее статей/выявленные среди них оригинальные работы с использованием CRISPR/Cas.

Гены сельскохозяйственных культур, модификация которых с помощью системы CRISPR/Cas привела к улучшению хозяйственно ценных признаков (по материалу статей в журналах, индексируемых в Scopus; последняя проверка 10.02.2017 г.)

Ген	Функция кодируемого продукта	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/линия	Способ трансформации	Частота мутантных растений, %	Получение не-трансгенных модифицированных растений	Литературный источник
РИС								
<i>ALS</i>	Ключевой фермент биосинтеза ветвящихся аминокислот – мише-ней для гербицидов	Замены нуклеотидов для изменения двух аминокислотных остатков	Устойчивость к гербицидам хлорсульфурону и биспирибаку натрия	Nipponbare	Биобаллистика каллусов/агробактериальная трансформация каллусов	36/24	+	Sun et al., 2016
<i>CSA</i>	Негативный регулятор фотопериод-чувствительной генной мужской стерильности	Нокаут	Стерильность пыльцы при выращивании в условиях короткого дня (контроль опыления в гибридной селекции)	9522 Konguи131 Jiaoyou5B	Агробактериальная трансформация каллусов	До 69	+	Li et al., 2016c
<i>DEP1</i>	Регулятор архитектуры соцветия и роста растений	»	Плотная прямостоячая метелка, низкорослость (повышение продуктивности)*	Zhonghua 11	»	67.5	+	Li et al., 2016b
<i>DEP1</i>	Регулятор архитектуры соцветия и высоты растений	»	»	-	»	-	-	Zheng et al., 2016
<i>EPSPS</i>	Ключевой фермент биосинтеза ароматических аминокислот	Замена чувствительного к глифосату аллеля на устойчивый (замещение экзона)	Устойчивость к гербициду глифосату	Nipponbare	Биобаллистика каллусов	2	+	Li et al., 2016a
<i>ERF922</i>	Негативный регулятор устойчивости к пирикуляриозу	Нокаут	Устойчивость к пирикуляриозу	Kuiku131	Агробактериальная трансформация каллусов	42	+	Wang et al., 2016
<i>Gn1a</i>	Негативный регулятор озерненности	»	Повышенная озерненность (повышение продуктивности)	Zhonghua 11	»	42.5	+	Li et al., 2016b
<i>GS3</i>	Негативный регулятор размера зерна	»	Удлинение зерна (повышение продуктивности), удлинение остей	Zhonghua 11	»	57.5	+	»
<i>GS3</i>	Негативный регулятор размера зерна и негативный регулятор озерненности	Нокаут GS3 и двойной нокаут	Удлинение зерна, повышение озерненности**	Nanjing 9108 Wuyunjing 27 Yangjing 4227 Zhejing 22 Zhejing 88	»	До 100	+	Shen et al., 2016
<i>GW2</i> <i>GW5</i> <i>TGW6</i>	Негативные регуляторы массы зерна	Тройной нокаут	Удлинение зерна (повышение продуктивности)	LN422	»	До 100	+	Xu et al., 2016

<i>IPA1</i>	Регулятор архитектуры растения	Нокаут	Низкое число побегов при низкой доле непродуктивных побегов, повышенная озерненность, утолщенные прочные стебли (повышение продуктивности, устойчивость к полеганию)	Zhonghua 11	»	27.5	+	Li et al., 2016b	
<i>NRT1.1B</i>	Транспортер азота	Однонуклеотидная замена	Увеличение эффективности использования азота	»	Агробактериальная трансформация с использованием модифицированной нуклеазы Cas9	2.7	-	Lu, Zhu, 2017	
<i>SLR1</i>	Репрессор ответа на гиббереллин	Однонуклеотидная замена	Низкорослость (повышение продуктивности)	»	»	13.3	-	»	
<i>TMS5</i>	Негативный регулятор термочувствительной генной мужской стерильности	Нокаут	Термозависимая стерильность пыльцы (контроль опыления в гибридной селекции)	Zhenshan97B ZhongzheB TianfenfB YixiangB ReB Huahuib HuanongB Yuejingsimiao Yuenongsimiao Wushansimiao GAS	Агробактериальная трансформация каллусов	До 94	+	Zhou et al., 2016	
КУКУРУЗА									
<i>ALS2</i>	Ключевой фермент биосинтеза ветвящихся аминокислот – митохондриальной гербицидов	Замена чувствительного к глифосату аллеля на устойчивый (замещение части кодирующей последовательности)	Устойчивость к гербициду хлорсульфурону	Линия Н-II	Биобаллистика эмбрионов (ДНК/RNP)	0.4/2	-	Svitashev et al., 2015	
<i>ARGOS8</i>	Негативный регулятор этиленового ответа	Инсерция промотора и замена промотора	Повышение устойчивости к засухе	RH184C	Биобаллистика эмбрионов (ДНК)	1	+	Shi et al., 2017	
ПШЕНИЦА									
<i>TaDEP1</i>	Регулятор архитектуры соцветия и роста растений	Нокаут	Низкорослость (повышение продуктивности)*	Kenong 199	Биобаллистика эмбрионов (ДНК)	2	+	Zhang et al., 2016	
<i>TaGASR7</i>	Негативный регулятор массы зерна	Нокаут трех копий	Увеличение массы зерна	Bobwhite Kenong 199	»	До 5	-	»	
<i>TaGASR7</i>	»	Нокаут двух копий	»	Shimai 1, Yumai4	»	До 1.5	-	»	
<i>TaGW2</i>	»	Нокаут трех копий	»	Kenong 199	»	1.1	+	»	

Окончание таблицы

Ген	Функция кодируемого продукта	Тип модификации	Целевое свойство	Сорт/линия	Способ трансформации	Частота мутантных растений, %	Получение нетрансгенных модифицированных растений	Литературный источник
<i>TaGW2</i>	Негативный регулятор массы зерна	Нокаут трех копий	Увеличение массы зерна	Kelong 199	Биобаллистика эмбрионов (ДНК/RNP)	1/0.21	+	Liang et al., 2017
<i>TaLOX2</i>	Липоксигеназа	Нокаут	Потенциальное улучшение хлебопекарных свойств***	»	Биобаллистика эмбрионов (ДНК)	9.5	+	Zhang et al., 2016
<i>TaMLO-A1</i>	Негативный регулятор устойчивости к мучнистой росе	»	Повышение устойчивости к мучнистой росе	»	»	5.6	-	Wang et al., 2014
ЯЧМЕНЬ								
<i>HvPM19</i>	АВА-индуцируемый белок плазматической мембраны	Нокаут двух копий	Сокращение продолжительности периода покоя семян	Golden Promise	Агробактериальная трансформация	10 и 23	+	Lawrenson et al., 2015
СОЯ								
<i>ALS1</i>	Ключевой фермент биосинтеза ветвящихся аминокислот – мишеней для гербицидов	Замена чувствительного к глифосату аллеля на устойчивый	Устойчивость к гербициду хлорсульфурону	93B86	Биобаллистика эмбрионов	0.4	-	Li et al., 2015
<i>Rf4</i>	Негативный регулятор нодуляции	Нокаут	Индукция образования клубеньков	Hill	Агробактериальная трансформация	Нет данных	-	Tang et al., 2016
КАРТОФЕЛЬ								
<i>ALS1</i>	Ключевой фермент биосинтеза ветвящихся аминокислот – мишеней для гербицидов	Нуклеотидные замены	Устойчивость к гербициду хлорсульфурону	Désirée MSX914-10	Агробактериальная трансформация	Нет данных	-	Butler et al., 2016
<i>GBSS</i>	Гранул-связанная крахмал-синтаза	Нокаут четырех аллелей	Изменение свойств крахмала за счет сдвига соотношения в нем амилопектина и амилозы в пользу амилопектина	Kuras	ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов	2.2–11.6	+	Andersson et al., 2017
ТОМАТ								
<i>CLV2, CLV3, FAB</i>	Сигнальные пептиды, участвующие в развитии растения	Нокаут	Появление дополнительных цветков в соцветии, фасциации, укрупнение плода (повышение продуктивности)	M82	Агробактериальная трансформация	-	-	Xu et al., 2015
<i>SIRRA3a</i>	Арабинозилтрансфераза (модифицирует CLV3, контролирует развитие меристем и морфологию соцветия)	»						

<i>SP5G</i>	Негативный регулятор цветения, регулятор роста и архитектуры растений	Нокаут	Ускорение сроков цветения (независимо от фотопериода), ранняя продуктивность, изменение морфологии (детерминантный тип)	M82 (LA3475) Sweet 100	Агробактериальная трансформация	Нет данных	+	Soyk et al., 2016	
<i>SIAGL6</i>	Негативный регулятор партенокарпии	Нокаут	Партенокарпия, повышенная урожайность при температурном стрессе	MR-1	»	-	+	Klar et al., 2016	
ОГУРЕЦ									
<i>eIF4E</i>	Негативный регулятор вирусоустойчивости	Нокаут	Повышение устойчивости к вирусным заболеваниям	Ilap	Агробактериальная трансформация	60	+	Chandrasekaran et al., 2016	
ВИНОГРАД									
<i>MLO-1</i>	Негативный регулятор устойчивости к мучнистой росе	Нокаут	****	Chardonnay	ПЭГ-опосредованная трансформация топластов	0.1	-	Malnou et al., 2016	
ЯБЛОНЯ									
<i>DIMP-1</i>	Негативный регулятор устойчивости к бактериальному ожогу плодовых культур	Нокаут	****	Golden delicious	ПЭГ-опосредованная трансформация топластов	6.7 3.3 6.9	-	Malnou et al., 2016	
ГРЕЙПФРУТ									
<i>CsLOB1</i>	Негативный регулятор устойчивости к раку цитрусовых	Нокаут	Повышение устойчивости к раку цитрусовых	Duncan	Агробактериальная трансформация	До 90	-	Jia et al., 2017	
ЛЕН									
<i>EPSPS</i>	Ключевой фермент биосинтеза ароматических аминокислот	Замена чувствительного к глифосату аллеля на устойчивый (изменение двух аминокислотных остатков)	Устойчивость к глифосату	Не указано	ПЭГ-опосредованная трансформация топластов системой CRISPR и редактирующей олигонуклеотидной матрицей	0.15	-	Sauer et al., 2016	

Примечание. Та – *Triticum aestivum* (пшеница мягкая); Тd – *Triticum durum* (пшеница твердая); RNP – рибонуклеопротеиновый комплекс).

* В зависимости от произведенных мутаций были получены контрастные фенотипы.

** Вместо ожидаемого повышения урожайности у большинства генотипов наблюдалось ее снижение (за счет уменьшения числа продуктивных побегов), у трех модифицированных линий урожайность повышалась на 3–7%.

*** Фенотип в работе не описан, указан потенциальный эффект, известный из литературных данных (Пермякова и др., 2010).

**** Эффективность модификации проверена на уровне протопластов, растения в данной работе не получали и не изучали; потенциальный эффект – повышение устойчивости (Malnou et al., 2016).

образом, проведено CRISPR/Cas-пирамидирование трех нокаутированных генов, что позволило достичь значительного удлинения зерна, по сравнению с нокаутом меньшего числа генов (Xu et al., 2016a). Повышения массы зерна гексаплоидной и тетраплоидной пшениц удалось добиться за счет нокаута соответственно трех и двух гомеологических копий гена *GASR7* (негативный регулятор массы зерна) (Zhang et al., 2016).

Увеличение массы зерна и повышенная озерненность требуют устойчивости к полеганию, которая обеспечивается низкорослостью или прочностью стебля. Например, у риса и пшеницы удалось добиться снижения высоты растения за счет нокаута по гену *DEP1* (Li et al., 2016b; Zhang et al., 2016).

Нокаут четырех генов, разных по своим функциям, но потенциально так или иначе связанных с продуктивностью, осуществлен у сорта риса (Li et al., 2016b). Среди генов-мишеней были: негативный регулятор озерненности *Gn1a*; ген *DEP1*, упомянутый выше (нокаут по нему не только снижает высоту растения, но также приводит к формированию плотной прямостоячей метелки); негативный регулятор размера зерна *GS3*; регулятор архитектуры растения *IPA1* (нокаут по нему должен приводить к снижению интенсивности кушения, уменьшению числа непродуктивных побегов, повышенной озерненности, утолщению и прочности стеблей). В дальнейшем у семи сортов риса были получены нокаутные генотипы по *GS3*, а также двойные нокауты *Gn1a + GS3*. Несмотря на то что у растений, нокаутных по *GS3*, было увеличено зерно, а у двойных нокаутов еще и повышена озерненность, продуктивность повышалась (на 3–7 %) лишь у трех продуктивных вариантов, тогда как у семи – неожиданно снижалась вследствие уменьшения числа продуктивных побегов (Shen et al., 2016).

Как показал ряд работ, одна из перспективных областей применения CRISPR/Cas-направленного нокаута генов – повышение устойчивости растений к воздействию фитопатогенов. Мишенями в данном случае служат гены, обуславливающие чувствительность к заболеваниям. Например, нокаут гена *ERF922* риса позволил получить формы, устойчивые к пирикулярриозу (Wang et al., 2016), а нокаут *TaMLO-A1* – устойчивость пшеницы к мучнистой росе (Wang et al., 2014).

Успешный пример CRISPR/Cas-направленного нокаута – получение форм с контролируемой мужской стерильностью для дальнейшего использования в гибридной селекции. Например, у 11 линий риса достигнут нокаут негативного регулятора термочувствительной генной мужской стерильности (ген *TMS5*). Получены нетрансгенные модифицированные формы, фертильные при оптимальной температуре, но полностью стерильные при температуре 28 °C, что позволит контролировать процесс самоопыления при использовании данных линий в гибридной селекции (Zhou et al., 2016). В работе (Li et al., 2016c) у трех сортов риса получены нетрансгенные линии, нокаутные по гену *CSA* – негативному регулятору фотопериод-чувствительной генной мужской стерильности. При выращивании в условиях короткого дня достигается стерильность пыльцы, тогда как в условиях длинного дня растения фертильны.

CRISPR/Cas-направленный нокаут генов также перспективен для улучшения признаков качества и технических характеристик сырья. Например, у картофеля нокаут гена *GBSS*, кодирующего фермент биосинтеза крахмала, гранул-связанную крахмалсинтазу, приводит к изменению свойств крахмала за счет сдвига в нем соотношения количества линейных (амилоза) и разветвленных (амилопектин) полисахаридов в пользу последних (Andersson et al., 2017). Крахмал с высоким содержанием амилопектина дает гели повышенной оптической прозрачности, устойчивости при центрифугировании, а также демонстрирует повышение максимальной и конечной температуры желатинизации и измененные реологические свойства (Хлесткин и др., 2017).

Широкое использование на ранних этапах апробации системы CRISPR/Cas именно нокаута генов связано с тем, что это наиболее простой и доступный способ модификации. Наличие достаточно разнообразных генов-мишеней, негативно влияющих на хозяйственно ценные признаки, также способствовало интенсивному применению данного подхода. Однако негативные регуляторы – это все-таки ограниченная группа генов растений. Выйти за рамки CRISPR/Cas-направленного нокаута удалось в нескольких работах. Например, произведенная однонуклеотидная замена в гене *NRT1.1B*, кодирующем транспортер азота, позволила повысить эффективность усвоения азота, а замена в гене *SLR1* (репрессор ответа на гиббереллин) привела к получению низкорослого фенотипа (Lu, Zhu, 2017). Также модификации генов использованы для повышения устойчивости растений к гербицидам. Замена определенных аминокислотных остатков генов *ALS* риса (Sun et al., 2016), сои (Li et al., 2015), кукурузы (Svitashev et al., 2015), картофеля (Butler et al., 2016) повышала устойчивость к гербициду хлорсульфону. Замена чувствительного к глифосату аллеля гена *EPSPS* на устойчивый позволила повысить его устойчивость к данному гербициду льна (Sauer et al., 2016) и риса (Li et al., 2016a).

Вместе с оптимизацией методик для различных вариантов CRISPR/Cas-направленной модификации генов актуально и накопление знаний о структурно-функциональной организации хозяйственно ценных генов и отличий их аллельных вариантов, с целью подбора новых мишеней для редактирования. Еще одно важное условие для широкого практического применения системы CRISPR/Cas в селекции – возможность ее приложения если не к любому, то ко многим сортам одного и того же вида. В опубликованных работах (см. таблицу) пока еще используется ограниченное число модельных сортов/линий. Наибольший прогресс наблюдается в исследованиях на рисе, у которого в геномное редактирование вовлечены уже более 20 сортов. Несмотря на то что проблема генотип-зависимой эффективности культивирования растений *in vitro* была известна и ранее, с появлением технологии CRISPR/Cas она обостряется, так как представляет собой, пожалуй, наиболее серьезное препятствие на пути широкого применения этой технологии как способа селекции растений.

Наблюдаемая частота полученных мутантных растений (см. таблицу) очень сильно варьировала и зависела от ряда факторов – вида растений, генотипа, мишени, метода трансформации. В отдельных случаях (на рисе) удавалось

достичь 100 % частоты получения мутантных растений (Shen et al., 2016; Xu et al., 2016).

Следует отметить, что в большинстве представленных работ продемонстрирована возможность получения модифицированных растений, свободных от служебных конструкций (transgene clean или transgene-free) (см. таблицу). Это достигалось в основном за счет независимого наследования модифицированных генов и локусов со встроенной служебной конструкцией. Для вегетативно размножаемых гетерозиготных форм (например, картофеля) данный способ не подходит, поэтому для получения модифицированных нетрансгенных растений в таких случаях используют векторы для транзientной экспрессии с доставкой в ядро растительной клетки с помощью трансфекции протопластов (именно такой способ избран М. Andersson с коллегами (2017) для модификации гена *GBSS* картофеля), агроинфильтрации или биобаллистики (см. таблицу). Временная экспрессия нередко служит удобным способом относительно быстро и просто оценить эффективность разработанных конструкций, а также позволяет сразу получить модифицированные растения, свободные от служебных конструкций.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00086).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях. Физиол. растений. 2017;64:92-108. DOI 10.7868/S0015330317010079.
- 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.
- Пермякова М.Д., Труфанов В.А., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф. Роль липоксигеназы в определении качества зерна пшеницы. Прикл. биохим. и микробиология. 2010;46:96-102.
- Хлесткин В.К., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Гены-мишени для получения сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с заданными свойствами крахмала. С.-х. биология. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiologia.2017.1.25rus.
- Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. Генетика. 2016;52(7):774-787. DOI 10.7868/S0016675816070055.
- Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Fält A.-S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep. 2017;36:117-128. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Butler N.M., Baltus 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.
- 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;17:1140-1153. DOI 10.1111/mpp.12375.
- Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D.L., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y., Zhu J.K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Cell Res. 2013;23:1229-1232. DOI 10.1038/cr.2013.11.
- 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. DOI 10.1111/pbi.12677.
- Klap C., Yeshayahou E., Bolger A.M., Arazi T., Gupta S.K., Shabtai S., Usadel B., Salts Y., Barg R. Tomato facultative parthenocarpy results from *Sl AGAMOUS-LIKE 6* loss of function. Plant Biotechnol. J. 2016. DOI 10.1111/pbi.12662.
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. Genome Biol. 2015;16:258. DOI 10.1186/s13059-015-0826-7.
- Li J., Meng X., Zong Y., Chen K., Zhang H., Liu J., Li J., Gao C. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. Nat. Plant. 2016a;2:16139. DOI 10.1038/nplants.2016.139.
- Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J. I. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. Nat. Biotechnol. 2013;31:688-691. 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. 2016b;7:377. DOI 10.3389/fpls.2016.0037.
- Li Q., Zhang D., Chen M., Liang W., Wei J., Qi Y., Yuan Z. Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. J. Genet. Genomics. 2016c;43:415-419. DOI 10.1016/j.jgg.2016.04.011.
- Li Z., Liu Z.-B., Xing A., Moon B.P., Koellhoffer J.P., Huang L., Ward R.T., Clifton E., Falco S.C., Cigan A.M. Cas9-guided RNA Directed genome editing in soybean. Plant Physiol. 2015;169:960-970. DOI 10.1104/pp.15.00783.
- 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.
- Lu Y., Zhu J.-K. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. Mol. Plant. 2017. DOI 10.1016/j.molp.2016.11.013.
- Malnoy M., Viola R., Jung M.-H., Koo O.-J., Kim S., Kim J.-S., Velasco R., Kanchiswamy C.N. DNA-Free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Frontiers in Plant Sci. 2016;7:1904. DOI 10.3389/fpls.2016.01904.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat. Biotechnol. 2013;31:691-693. DOI 10.1038/nbt.2655.
- Sauer N.J., Narváez-Vásquez J., Mozoruk J., Miller R.B., Warburg Z.J., Woodward M.J., Mihiret Y.A., Lincoln T.A., Segami R.E., Sanders S.L., Walker K.A., Beetham P.R., Schöpke C.R., Gocal G.F. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. Plant Physiol. 2016;170:1917-1928. DOI 10.1104/pp.15.01696.
- 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;31:686-688. DOI 10.1038/nbt.2650.
- Shen L., Wang C., Fu Y., Wang J., Liu Q., Zhang X., Yan C., Qian Q., Wang K. QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. J. Integr. Plant Biol. 2016. DOI 10.1111/jipb.12501.
- 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;15:207-216. DOI 10.1111/pbi.12603.

- Soyk S., Müller N.A., Park S.J., Schmalenbach I., Jiang K., Hayama R., Zhang L., Van Eck J., Jiménez-Gómez J.M., Lippman Z.B. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nat. Genet.* 2016;49:162-168. DOI 10.1038/ng.3733.
- Sun Y., Zhang X., Wu C., He Y., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y., Xia L. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant.* 2016;628-631. DOI 10.1016/j.molp.2016.01.001.
- Svitashev S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 2015; 169:931-945. DOI 10.1104/pp.15.00793.
- Tang F., Yang S., Liu J., Zhu H. Rj4, a Gene controlling nodulation specificity in soybeans, encodes a thaumatin-like protein but not the one previously reported. *Plant Physiol.* 2016;170:26-32. DOI 10.1104/pp.15.01661.
- 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:e0154027. DOI. 10.1371/journal.pone.0154027.
- 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;32:947-951. DOI 10.1038/nbt.2969.
- Xie K., Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant.* 2013;6:1975-1983. DOI 10.1093/mp/sst119.
- Xu C., Liberatore K.L., MacAlister C.A., Huang Z., Chu Y.-H., Jiang K., Brooks C., Ogawa-Ohnishi M., Xiong G., Pauly M., Van Eck J., Matsubayashi Y., van der Knaap E., Lippman Z.B. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nat. Genet.* 2015;47:784-792. DOI 10.1038/ng.3309.
- Xu R., Yang Y., Qin R., Li H., Qiu C., Li L., Wei P., Yang J. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genomics.* 2016; 43:529-532. DOI 10.1016/j.jgg.2016.07.003.
- Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J.-L., Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* 2016;7:12617. DOI. 10.1038/ncomms12617.
- Zheng X., Yang S., Zhang D., Zhong Z., Tang X., Deng K., Zhou J., Qi Y., Zhang Y. Effective screen of CRISPR/Cas9-induced mutants in rice by single-strand conformation polymorphism. *Plant Cell Rep.* 2016;35:1545-1554. DOI 10.1007/s00299-016-1967-1.
- Zhou H., He M., Li J., Chen L., Huang Z., Zheng S., Zhu L., Ni E., Jiang D., Zhao B., Zhuang C. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Sci. Rep.* 2016;6:37395. DOI 10.1038/srep37395.