



Оксана Урбанович,
заведующий
лабораторией
молекулярной генетики
Института генетики и
цитологии НАН Беларуси,
доктор биологических
наук, профессор



**Анастасия Шишлова-
Соколовская,**
старший научный
сотрудник лаборатории
молекулярной генетики
Института генетики и
цитологии НАН Беларуси



Валерия Неборская,
младший научный
сотрудник лаборатории
молекулярной генетики
Института генетики и
цитологии НАН Беларуси

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 для создания растений с новыми свойствами

Генетическое редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9 (clustered regulatory inter spaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) – это новая технология, которая появилась в 2012 г. благодаря работам Э. Шарпантье и Д.А. Дудны, получившим в 2020 г. Нобелевскую премию по химии за свое открытие. Первые исследования выполнялись на бактериях, а уже в 2013 г. было показано, что система CRISPR/Cas9, которую прозвали генетическими ножницами, применима и к многоклеточным организмам – животным, растениям и человеку. С ее помощью можно целенаправленно изменять ДНК живых организмов для придания им новых свойств. Генетическое редактирование фактически является разновидностью искусственного мутагенеза. В отличие от радиационного или химического, которые зачастую приводят к возникновению случайных мутаций в обширных областях генома, при помощи CRISPR/Cas9 изменения вносятся только в область, определенную исследователем, не затрагивая остальную часть. От выбора данного участка зависит, какие качества может приобрести вновь созданный генотип. Это сделало генетические ножницы одним из наиболее эффективных инструментов редактирования геномов растений.

Система CRISPR/Cas9 состоит из 2 основных компонентов: гидовой (направляющей) РНК (гидРНК), которая связывается с геном-мишенью, и эндонуклеазы Cas9, разрезающей выбранный ген в строго установленном месте. При восстановлении поврежденного участка ДНК системами репарации клетки могут возникать разнообразные мутации, включая делеции, инсерции, со сдвигом рамки считывания, что вызывает нарушения в нуклеотидной последовательности гена-мишени и, как следствие, приводит к изменению его функции (рис. 1).

Растения, полученные таким образом, имеют важное отличие от генетически модифицированных организмов (ГМО), вызывающих на протяжении всей своей истории множество вопросов и споров относительно их безопасности для человека. В случае же применения CRISPR/Cas9 растения могут нести отдельные чужеродные гены на первом этапе создания, в зависимости от применяемых для их получения методов. Затем путем обычных скрещиваний, являющихся неотъемлемым элементом любых селекционных программ, все лишнее убирается из генома, и события генетического редактирования уже практически невозможно отличить от обычных мутаций, которые могут возникать и естественным путем. Следовательно, данный подход практически не оставляет следов.

Тем не менее применение технологии на основе CRISPR/Cas9 сталкивается с некоторыми проблемами законодательного уровня, свойственными ГМО. Работа над нормативными актами, регламентирующими выращивание растений, полученных с помощью новых методов селекции, в настоящее время идет в различных странах. США, Канада, многие государства Южной Америки и Азии не регулируют культуры, появившиеся благодаря технологии CRISPR/Cas9, поскольку конечный продукт модификации не содержит трансгенного материала. Министерство сельского хозяйства Китая в 2022 г. опубликовало предварительное положение, разрешающее выход на рынок генетически отредактированных культур. Согласно постановлению Парламента ЕС, принятому в 2024 г., растения, которые таким образом могли возникнуть в природе (без чужеродной ДНК), в будущем должны регулироваться менее строго. Есть основания полагать, что разработка законов об их распространении и выращивании будет направлена в сторону их эффективного и безопасного использования.

Применение CRISPR/Cas9 отдельно или в сочетании с другими передовыми технологиями для получения высокоурожайных, устойчивых сортов с новыми качествами в мире растет. К концу 2023 г.

этот метод был применен к 120 видам растений, созданы мутанты риса, пшеницы, кукурузы, ячменя, томата и другие с улучшенными признаками, такими как более высокая урожайность, повышенная питательная ценность и устойчивость к болезням, толерантность к абиотическим стрессам окружающей среды. Многие из генетически редактированных растений, несущих целевые мутации, могут рассматриваться как перспективные в будущих программах селекции, ускоряющие выведение сортов с ценными хозяйственными качествами. Например, в США с помощью CRISPR/Cas9 были получены сорта зерновых и бобовых культур. Не остался вне поля интереса исследователей и картофель. Десятки его генов подверглись генетическому редактированию с целью повышения устойчивости к абиотическим и биотическим факторам, улучшения качества клубней [1].

Для Республики Беларусь картофель – важная продовольственная культура, которой производится около 700–1000 кг на душу населения, что считается одним из самых высоких показателей в мире. Серьезной проблемой является недостаточная устойчивость ее к болезням, особенно фитофторозу, вызываемому оомицетом *Phytophthora infestans*, сильные вспышки которого в нашем климате наблюдаются каждые 2–3 года, что делает создание резистентных к нему сортов одной из основных целей селекционных программ, над достижением которой специалисты работают уже около 100 лет. Источников естественной устойчивости к данному заболеванию немного, но и они преодолеваются быстро эволюционирующими расами патогена. В связи с этим огромное значение придается поиску альтернативных методов приобретения резистентности. Технология на основе системы CRISPR/Cas9 открывает новые возможности в этом направлении.

В лаборатории молекулярной генетики Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2020 г. впервые в стране были получены генетически отредактированные растения модельного объекта табака. Воздействию подвергался ген NtPDS, нарушение функции которого приводило к альбинизму. Растения с мутантным геном легко было отличить визуально, что позволило разработать оптимальные и эффективные методические подходы для реализации нового метода [2]. Уже в 2023 г. при непосредственной поддержке руководства Академии наук были начаты исследования по созданию с помощью системы CRISPR/Cas9 картофеля, невосприимчивого к фитофторе. Совместно с НППЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству были

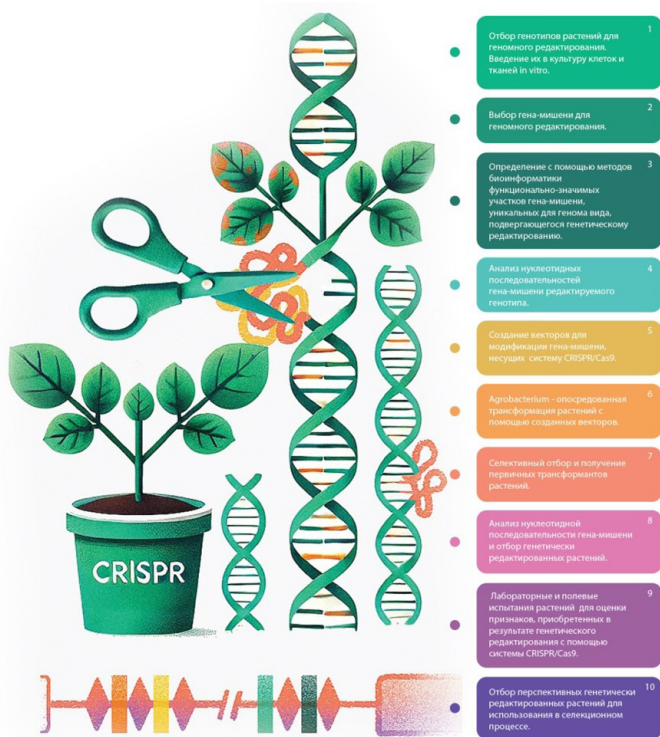


Рис. 1. Основные этапы создания генетически отредактированных растений

отобраны сорта белорусской селекции, имеющие среднюю и низкую степень устойчивости к данной болезни. Для них были оптимизированы методы, позволяющие ввести растения в культуру клеток и затем регенерировать из них целое растение. Этот этап необходим, так как генетическому редактированию изначально подвергаются отдельные клетки.

Для проведения манипуляций был выбран ген DMR6-1, который кодирует 2-оксоглутарат (2OG) и Fe(II)-зависимую оксигеназу, обладающую активностью 5-гидроксилазы салициловой кислоты и влияющую на ее количество. DMR6-1 классифицируется как ген восприимчивости, важный для успешного развития патогена в зараженном растении. Потеря им функции затрудняет распространение инфекции и повышает устойчивость к ней.

Нужные участки гена были секвенированы. Полученные последовательности подвергли сравнению с последовательностью *S. tuberosum*, зарегистрированной в международной базе данных NCBI, чтобы избежать неспецифических эффектов и, как следствие, мутаций в других областях генома. После этого с помощью методов биоинформатики и онлайн-ресурсов для CRISPR/Cas9-системы были разработаны высокоспецифичные последовательности (гидовые РНК). Именно они были применены для создания двух векторных конструкций,

посредством которых осуществлялось редактирование гена-мишени.

Для стабильной интеграции CRISPR/Cas9-системы в растительный геном использовалась *Agrobacterium*-опосредованная трансформация листовых дисков и частей стебля 3–4-недельных растений картофеля, выращенных в стерильных условиях. В результате было получено более 100 первичных трансформантов T0 поколения сортов картофеля белорусской селекции Першацвет и Юлия (рис. 2).

Результаты эксперимента по редактированию с помощью системы CRISPR/Cas9 приводят к образованию гетерогенной популяции клеток, и не сразу понятно, произошло или нет изменение последовательности целевого гена и следует ли продолжать эксперимент. Для подтверждения событий направленного мутагенеза в геноме картофеля была определена нуклеотидная последовательность отдельных областей гена-мишени методом секвенирования по Сэнгеру. Анализ был выполнен на случайной выборке растений T0 поколения с помощью онлайн-инструмента TIDE. Пример результатов для отдельного растения сорта Першацвет представлен на рис. 3.

Показано, что у образца данного растения в положении 132–154 п.о. 1 экзона гена-мишени StDMR6-1 наиболее распространенной мутацией была делеция одного нуклеотида (68,1%), а эффективность нокаута составила 82,9% от общего числа проанализированных геномов при $R^2=0,83$. Внесенное изменение приводит к сдвигу рамки считывания в последовательности гена и, как следствие, образованию стоп-кодонов и изменению его функциональной активности.

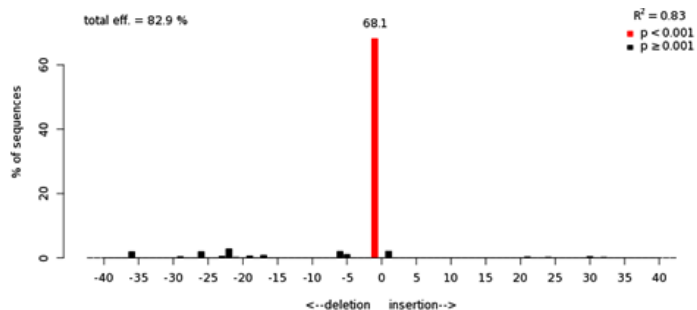
Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК трансгенного растения сорта картофеля Юлия показал частоту мутации инсерционно-делеционного типа 81,8% (рис. 4).

В последовательности гена-мишени StDMR6-1 сорта Юлия в положении 132–154 п.о. 1 экзона мутацией с наибольшей частотой встречаемости была инсерция в положении +1–78,5% при общей эффективности мутагенеза в геноме данного образца 81,8% при $R^2=0,82$. Эти изменения также приводят к сдвигу рамки считывания в последовательности гена и изменению его функциональной активности.

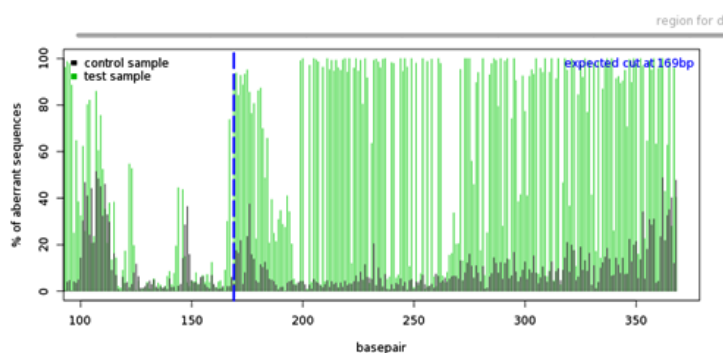
В общей сложности получено не менее 34 растений сорта Першацвет и 19 – сорта Юлия с нокаутом гена DMR6-1. Данные результаты показывают, что нокаут функционально значимых кодирующих последовательностей гена StDMR6-1 удалось индуцировать с различной частотой мутаций



Рис. 2. Отдельные этапы роста растений картофеля, подвергшихся редактированию гена StDMR6-1 с помощью системы CRISPR/Cas9



Quality control - Aberrant sequence signal



Quality control - Aberrant sequence signal

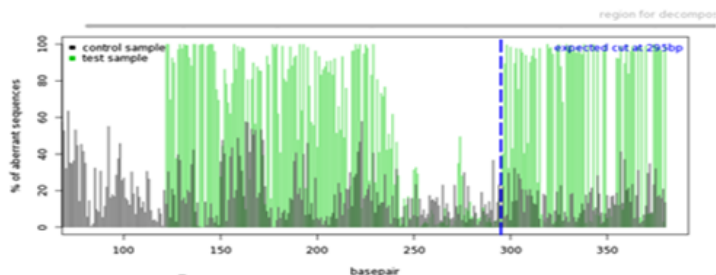


Рис. 4. Анализ присутствия мутационных событий, индуцированных CRISPR/Cas-9 системой, в геноме трансгенного растения *Solanum tuberosum* сорта белорусской селекции Юлия с помощью онлайн-инструмента анализа данных TIDE

инсерционно-делеционного типа. Следовательно, цель данного эксперимента была достигнута.

Недавно опубликованные научные исследования показывают, что изменение функции гена StDMR6–1 обеспечивает широкий спектр устойчивости к болезням у такой родственной картофелю культуры, как томаты. Мутации в гене StDMR6–1 повышают устойчивость к гемибактериальным бактериям у банана, цитрусовых, риса, ячменя; к грибным патогенам – у винограда, ячменя, риса и др.

Показано также, что картофель с генетически отредактированным геном StDMR6–1 демонстрирует широкий спектр устойчивости, в том числе к фитофторе, некоторым грибным инфекциям и даже к стрессам [3]. Важно, что при этом качество клубней не ухудшалось, урожайность не снизилась. Однако данные приобретенные характеристики не абсолютны. Их существенным преимуществом является то, что они позволяют снизить обработку фунгицидами и повышают общую устойчивость к фитофторе. Вполне вероятно, что для достижения максимального результата необходимо будет комбинировать различные селекционные и биотехнологические подходы.

Таким образом, на данном этапе в лаборатории молекулярной генетики Института генетики и цитологии НАН Беларуси получены растения картофеля, в которые внесены различные мутации гена StDMR6–1, индуцированные CRISPR/Cas9-системой. В дальнейшем необходимо будет оценить, какой эффект оказывает сделанное изменение. Есть все основания предполагать, что модификация указанного гена повысит общую устойчивость сортов картофеля и, в частности, к фитофторе. Ближайшей задачей должна стать проверка этих качеств у растений в условиях выращивания в грунте и отбор наиболее перспективных генотипов. Необходимо также оценить, насколько стабильны внесенные изменения. Специалисты лаборатории работают над планированием этого этапа и надеются найти необходимую поддержку для его реализации. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. CRISPR/Cas genome editing in potato: current status and future perspectives / J.K. Tiwari T. Buckseth, C. Challam [et al.] // Front. Genet. 2022. V. 13. P. 827808.
2. CRISPR/Cas9-опосредованный направленный мутагенез гена PDS *Nicotiana tabacum* / А.М. Шишлова-Соколовская, О.Ю. Урбанович // Вести НАН Беларуси. Серия биол. наук. 2024. Т. 69, №4. С. 298–308.
3. CRISPR/Cas9 genome editing of potato StDMR6–1 results in plants less affected by different stress conditions / M. Karlsson, N. Phuong Kieu, M. Lenman [et al.] // Horticulture Research 2024. V. 11, Iss.7. U. 130.