

УДК 577.29

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ПАТОГЕНАМ*

Обзор

© 2019 С.С. Макарова^{1,2}, А.В. Хромов^{1,2}, Н.А. Спеченкова³,
М.Э. Тальянский^{1,3}, Н.О. Калинина^{1,2,3**}

¹ ООО «Дока-Генные технологии» 141880, Московская область, Дмитровский район,
Рогачево, Россия; электронная почта: mail@dokagene.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: kalinina@genebee.msu.ru

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия;
электронная почта: office@ibch.ru

Поступила в редакцию 11.07.18

После доработки 07.09.18

Принята к публикации 07.09.18

Использование прокариотической адаптивной иммунной системы CRISPR/Cas9 привело к настоящему прорыву в направленном редактировании генома эукариот. Технология CRISPR/Cas9 позволяет получать организмы с заданными свойствами путем внесения делеций или вставок в выбранные участки генома, что приводит к «выключению» или модификации целевых генов. Настоящий обзор посвящен современному состоянию применения приложений на основе CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусам, бактериям и паразитическим грибам. Резистентность к заражению ДНК- и РНК-содержащими вирусами достигалась получением трансгенных растений, экспрессирующих ген эндонуклеазы Cas и последовательностей коротких гидовых РНК, нацеленных на определенные участки генома вируса или гены растения-хозяина. Подобные подходы приводили или к прямому разрезанию генома вируса, или модификации генома растения, которая снижала эффективность репликации вируса. Редактирование генов растений, участвующих в защитном ответе на заражение патогенами, усиливало резистентность растений к бактериям и патогенному грибу. В обзоре обсуждены стратегии и перспективы создания растений, устойчивых к патогенам, и способы получения растений, которые не являются генно-модифицированными организмами, в частности, бесплазмидные способы доставки в клетки растений редактирующего комплекса эндонуклеазы Cas/короткая гидовая РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: растения, система CRISPR/Cas, редактирование генома, вирусы растений, бактерии, грибы, устойчивость к инфекции патогенами.

DOI: 10.1134/S0320972519010020

Продуктивность сельскохозяйственных культур и качество урожая зависят не только от погодных условий, региона произрастания, качества семенного материала, но и степени заражения разнообразными патогенами и активности

переносчиков патогенов. Помимо грибковой и бактериальной инфекций значительный урон растениеводству наносят вирусы. По некоторым оценкам вирусные инфекции являются причиной практически половины всех эпифитотий [1], что

Принятые сокращения: Cas9 – CRISPR-ассоциированная эндонуклеаза 9; CRISPR – короткие палиндромные повторы, расположенные регулярными группами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats); eIF4E – эукариотический фактор инициации трансляции 4E; eIF(iso)4E – изоформа эукариотического фактора инициации трансляции 4E; IR – межгенная область (intergenic region); PAM-сайт – мотив, ассоциированный с протоспейсером (protospacer-associated motif); ГМО – генетически модифицированный организм; ВЖКБ – вирус желтой карликовости бобов; ВЖКЛТ – вирус желтой курчавости листьев томатов; ВЖМЦ – вирус желтой мозаики цуккини; ВКПП – вирус кольцевой пятнистости папайи; ВММ – вирус мозаики мерремии; ВМТ – вирус мозаики турнепса; ВОМ – вирус огуречной мозаики; ВПЖО – вирус пожелтения жилок огурца; ВСКВС – вирус суровой курчавости верхушек свеклы; ЗФБ – зеленый флуоресцентный белок; КВКЛХ – кокрановский вирус курчавости листьев хлопка; кгРНК – короткая гидовая РНК; РНП-комплекс – рибонуклеопротеидный комплекс.

* Статья на английском языке опубликована в томе 83, вып. 12, 2018.

** Адресат для корреспонденции.

оценивается в 60 млрд долларов США ежегодно [2]. Заражение растений патогенами также существенно влияет на вкусовые, товарные качества и сроки хранения продукции растениеводства.

Учитывая ограниченную площадь полезных пахотных земель и глобальное изменение климата, решение проблемы нехватки продовольствия в ближайшем будущем требует повышения урожайности сельскохозяйственных культур с применением новых технологий и генетических ресурсов. Эти технологии должны позволить в относительно короткие сроки получить новые сорта сельскохозяйственных растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды как биотической, так и абиотической природы.

Для минимизации последствий инфекций в практике растениеводства в настоящее время применяют три основных подхода. Во-первых, методами традиционной селекции создают отдельные сорта/линии сельскохозяйственных культур, устойчивые к ряду патогенов, в т.ч. к вирусам. Основным подходом для получения устойчивых к вирусным инфекциям растений является использование в селекционных программах растительных генов природной устойчивости, источником которых, как правило, являются дикорастущие виды растений. К числу очевидных препятствий успешной селекции можно отнести трудности скрещивания элитных линий с дикими видами растений, длительность процесса и вероятность одновременного внесения нежелательных локусов, снижающих продовольственную ценность культуры. Кроме того, этот тип устойчивости является специфичным и не долговременным, поскольку способен преодолеваться патогеном.

Во-вторых, в последние три десятилетия активно развивалось направление придания растениям устойчивости к вирусам путем создания трансгенных линий, экспрессирующих гены отдельных вирусных белков или фрагменты последовательности этих генов, а также некодирующие вирусные нуклеотидные последовательности [3, 4]. Однако существуют только отдельные примеры создания трансгенных сельскохозяйственных культур, демонстрирующих высокую устойчивость к соответствующим вирусам, например, создание устойчивых растений картофеля [5, 6]. Эти подходы также имеют существенные ограничения, обусловленные, в частности, тем, что приобретаемая устойчивость, как правило, является специфичной и со временем преодолевается вирусами. РНК-интерференция или посттранскрипционное умолкание генов является одним из механизмов врожденной защиты растений от патогенов. Предпола-

гается, что этот защитный ответ является одним из важных механизмов, обеспечивающих трансгенную устойчивость, даже если трансген – это последовательность, кодирующая вирусспецифические белки. Другой подход состоит в придании устойчивости растениям путем трансгенной экспрессии клеточных генов, в т.ч. генов природной устойчивости. Однако наличие законодательных ограничений на использование генно-модифицированных организмов (ГМО) во многих странах ограничивает применение трансгенных растений.

Наконец, в странах с высоким уровнем развития сельского хозяйства поддерживаются санитарные меры, предусматривающие постоянный мониторинг распространения вирусов и их переносчиков, сертификацию посадочного материала на основе диагностики и оздоровления сортов. Данные меры требуют интенсивной работы специализированных лабораторий, наличия квалифицированного персонала и являются достаточно дорогостоящими.

В долгосрочной перспективе создание резистентных к патогенам сортов/линий сельскохозяйственных растений представляется предпочтительным. На современном этапе новые технологии редактирования генома открывают широкие возможности для получения растений, устойчивых к инфекциям разной природы. Наиболее популярной и перспективной технологией редактирования генома является технология CRISPR/Cas9, позволяющая вносить целенаправленные изменения в гены вирусов и растений-хозяев.

В данном обзоре рассмотрены примеры использования системы редактирования CRISPR/Cas9 и других систем CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусам, бактериям и патогенным грибам. Обсуждены стратегии и перспективы использования технологий на базе платформы CRISPR/Cas, особенности редактирования генома растений, проблема нецелевой активности эндонуклеазы Cas и способы доставки редактирующего комплекса – белка Cas и короткой гидовой РНК – в клетки растений.

СИСТЕМА CRISPR/Cas9 И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ

Короткие палиндромные повторы, расположенные регулярными группами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами), были обнаружены в геноме прокариот и архей и происходили от чу-

жородных генетических элементов (плазмид и бактериофагов). Согласно современным представлениям эти короткие фрагменты ДНК служат формой «молекулярной памяти», а локусы CRISPR и ассоциированная с ними эндонуклеаза Cas в целом являются прокариотической системой молекулярного иммунитета. При повторном попадании в клетку чужеродной ДНК молекулы РНК, транскрибирующиеся с локусов CRISPR совместно с эндонуклеазой Cas, комплементарно связываются с ДНК чужеродных элементов с последующим их разрезанием белком Cas. Разрезание ДНК-мишени происходит в определенном месте, предшествующем мотиву, связанному с протоспейсером (protospacer-associated motif, PAM). PAM-сайт представляет собой тринуклеотидную последовательность (для белка Cas9 – это NGG), которая распознается белком Cas и необходима для его связывания с целевой ДНК (рис. 1, а) [7, 8].

В последние годы технология CRISPR/Cas9 обеспечила прорыв в осуществлении целенаправленных изменений генома эукариот. Использование предсказанных с помощью биоинформатических веб-сервисов синтетических коротких гидовых РНК (кгРНК), комплементарных целевому участку ДНК и функционально аналогичных спейсерам, и рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 позволяет вносить мутации в любые гены. Эта технология обеспечивает эффективную и точную модификацию генома на основе целевых разрывов в обеих цепях ДНК, которые активируют клеточные системы репарации по механизму гомологичной рекомбинации или нехомологичного соединения концов (NHEJ), приводящего к образованию так называемых инделей (вставок или делеций нуклеотидов, insertion/deletion) и потере функции целевого гена. В настоящее время применение технологии CRISPR/Cas9 расширяется не только в качестве инструмента редактирования генома эукариот, но и для влияния на транскриптом и эпигенетической модуляции. Важным направлением использования этой технологии является разработка подходов к улучшению полезных качеств сельскохозяйственных растений [9–11], в т.ч. повышению резистентности растений к вирусам и другим патогенам [12–15].

Значимой сложностью при использовании данной технологии является проблема ошибочного редактирования нецелевого участка генома, причиной которой является возможность «неидеального» спаривания кгРНК с последовательностью геномной ДНК, так называемый *off-target*-эффект или *off-target*-активность. Этот процесс может привести к редактированию случайной области генома с непредсказуемыми

последствиями. Исходно полагалось, что специфичность гидовой РНК определяется всеми двадцатью нуклеотидами последовательности и примыкающими тремя нуклеотидами PAM-сайта. Однако детальные исследования показали, что только 11–13 нуклеотидов на 3'-конце кгРНК необходимы для распознавания целевого сайта [16, 17] (рис. 1, а). Нарушение комплемен-

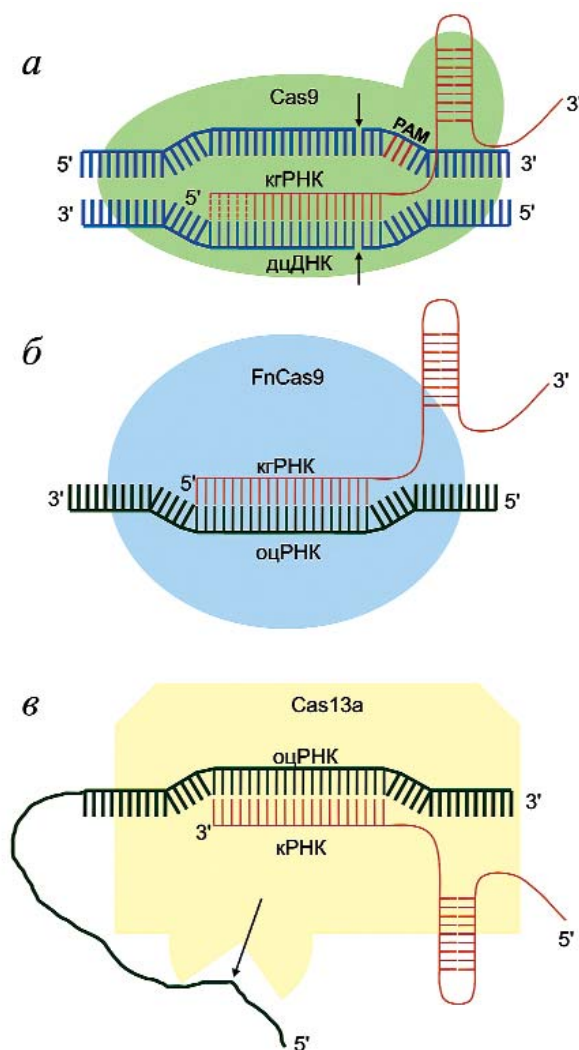


Рис. 1. Схематическое изображение различных систем CRISPR/Cas для редактирования ДНК- и РНК-мишеней. Представлены эффекторы CRISPR/Cas в комплексе с направляющими их короткими РНК. а – Эндонуклеаза SpCas9 в комплексе с короткой гидовой РНК и ДНК-мишенью. Пунктиром показаны нуклеотиды с 5'-конца кгРНК, отсутствие которых не влияет на эндонуклеазную активность комплекса. Места разрезания ДНК обозначены стрелками. PAM-сайт отмечен заглавными буквами. Обозначения: дцДНК – двуцепочечная ДНК; б – эндонуклеаза FnCas9 в комплексе с кгРНК и одноцепочечной (оц) РНК-мишенью. Связывание комплекса с оцРНК ингибирует репликацию/трансляцию вирусной РНК; в – эндонуклеаза Cas13a в комплексе с кгРНК (CRISPR РНК) и оцРНК-мишенью. Место разрезания оцРНК обозначено стрелкой

тарности в первых шести нуклеотидах с 5'-конца кгРНК, напротив, не влияет на эндонуклеазную активность комплекса [17]. Вместе с тем укорочение с 5'-конца последовательности кгРНК до 17–18 нуклеотидов приводит к снижению *off-target*-активности [18]. Для снижения нецелевой активности эндонуклеазы Cas9 необходимо учитывать GC-состав кгРНК: при содержании GC >30% снижается вероятность нецелевого разрезания участков ДНК. Правильно подобранный промотор для экспрессии кгРНК и белка Cas9 или доставка предварительно собранного комплекса также приводит к снижению нецелевого редактирования [19]. В последнее время появились веб-сервисы, позволяющие предсказать участки в геноме, с которыми выбранная кгРНК может гибридизоваться дополнительно. Тщательный выбор последовательности кгРНК и методики постановки опыта повышает эффективность целевого редактирования генома и минимизирует ошибочную активность комплекса CRISPR/Cas [10, 20].

Отличительной особенностью растений, в т.ч. многих сельскохозяйственных культур, является их полиплоидность. Например, картофель является тетраплоидом, разные сорта пшеницы представлены как тетраплоидными, так и гексаплоидными формами, сахарный тростник – октаплоид. Редактирование генов полиплоидных растений не требует принципиальных изменений в технологии CRISPR/Cas. Однако всегда нужно учитывать, что внесение мутаций во все аллели происходит с меньшей частотой, чем в одну. В связи с этим работа с полиплоидами требует более тщательной проверки на наличие факта редактирования всех аллелей. В настоящее время опубликовано несколько исследований, в которых редактированы целевые гены полиплоидных растений. Например, в работе Andersson et al. с эффективностью 2–3% удалось мутировать ген связанной с гранулами крахмал-синтазы I (*GBSSI*) во всех четырех аллелях генома растений картофеля [21]. В работе Liang et al. с эффективностью ~4% редактированы все шесть аллелей целевых генов гексаплоидной пшеницы [22].

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ДНК-СОДЕРЖАЩИМ ВИРУСАМ, НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9

В 2015 г. в исследованиях трех различных лабораторий впервые было продемонстрировано использование системы CRISPR/Cas9 для получения растений, устойчивых к инфекции геминивирисами, геном которых представлен одноцепочечной ДНК [20–23]. Ji et al. были получе-

ны трансгенные растения *Nicotiana benthamiana* и *Arabidopsis thaliana*, устойчивые к инфекции вирусом суровой курчавости верхушек свеклы (ВСКВС). Для поиска эффективной кгРНК в геноме ВСКВС были выбраны 43 кандидатных участка в составе кодирующих и некодирующих последовательностей вирусного генома. Конструкции, содержащие последовательности гена *Cas9* из *Streptococcus pyogenes* и каждой из кгРНК, агроинфильтрировали в листья *N. benthamiana*. Конструкцию, с которой экспрессировался только ген белка SpCas9, использовали в качестве контроля. Через два дня инфильтрированные листья заражали ВСКВС, и на 10-й день после заражения контрольные и опытные растения анализировали на наличие симптомов вирусной инфекции и на присутствие вирусной ДНК методом количественной ПЦР. Оказалось, что если на контрольных растениях развивались типичные симптомы (скрученность верхних листьев), то на опытных растениях симптомы вирусной инфекции отсутствовали, а количество вирусной ДНК было снижено. Секвенирование геномной ДНК вируса показало, что мутации представляют собой в основном делеции от 1 до 10 нуклеотидов в целевой области. Полученные трансгенные растения *N. benthamiana* и *A. thaliana*, конститутивно экспрессирующие ген *Cas9*, и те из кгРНК, которые в предварительных опытах по транзientной экспрессии компонентов системы CRISPR/Cas9 снижали уровень накопления вируса на >90%, демонстрировали устойчивость к ВСКВС. Интересно, что устойчивость коррелировала с уровнем экспрессии гена эндонуклеазы Cas9: в линиях с наибольшей экспрессией симптомы вирусной инфекции не выявляли, а вирусную ДНК не детектировали, тогда как в линиях с небольшим уровнем экспрессии гена *Cas9* развивались мягкие симптомы, и удавалось обнаружить незначительное количество вирусной ДНК [23].

Baltes et al. [24] получили трансгенные растения *N. benthamiana*, устойчивые к вирусу желтой карликовости бобов (ВЖКБ). Для поиска наиболее эффективной кгРНК были созданы два вектора. Один вектор был необходим для экспрессии модифицированного вирусного генома, в котором гены транспортного белка и белка оболочки вируса были заменены на последовательность гена зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ) под контролем промотора 35S. С другого вектора происходила экспрессия гена *Cas9* под контролем двойного промотора 35S и кгРНК – под контролем промотора AtU6 или At7SL. В работе было протестировано 11 кгРНК, 7 из которых были комплементарны участкам в составе протяженной межгенной регуляторной области

(long intergenic region, LIR) вирусного генома, необходимой для инициации репликации, а 4 – к участкам гена белка Rep, необходимого для репликации. Контролем служила конструкция, экспрессирующая кгРНК против вируса золотистой мозаики томатов (ВЗМТ). Через пять дней после совместной агроинфильтрации полученных конструкций оценивали уровень флуоресценции ЗФБ, который составлял 5–87%. Интересно, что наименьшую активность демонстрировали кгРНК против области, примыкающей к шпильке в участке LIR, что могло быть обусловлено вторичной структурой данной области, препятствующей разрезанию. Показано, что при коэкспрессии двух кгРНК их совместная активность оказалась выше, чем при индивидуальной экспрессии этих кгРНК. кгРНК с наибольшей активностью были использованы для получения трансгенных растений *N. benthamiana*. При заражении вирусом полученных трансгенных растений симптомы инфекции отсутствовали, а содержание вируса в верхних системных листьях было в несколько раз ниже, чем в контрольных растениях, экспрессирующих только ген эндонуклеазы Cas9 [24].

Ali et al. [25] для создания растений с антивирусной устойчивостью использовали кгРНК, комплементарную консервативному участку геминивируса ТААТАТТАС в межгенной области (intergenic region, IR), участвующему в инициации репликации вирусной РНК, а также кгРНК, комплементарные последовательностям генов белка оболочки и репликазы. В работе использовали трансгенные растения *N. benthamiana*, экспрессирующие ген Cas9. Экспрессия гидовой РНК осуществлялась с вектора на основе вируса погрешности табака. Секвенирование вирусных ДНК выявило индели в целевых областях генома. Интересно, что, хотя делеции локализовались в районе РАМ-сайта, их расположение и протяженность заметно варьировали: они могли находиться слева и справа от РАМ-сайта или включать участок РАМ-сайта, и составляли 2–56 нуклеотидов [25]. Выбор «универсальной» IR-кгРНК позволил получить трансгенные растения, устойчивые сразу к трем геминивирусам – вирусу желтой курчавости листьев томатов (ВЖКЛТ), ВСКВС и вирусу мозаики мерремии (ВММ). Дальнейшие исследования этой группы были посвящены детальному изучению способности комплекса Cas9–кгРНК вносить индели в кодирующую и некодирующую области генома, эффективности данной технологии против разных штаммов вирусов и вирусов с одно- и двухкомпонентным ДНК-геномом, а также возможности вирусов избегать редактирующего действия комплекса Cas9–кгРНК [26]. В случае одноком-

понентного генома кокрановского вируса курчавости листьев хлопка (КВКЛХ) делеции были обнаружены в кодирующей области, но не в межгенной области IR, тогда как делеции в области IR были выявлены у вируса мозаики мерремии с двухкомпонентным геномом. Возможно, трехмерная структура этого участка генома (шпилька) препятствует каталитической активности Cas9. Анализ чувствительности разных штаммов ВЖКЛТ к активности комплекса Cas9–IR–кгРНК показал, что у штамма, вызывающего более суровые симптомы, делеции в межгенной области IR не были обнаружены. Поскольку межгенная область необходима для инициации репликации, можно предположить, что использование каталитически неактивной Cas9 может ингибировать репликацию вируса. Важный вывод, который следует из настоящей работы, состоит в том, что система CRISPR/Cas9 эффективна при использовании кгРНК, комплементарных кодирующим и некодирующим последовательностям в вирусном геноме. Однако в первом случае при репарации разрывов ДНК по механизму NHEJ выявлена высокая вероятность образования вариантов вирусного генома, способных к репликации и дальнему транспорту по растению, т.е. способных избегать редактирования и даже приводить к появлению более жизнеспособных вариантов вируса. Напротив, использование кгРНК против некодирующих межгенных последовательностей обеспечивает противовирусную активность и значительно снижает вероятность появления вариантов вируса, способных к репликации. Кроме того, использование межгенной области вирусного генома в качестве целевой последовательности позволяет получить растения, устойчивые к нескольким геминивирусам, и, следовательно, может рассматриваться как перспективная стратегия для создания надежной и долговременной защиты растений от нескольких родственных вирусов. Интересно, что в отличие от небольших инделей, детектируемых при использовании кгРНК против кодирующих областей, в случае кгРНК против IR-области вирусов КВКЛХ и ВЖКЛТ были выявлены только длинные делеции размером 61–360 нуклеотидов [26]. Представленные данные суммированы в таблице.

Таким образом, продемонстрирована эффективность системы CRISPR/Cas9 для получения трансгенных растений, устойчивых к геминивирусам, на модельных растениях. Следующим шагом в этом направлении представляется создание на основе данной технологии трансгенных сельскохозяйственных растений и проведение полевых испытаний в естественных условиях [15]. Действительно, в опубликованной в

2018 г. работе были получены трансгенные томаты, устойчивые к ВЖКЛТ, который является одним из наиболее экономически важных патогенов томатов, поскольку может приводить к практически полной потере урожая. В ходе работы был получен вектор, экспрессирующий ген эндонуклеазы Cas9 под контролем промотора 35S и кгРНК под контролем промотора U6. кгРНК была подобрана к участкам вирусного генома — генам белка оболочки и репликазы. Всего было получено по шесть линий трансгенных томатов, стабильно экспрессирующих Cas9 и одну из кгРНК (или к гену белка оболочки, или к гену репликазы). Третье поколение homozygous растений анализировали на устойчивость к ВЖКЛТ. Показано, что вирус накапливается в крайне низких количествах, а делеции детектируются в целевой области вирусного генома [27] (таблица).

Вместе с тем подход с использованием трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих ген эндонуклеазы, имеет целый ряд недостатков. Во-первых, предполагается использовать ГМО, запрещенные к выращиванию в целом ряде стран. Во-вторых, постоянно экспрессирующийся ген *Cas9* может вызывать эффект *off-target*. Считается, что эта нежелательная активность белка Cas9 может быть сведена к минимуму при получении трансгенных растений, экспрессия гена эндонуклеазы в которых будет индуцироваться при вирусной инфекции или с помощью химических соединений [13, 14]. В настоящее время более перспективными представляются подходы, которые позволяют избежать создания трансгенных растений при применении технологии CRISPR/Cas9 — бесплазмидные способы доставки редактирующего рибонуклеопротеидного комплекса (РНП-комплекса) в клетки растений, описанные ниже.

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К РНК-СОДЕРЖАЩИМ ВИРУСАМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

До недавнего времени все функционально охарактеризованные системы CRISPR в качестве мишени использовали ДНК. Однако в 2013 г. в журнале *Nature* была опубликована работа, в которой было показано, что система Cas9 из *Francisella novicida* (FnCas9) имеет неканоническую функцию и с использованием уникальной малой РНК (мРНК, ассоциированной с CRISPR/Cas, scaРНК) регулирует экспрессию гена, кодирующего бактериальный липопротеин, путем дегра-

дации эндогенной мРНК (рис. 1, б). Угнетение синтеза липопротеина, запускающего врожденный иммунный ответ организма на инфекцию, усиливает вирулентность патогена [28]. В 2014 г. в исследовании, также опубликованном в журнале *Nature*, было показано в системе *in vitro*, что эндонуклеаза Cas9 из *S. pyogenes* вместе с гидовой РНК может связывать и расщеплять одноцепочечную РНК-мишень в присутствии экзогенного дезоксиолигонуклеотида, содержащего РАМ-сайт на 5'-конце [29].

При заражении РНК-содержащими вирусами (вирусом огуречной мозаики, ВОМ или вирусом табачной мозаики, ВТМ) трансгенных растений *A. thaliana* и *N. benthamiana*, конститутивно экспрессирующих ген *FnCas9* и кгРНК против выбранных участков вирусных геномов, развивались слабые симптомы вирусной инфекции и наблюдалось снижение уровня накопления вирусной РНК в системных симптоматических листьях [30] (таблица). Эффективность FnCas9 не зависела от последовательности РАМ-сайта: вне зависимости от состава тринуклеотидной последовательности, находящейся за целевой областью в районе РАМ-сайта, наблюдалось негативное влияние FnCas9 на накопление вируса. Мутагенез эндонуклеазы FnCas9 показал, что белок с точечными мутациями в ферментативном домене сохранял способность подавлять вирусную инфекцию, в то время как мутант с заменами аминокислотных остатков в РНК-связывающем домене (аргинин-богатый мотив, ARM) был не способен ингибировать накопление ВОМ. Таким образом, ингибирование вирусной инфекции в данном случае, видимо, было обусловлено блокированием репликации и/или трансляции вирусного генома за счет прямого связывания белка FnCas9 и вирусной РНК, а не за счет ее разрезания. Показано, что для эффективного действия белка FnCas9 необходима его цитоплазматическая локализация, а не ядерная, как в случае белка SpCas9, вносящего разрывы в ДНК. Полученная устойчивость наследовалась в потомстве [30]. Стоит также подчеркнуть, что цитоплазматическая активность эндонуклеазы FnCas9 не может привести ни к каким наследуемым неконтролируемым изменениям в геноме организма-хозяина, и потенциально снижает негативное влияние на геном. Система FnCas9—кгРНК, ингибирующая вирусную инфекцию за счет РАМ-независимого связывания РНК-мишени, может быть в перспективе использована для получения растений, устойчивых к любым РНК-содержащим вирусам.

Новые возможности для редактирования и специфического взаимодействия с РНК-мишенью и широкие перспективы прикладного

использования открылись после публикации 2016 г. в журнале Science, а в 2017 г. – в журнале Nature экспериментальных исследований, выполненных в лаборатории F. Zhang. В этих работах была продемонстрирована в системах *in vitro* и *in vivo* направляемая кГРНК РНКазная активность белка LshCas13a (первоначальное название белок C2c2) из *Leptotrichia shahii* и белка

LwaCas13a из *Leptotrichia wadei* [31, 32] (рис. 1, в). Показано, что экспрессия белка C2c2 совместно с кГРНК против литического РНК-содержащего фага MS2 в клетках *E. coli* приводила к устойчивости бактерий к фагу [31]. РНК-направляемая РНКазная активность белка C2c2 была подтверждена *in vitro*, также было доказано, что белок C2c2 не обладает ДНКазной активностью. Белки

Примеры растений с устойчивостью к патогенам, полученные с помощью CRISPR/Cas-технологии

| Растение | Вирус | Систематическое положение вируса, семейство | Система CRISPR/Cas, редактируемая область вирусного генома/гена растения | Ссылки |
|---|--|---|---|---------------|
| <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> | вирус суровой курчавости верхушек свеклы (ВСКВС), ДНК-содержащий вирус | Geminiviridae | CRISPR/SpCas9; кГРНК против участков в составе кодирующих и некодирующих последовательностей вирусного генома | [23] |
| <i>N. benthamiana</i> | вирус желтой карликовости бобов (ВЖКБ), ДНК-содержащий вирус | | CRISPR/SpCas9; кГРНК против межгенной регуляторной области, необходимой для инициации репликации и против участков гена репликазы | [24] |
| <i>N. benthamiana</i> | вирус желтой курчавости листьев томатов (ВЖКЛТ), вирус суровой курчавости верхушек свеклы (ВСКВС), вирус мозаики мерремии (ВММ), ДНК-содержащие вирусы | | CRISPR/SpCas9; кГРНК, комплементарные консервативному участку геминивирусов ТААТАТТАС в межгенной некодирующей области и последовательностям генов белка оболочки и репликазы | [25, 26] |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | вирус желтой курчавости листьев томатов (ВЖКЛТ) | | CRISPR/SpCas9; кГРНК против последовательностей генов белка оболочки и репликазы | [27] |
| <i>A. thaliana</i> , <i>N. benthamiana</i> | вирус огуречной мозаики (ВОМ), РНК-содержащий вирус; вирус табачной мозаики (ВТМ), РНК-содержащий вирус | Bromoviridae, Virgaviridae | CRISPR/FnCas9; кГРНК против кодирующих и некодирующих последовательностей вирусного генома | [30] |
| <i>Cucumis sativus</i> | вирус пожелтения жилок огурца (ВПЖО), РНК-содержащий вирус вирус желтой мозаики цуккини (ВЖМЦ) и вирус кольцевой пятнистости папайи (ВКПП), РНК-содержащие вирусы | Potyviridae | CRISPR/SpCas9; кГРНК, комплементарные 5'- и 3'-концевым участкам гена <i>eIF4E</i> растения | [35] |
| <i>A. thaliana</i> | вирус мозаики турнепса (ВМТ), РНК-содержащий вирус | | CRISPR/SpCas9; кГРНК комплементарные 5'-концевому участку гена <i>eIF4E</i> растения | [36] |
| Растение | Бактерия | Систематическое положение | Система CRISPR/Cas, редактируемый ген растения | Ссылки |
| <i>Citrus sinensis</i> <i>Osbeck</i> | <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> | Proteobacteria/ Gammaproteobacteria | CRISPR/SpCas9; модифицирован промотор гена <i>CsLOB1(LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1)</i> | [45] |
| Растение | Гриб | Систематическое положение | Система CRISPR/Cas, редактируемый ген растения | Ссылки |
| <i>Oryza sativa</i> | <i>Magnaporthe oryzae</i> | Ascomycota/ Sordariomycetes | CRISPR/SpCas9; редактирован ген <i>OsERF922</i> | [46] |

Cas13a имеют два ферментативных домена HEPN (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domains), ключевую роль в активности которых играют консервативные остатки аргинина и гистидина. В результате мутаций этих остатков образуется каталитически неактивный белок, специфически и эффективно взаимодействующий с РНК-мишенью. В работе также была обнаружена высокая *off-target*-активность комплекса после активации целевой последовательностью, которая приводила к замедлению роста бактерий. Предполагается, что подобная неконтролируемая нецелевая активность в дальнейшем может быть использована для запуска клеточной гибели после проникновения вируса в бактерию [31]. В работе 2017 г. получены детальные биохимические характеристики системы CRISPR–LwaCas13a, которая оказалась значительно активнее системы CRISPR–LshCas13a. В этой работе была оценена способность белка LwaCas13a разрезать транскрипты в клетках животных и растений (*Oryza sativa*) и показано, что эффективность системы CRISPR–LwaCas13a в выключении экспрессии генов сопоставима или выше наблюдаемой при РНК-интерференции, но со значительно меньшим *off-target*-эффектом. Подтверждено, что каталитически неактивный белок LwaCas13a может использоваться как программируемый РНК-связывающий белок. Кроме того, показана возможность доставки различных геновых РНК в клетки для редактирования CRISPR–LwaCas13a одновременно нескольких транскриптов (мультиплексное выключение) [32].

С течением времени и накоплением экспериментальных результатов две стратегии – связывания или расщепления РНК-мишени (системы FnCas9 или Cas13a соответственно) – могут быть успешно адаптированы для обеспечения устойчивости растений к любому РНК-содержащему вирусу с известной последовательностью. Существенно, что платформы типа CRISPR–LwaCas13a позволяют получать растения, устойчивые к нескольким вирусам.

МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ

Платформа CRISPR/Cas9 также может использоваться для изменения уровня экспрессии генов растения-хозяина, которые контролируют резистентность или восприимчивость к вирусной инфекции. Известно, что для трансляции РНК-содержащих потивирусов необходимо взаимодействие эукариотического фактора инициации трансляции 4E (eIF4E или его изоформы eIF(iso)4E) с белком VPg, ковалентно связан-

ном с 5'-концом геномной РНК вируса. Природная устойчивость к потивирусам чаще всего обусловлена наличием мутации в белке eIF4E/eIF(iso)4E, препятствующей его взаимодействию с VPg [33, 34]. В работе Chandrasekaran et al. [35] была использована конструкция на основе бинарного вектора pRCS, где под контролем промотора 35S экспрессировался ген *Cas9*, а под контролем промотора AtU6 – последовательности кгРНК, комплементарные 5'- и 3'-концам гена *eIF4E*. С помощью этих конструкций были получены трансгенные растения огурца, в которых экспрессия системы *Cas9*/кгРНК приводила к делециям в гене *eIF4E*. Дальнейшее их скрещивание с растениями дикого типа привело к получению растений, несущих делеции в гене *eIF4E*, но без чужеродных последовательностей гена *Cas9* и кгРНК. Эти растения были устойчивы к потивирусам – вирусу пожелтения жилок огурца (ВПЖО), вирусу желтой мозаики цукини (ВЖМЦ) и вирусу кольцевой пятнистости папайи (ВКПП) [35]. Аналогично, Puott et al. на основе бинарного вектора pDE-Cas9, получили конструкцию pDE-Cas9-sgAteIF(iso)4E, экспрессирующую ген эндонуклеазы *Cas9* и последовательность кгРНК к 5'-концу гена *eIF(iso)4E* *A. thaliana* (к участку +15+35 от старта трансляции) под контролем промоторов PcUbi4-2 и AtU6-26 соответственно. С помощью этих конструкций были созданы трансгенные растения арабидопсиса, анализ ДНК которых с помощью энзиматического теста T7E1 подтвердил наличие делеций в выбранном участке гена *eIF(iso)4E*. В дальнейшем путем скрещивания с растениями дикого типа были получены растения, не экспрессирующие ген *Cas9* и последовательность кгРНК, однако проявляющие устойчивость к потивирусу – вирусу мозаики турнепса (ВМТ) (таблица) [36].

В обеих исследовательских группах были созданы трансгенные растения, которые при дальнейшем скрещивании с растениями дикого типа утрачивали чужеродные последовательности, экспрессирующие ген *Cas9* и кгРНК. Полученные растения обладали устойчивостью к выбранным вирусам, однако не являлись трансгенными. Таким образом, реализовав некоторые подходы к редактированию генома, можно получить нетрансгенные растения с необходимыми характеристиками. Тем не менее вопрос о том, следует ли рассматривать растения, полученные с помощью CRISPR/Cas технологии, ГМО или нет, все еще остается неразрешенным [37, 38].

Следует отметить, что скрещивание с растениями дикого типа для получения растений с определенными характеристиками, но не несущих чужеродную последовательность, возможно не для всех видов. Так, для растений с длин-

ным жизненным циклом, многолетних растений или растений, размножающихся вегетативно, такой подход затруднителен или даже не возможен. Поэтому были предложены альтернативные варианты редактирования генома, минуя стадию получения трансгенного растения.

БЕСПЛАЗМИДНАЯ ДОСТАВКА РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНОГО КОМПЛЕКСА Cas9–кгРНК КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ОТКАЗАТЬСЯ ОТ СОЗДАНИЯ ГМО

Клетки растений окружены плотной клеточной стенкой, которая является препятствием для применения методов липофекции, микроинъекции или электропорации, которые широко используются при редактировании генома в клетках человека и животных. Наиболее распространенным и простым методом редактирования генов растений является метод агробактериальной трансформации клеток/тканей растения плазмидами для конститутивной экспрессии гена белка Cas9 и последовательности кгРНК. Другой распространенный способ доставки – это бомбардмент клеток или протопластов растений ДНК-конструкциями, которые сорбированы на микрочастицах золота или вольфрама. Результатом этих подходов является получение трансгенных растений, несущих чужеродную ДНК, практическое применение которых регламентируется правилами, регулируемыми использованием ГМО.

В последние годы активно разрабатываются альтернативные бесплазмидные способы доставки кгРНК и белка Cas9 в клетки растений, исключая использование векторных систем [39, 40]. Таким способом является доставка предварительно собранного ферментативного РНП-комплекса Cas9–кгРНК непосредственно в клетки растения. РНП-комплексы могут доставляться в протопласты растений с помощью трансфекции. В незрелые эмбриональные клетки растений, в клетки каллуса и эпидермиса можно доставить редактирующий РНП-комплекс с помощью бомбардмента функционализированными микрочастицами золота, вольфрама или мезопоровыми кремниевыми наночастицами [21, 41–44]. Например, в работе Svitashv et al. [41] с использованием метода бесплазмидной доставки были успешно отредактированы четыре гена интереса в эмбриональных клетках кукурузы. Комплекс рекомбинантного белка Cas9 и транскрибированной *in vitro* кгРНК был сорбирован на микрочастицах золота и доставлен в клетки путем бомбардмента с использованием

гелиевой генной пушки. Процент растений-регенерантов, несущих мутации как минимум в одном аллеле в целевой области генома составлял 2,4–9,7%, а количество растений с биаллельными мутациями – 0,3–3%. *Off-target*-редактирование по одному из генов составило 0%, а по другому – 2% (с мутацией как минимум в одном аллеле) и 0,4% (с мутацией в двух аллелях), что было существенно ниже, чем при редактировании с использованием плазмидной ДНК [41].

Преимущество такого подхода (технологии без использования ДНК, DNA-free technology) заключается в отсутствии ДНК-молекулы, которая интегрируется в геном в непредсказуемом месте, и с которой происходит конститутивная экспрессия гена Cas9, приводящая с определенной вероятностью к *off-target*-редактированию. Другим достоинством доставки РНП-комплекса Cas9–кгРНК является оперативное редактирование генома и быстрая деградация комплекса в клетке, что также снижает вероятность нежелательных нецелевых воздействий [39, 40]. Бесплазмидные способы доставки редактирующего комплекса являются перспективными и предпочтительными, поскольку позволяют получать растения с заданными свойствами, но не попадающие под действие законов об ограничении распространения ГМО.

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ДРУГИМ ПАТОГЕНАМ (БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИЯМ), С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas

Особый интерес представляют работы по созданию устойчивых к патогенам растений с использованием клеточных генов, которые участвуют в защитном ответе растений на биотические стрессы. Это направление представляется наиболее перспективным для создания растений, устойчивых к множественным патогенам различной природы и абиотическим стрессам, характерным для естественных условий выращивания растений.

Получены трансгенные растения апельсина (*Citrus sinensis* Osbeck) с повышенной устойчивостью к язве цитрусовых, которая вызывается бактерией *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Хсц) [45]. *X. citri* является злейшим патогеном цитрусовых, распространенным во всех регионах их произрастания и вызывающим значительные потери урожая. Растения, зараженные *X. citri*, имеют характерные повреждения на листьях, стеблях, плодах. На зараженных участках формируются

приподнятые над поверхностью листа пустулы коричневого цвета, окруженные характерным пропитанным водой кольцом светлого цвета. Со временем пустулы подсыхают и формируют корку. С помощью технологии CRISPR/Cas9 был модифицирован промотор гена *CsLOB1* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1*), отвечающего за восприимчивость к этой бактерии. Промотор этого гена содержит участок связывания основного эффектора бактерии — белка PthA4 (effector binding element, EBE PthA4). Взаимодействие эффекторной молекулы с участком промотора активирует экспрессию гена *CsLOB1*, что приводит к образованию пустулы.

В работе использовали пять кгРНК, затрагивающих область EBE PthA4. Были получены плазмиды, экспрессирующие под контролем промотора 35S последовательность гена *Cas9* и под контролем промотора AtU6 — последовательность кгРНК. Трансгенные растения получали с помощью агробактериальной трансформации сегментов эпикотили. Первичный отбор трансформированных эксплантов осуществляли на селективной среде, содержащей канамицин. Показано, что мутации в целевой области выявлялись у 11,5–64,7% трансгенных растений в зависимости от использованной кгРНК. Среди мутантов было выявлено 28 химерных растений, 2 биаллельных, 2 гомозиготных и 2 гетерозиготных растения. Среди мутаций преобладали делеции (60,5%) длиной от 1 до 50 нуклеотидов. Число растений с инсерциями (20,9%) и заменами (18,6%) в целевой области генома было практически одинаковым. Для дальнейшей работы было отобрано несколько линий с мутациями в промоторной области и пониженным уровнем экспрессии гена *CsLOB1*. Данные растения проявляли повышенную устойчивость к *X. citri*, которая выражалась в меньшей площади повреждения и более позднем разрыве пустул, которые не развивались в характерные новообразования, типичные для язвы цитрусовых. На двух линиях пустулы не развивались вообще [45].

Получены растения риса с редактированным геном *OsERF922*, проявляющие устойчивость к аскомицету *Magnaporthe oryzae* [46]. *M. oryzae* — филаментный паразитический гриб, поражающий в основном злаковые культуры. Первичные симптомы — появление белых или светло-зеленых пятен с темными границами. В дальнейшем пятна приобретают эллиптическую или веретеновидную форму, сливаются и поражают весь лист. *M. oryzae* является одним из основных патогенов риса, инфицирование которым приводит к значительному снижению его урожайности. Ген *OsERF922* принадлежит суперсемейству транскрипционных факторов, зависящих от

этилена (ethylene responsive factors, ERF), которые участвуют в модуляции ответа на абиотические и биотические стрессы. Ранее было показано, что ген *OsERF922* является негативным регулятором устойчивости риса к *M. oryzae* [47]. В работе был получен бинарный вектор, в котором экспрессия гена *Cas9* находилась под контролем промотора 35S, а экспрессия последовательности кгРНК к началу гена *OsERF922* — под контролем промотора OsU6a. С помощью агробактерий трансформировали каллус риса, и первоначальный отбор регенерантов проводили на селективной среде, содержащей гигромицин. Получено 50 трансгенных проростков, из которых у 21 растения детально анализировали сайт редактирования. Среди проанализированных растений у 16 (76%) оказались биаллельные мутации, три растения были гомозиготными, одно — гетерозиготным и одно — химерным. Более половины всех мутаций (64%) являлись делециями, 24% — инсерциями, 12% содержали делеции и инсерции одновременно. В дальнейшем проводилось два последовательных самоопыления растений и анализ потомства, что позволило показать, что модификации в гене *OsERF922* с применением технологии CRISPR/Cas стабильны и наследуются. С помощью генетического анализа было отобрано шесть гомозиготных линий, отредактированных по гену *OsERF922*, но не содержащих последовательности *Cas9*–кгРНК. Мутантные линии показали высокую устойчивость к инфицированию *M. oryzae*: площадь повреждения листовой пластинки оказалась значительно меньше по сравнению с поврежденными, развивавшимися на листьях растений дикого типа, для которых было характерно практически полное повреждение листа и его дальнейшая некротизация. Мутантные линии растений также были проанализированы по важным агрономическим показателям. Оказалось, что такие показатели как высота растений, длина и ширина листа, количество продуктивных метелок, длина метелки, количество зерен на метелку, вес семян статистически не отличались от таких же показателей здоровых растений дикого типа [46].

Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к патогенам, только начинается. Вместе с тем в мировой науке наблюдается взрывной рост числа исследований по идентификации генов, ответственных за полезные признаки растений, на основе платформы CRISPR/Cas (функциональная геномика). Весьма вероятно, что в ближайшее время также увеличится число работ по созданию сельскохозяйственных культур с улучшенными

признаками для практического применения в растениеводстве, в т.ч. резистентных к патогенам и абиотическим стрессам. В частности, можно полагать, что усилия исследователей будут направлены на получение растений с множественной устойчивостью, резистентных не только к отдельным вирусам, но к группам вирусов, к патогенным бактериям и грибам, наносящим значительный экономический ущерб урожаям.

Обнаружение системы адаптивного иммунитета бактерий открыло огромные возможности для биотехнологического применения технологий на основе платформы CRISPR/Cas [48]. Число биоинформатически предсказанных систем CRISPR/Cas стремительно расширяется [49–51]. Вместе с тем экспериментально изучены свойства только некоторых из предсказанных систем [52]. Открытие и характеристика новых систем CRISPR/Cas несомненно приведет к дальнейшему развитию разнообразных биотехнологических приложений.

Практическое применение платформы CRISPR/Cas развивается по целому ряду направлений: происходит адаптация охарактеризованных

систем к решению конкретных задач [53, 54], оптимизируются методы дизайна и синтеза генов РНК [10], совершенствуются способы доставки редактирующего комплекса в клетки. Бесплазмидная доставка предварительно собранного комплекса является важным направлением, позволяющим создание устойчивых к патогенам растений, которые не содержат в своем геноме чужеродную ДНК, т.е. не являются ГМО [39, 40].

Принципиально значимым является выявление генов/последовательностей в качестве эффективных мишеней для редактирования. Например, показано, что разрезание консервативных некодирующих участков в геноме вируса может приводить к устойчивости против различных вирусов данной таксономической группы. Система Cas13a перспективна для воздействия не только на геном РНК-содержащих вирусов, но и на геном ДНК-содержащих вирусов путем разрезания их целевых транскриптов (вирусспецифических мРНК) (рис. 2). Апробирован вариант мультиплексного редактирования РНК. Возможно, дальнейшая разработка подобных подходов позволит предложить метод защи-

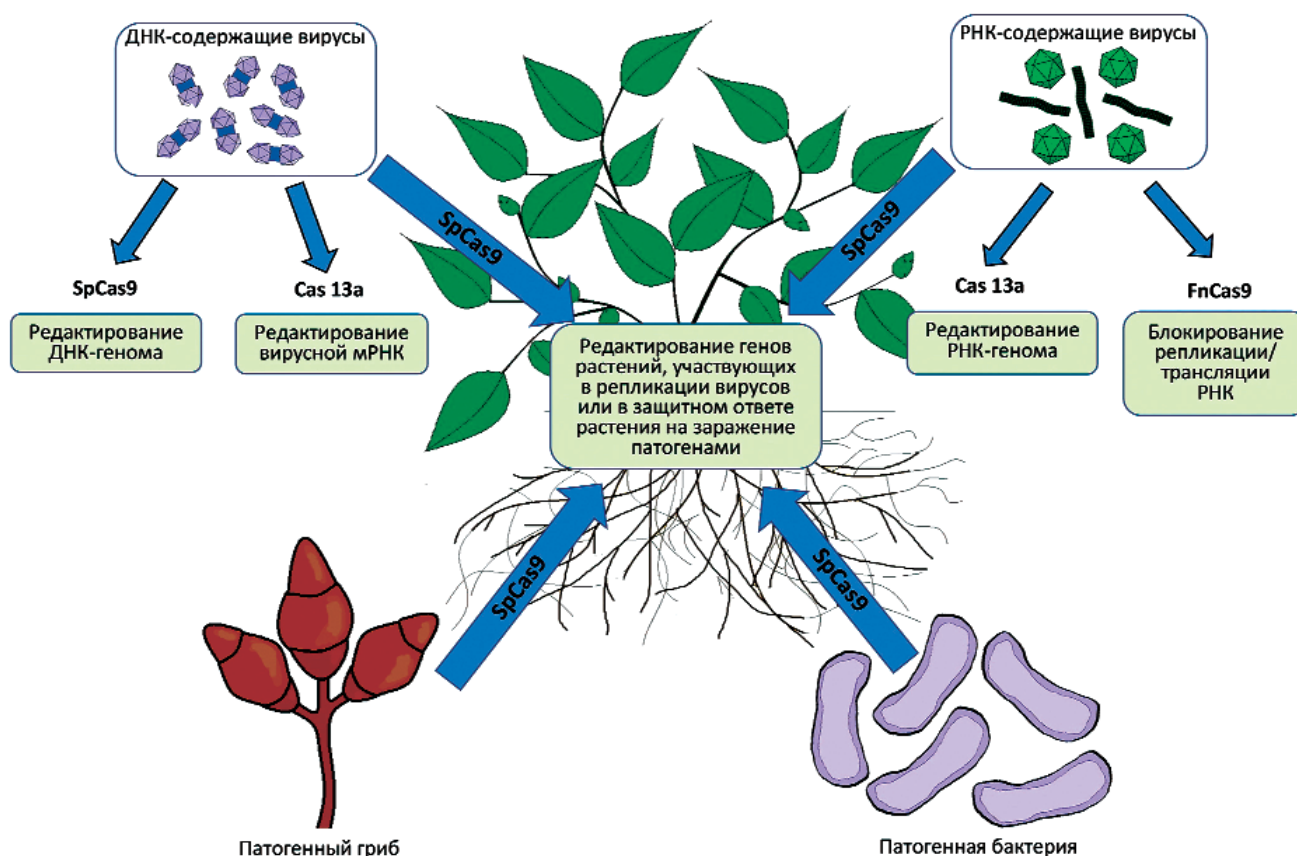


Рис. 2. Стратегии получения растений, резистентных к патогенам, с использованием технологии CRISPR/Cas для редактирования/модификации геномов ДНК- и РНК-содержащих вирусов и генов растения-хозяина, участвующих в репликации вирусов или в защитном ответе растения на заражение вирусами, бактериями или грибами

ты от вирусов и других патогенов, альтернативный методу РНК-интерференции. Использование прокариотической платформы CRISPR/Cas предполагает, что создаваемая устойчивость будет более эффективна, поскольку у вирусов нет механизмов, позволяющих избегать ингибирующего эффекта этой системы, в отличие от системы РНК-интерференции.

В настоящее время перспективным представляется редактирование клеточных генов, участвующих в жизненном цикле патогена или отвечающих за резистентность/чувствительность растений к патогенам. Проводится генетический скрининг клеточных факторов, способствующих или, напротив, препятствующих репликации и распространению патогена [55]. Предполагается, что использование возможностей систем CRISPR/Cas позволит ускорить выявление факторов устойчивости или чувствительности к патогенам. В данном обзоре приведены примеры успешного создания резистентных к патогенам растений путем редактирования клеточных генов, как необходимых для репликации вирусов, так и генов, вовлеченных в защитный ответ растения на заражение бактерией или патогенным грибом (рис. 2). На современном этапе новые технологии редактирования генома с целью дизайна генов открывают широкие возможности создания новой генерации генов устойчивости. Наиболее перспективными представляются: направленный мутагенез генов специфической устойчивости для придания им более широкого спектра действия и использование генов неспецифической или «нехозяйской» устойчивости (non-host resistance) [56, 57], идентификация которых только начинается, что в будущем, возможно, позволит получать расте-

ния, устойчивые к неродственным вирусам, другим патогенам и даже к абиотическим стрессам. Новым источником неизвестных факторов, вовлеченных в разнообразные сигнальные пути защитного ответа растения на биотические и абиотические стрессы, является клеточное ядро [58, 59]. Ранее нами было показано, что ядерный белок растений — коилин — вовлечен в ответ растения на заражение вирусами разных таксономических групп [60]. Наши предварительные результаты демонстрируют, что растения картофеля с отредактированным геном коилина с применением системы CRISPR/Cas9 проявляют повышенную устойчивость к заражению Y-вирусом картофеля и некоторым абиотическим стрессам.

Таким образом, использование систем CRISPR/Cas предполагает несколько альтернативных подходов для придания растениям устойчивости к патогенам. Будущие исследования должны показать, какие из предложенных стратегий будут наиболее эффективны для создания стабильных сортов/линий сельскохозяйственных растений, устойчивых к патогенам различной природы и, возможно, способных преодолевать экологические стрессы.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-16-04019).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palukaitis, P., Groen, S.C., and Carr, J.P. (2013) The Rumsfeld paradox: some of the things we know that we don't know about plant virus infection, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**, 513–519.
2. FAO, WFP, IFAD (2012) The state of food insecurity in the world 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. FAO, Rome.
3. Sudarshana, M.R., Roy, G., and Falk, B.W. (2007) Methods for engineering resistance to plant viruses, *Plant-Path. Inter. Methods Mol. Biol.*, **354**, 183–195.
4. Reddy, D.V.R., Sudarshana, M.R., Fuchs, M., Rao, N.C., and Thottappilly, G. (2009) Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects, *Adv. Virus Res.*, **75**, 185–220.
5. Palukaitis, P. (2012) Resistance to viruses of potato and their vectors, *Plant Pathol.*, **28**, 248–258.
6. Arif, M., Azhar, U., Arshad, M., Zafar, Y., Mansoor, S., and Asad, S. (2012) Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato, *Transgen. Res.*, **21**, 303–311.
7. Wright, A.V., Nunez, J.K., and Doudna, J.A. (2016) Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering, *Cell*, **164**, 29–44.
8. Shmakov, S.A., Sitnik, V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Severinov, K.V., and Koonin, E.V. (2017) The CRISPR spacer space is dominated by sequences from species-specific mobilomes, *MBio*, **8**, e01397-17.
9. Weeks, D.P., Spalding, M.H., and Yang, B. (2016) Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants, *Plant Biotech.*, **14**, 483–495.
10. Mohanta, T.K., Bashir, T., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., and Bae, H. (2017) Genome editing tools in plants, *Genes*, **8**, 399.
11. Dominguez, A.A., Lim, W.A., and Qi, L.S. (2016) Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 5.

12. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 1709–1712.
13. Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. (2015) Boosting plant immunity with CRISPR/Cas, *Gen. Biol.*, **16**, 254.
14. Zaidi, S.S.E.A., Mansoor, S., Ali, Z., Tashkandi, M., and Mahfouz, M. M. (2016) Engineering plants for geminivirus resistance with CRISPR/Cas9 system, *Trends Plant Sci.*, **21**, 279–281.
15. Khatodia, S., Bhatotia, K., and Tuteja, N. (2017) Development of CRISPR/Cas9 mediated virus resistance in agriculturally important crops, *Bioengineered*, **8**, 274–279.
16. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, 1231143.
17. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 1225829.
18. Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., and Joung, J.K. (2014) Improving CRISPR–Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs, *Nat. Biotech.*, **32**, 279–284.
19. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., and Liu, D.R. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity, *Nat. Biotech.*, **31**, 839–843.
20. Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases, *Genome Res.*, **24**, 132–141.
21. Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Falt, A.S., Ohlsson, P., Gonzalez, M.N., Samuelsson, M., and Hofvander, P. (2018) Genome editing in potato via CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein delivery, *Physiol. Plant.*, **1**, 12731.
22. Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., and Wang, Y. (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Nat. Commun.*, **8**, 14261.
23. Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., and Gao, C. (2015) Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants, *Nat. Plants*, **1**, 15144.
24. Baltes, N.J., Hummel, A.W., Konecna, E., Cegan, R., Bruns, A.N., Bisaro, D.M., and Voytas, D.F. (2015) Confering resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system, *Nat. Plants*, **1**, 15145.
25. Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M., and Mahfouz, M.M. (2015) CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants, *Gen. Biol.*, **16**, 238.
26. Ali, Z., Ali, S., Tashkandi, M., Zaidi, S.S.E.A., and Mahfouz, M.M. (2016) CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion, *Sci. Rep.*, **6**, 26912.
27. Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A., and Mahfouz, M.M. (2018) Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/237735>.
28. Sampson, T.R., Saroj, S.D., Llewellyn, A.C., Tzeng, Y.L., and Weiss, D.S. (2013) A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence, *Nature*, **497**, 254.
29. O'Connell, M.R., Oakes, B.L., Sternberg, S.H., East-Seletsky, A., Kaplan, M., and Doudna, J.A. (2014) Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9, *Nature*, **516**, 263.
30. Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., Ma, S., and Zhou, G. (2018) Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system, *Plant Biotech.*, **1**, 1415–1423.
31. Abudayyeh, O., Gootenberg, J., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I.M., Cox, D.B., Shmakov, S., Makarova, K.S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E.S., Koonin, E.V., and Zhang, F. (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, *Science*, **353**, 5573.
32. Abudayyeh, O., Gootenberg, J.S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J.J., Verdine, V., Cox, D.B.T., Kellner, M.J., Regev, A., Lander, E.S., Voytas, D.F., Ting, A.Y., and Zhang, F. (2017) RNA targeting with CRISPR–Cas13, *Nature*, **550**, 280.
33. Robaglia, C., and Caranta, C. (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection, *Trends Plant Sci.*, **11**, 40–45.
34. Estevan, J., Marena, A., Callot, C., Lacombe, S., Moretti, A., Caranta, C., and Gallois, J.-L. (2014) Specific requirement for translation initiation factor 4E or its isoform drives plant host susceptibility to *Tobacco etch virus*, *BMC Plant Biol.*, **14**, 67.
35. Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., and Gal-On, A. (2016) Development of broad virus resistance in nontransgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology, *Mol. Plant Pathol.*, **17**, 1140–1153.
36. Pyott, D.E., Sheehan, E., and Molnar, A. (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants, *Mol. Plant Pathol.*, **17**, 1276–1288.
37. Jones, H.D. (2015) Regulatory uncertainty over genome editing, *Nat. Plants*, **1**, 14011.
38. Sprink, T., Eriksson, D., Schiemann, J., and Hartung, F. (2016) Regulatory hurdles for genome editing: process-vs. product-based approaches in different regulatory contexts, *Plant Cell Rep.*, **35**, 1493–1506.
39. Kanchiswamy, C.N. (2016) DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement, *Plant Cell Rep.*, **35**, 1469–1474.
40. Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Velasco, R., Kim, J.S., and Viola, R. (2015) Non-GMO genetically edited crop plants, *Trends Biotech.*, **33**, 489–491.
41. Svitashov, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K., and Cigan, M. (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Nat. Comm.*, **7**, 13274.
42. Martin-Ortigosa, S., Peterson, D.J., Valenstein, J.S., Lin, V.S.Y., Trewyn, B.G., Lyznik, L.A., and Wang, K. (2013) Mesoporous silica nanoparticle mediated intracellular Cre protein delivery for maize genome editing via loxP sites excision, *Plant Phys.*, 233650.
43. Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalan, C., Cho, S.W., Kim, H., and Corvalan, C. (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR–Cas9 ribonucleoproteins, *Nat. Biotech.*, **33**, 1162.
44. Liang, G., Zhang, H., Lou, D., and Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing, *Sci. Rep.*, **6**, 21451.
45. Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., Yao, L., and Zou, X. (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene Cs LOB 1 promoter in citrus, *Plant Biotech.*, **15**, 1509–1519.
46. Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., Liu, Y.G., and Zhao, K. (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922, *PLoS One*, **11**, e0154027.

47. Liu, D., Chen, X., Liu, J., Ye, J., and Guo, Z. (2012) The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance, *J. Exp. Bot.*, **63**, 3899–3911.
48. Knott, G.J., and Doudna, J.A. (2018) CRISPR–Cas guides the future of genetic engineering, *Science*, **361**, 866–869.
49. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen, R., and Koonin, E.V. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 722–736.
50. Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Severinov, K., Zhang, F., and Koonin, E.V. (2017) Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 169–182.
51. Koonin, E.V., Makarova, K.S., and Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR–Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 67–78.
52. Murugan, K., Babu, K., Sundaresan, R., Rajan, R., and Sashital, D.G. (2017) The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR–Cas toolkit, *Mol. Cell*, **68**, 15–25.
53. Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR–Cas9 for genome engineering, *Cell*, **157**, 1262–1278.
54. Sternberg, S.H., Richter, H., Charpentier, E., and Qimron, U. (2016) Adaptation in CRISPR–Cas systems, *Mol. Cell*, **61**, 797–808.
55. Wang, A. (2015) Dissecting the molecular network of virus–plant interactions: the complex roles of host factors, *Ann. Rev. Phytopath.*, **53**, 45–66.
56. Gill, U.S., Lee, S., and Mysore, K.S. (2015) Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals, *Phytopathology*, **105**, 580–587.
57. Lee, S., Whitaker, V.M., Hutton, S.F. (2016) Mini review: potential applications of non-host resistance for crop improvement, *Front. Plant Sci.*, **7**, 997.
58. Love, A.J., Yu, C., Petukhova, N.V., Kalinina, N.O., Chen, J., and Taliansky, M.E. (2017) Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses, *RNA Biol.*, **14**, 779–790.
59. Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J., and Taliansky, M. (2018) The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses, *Front. Plant Sci.*, **9**, 132.
60. Shaw, J., Love, A.J., Makarova, S.S., Kalinina, N.O., Harrison, B.D., and Taliansky, M.E. (2014) Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa, *Nucleus*, **5**, 85–94.

THE CRISPR/Cas SYSTEM APPLICATION FOR GENERATION OF PLANTS RESISTANT TO PATHOGENS

**S. S. Makarova^{1,2}, A. V. Khromov^{1,2}, N. A. Spechenkova³,
M. E. Taliansky^{1,3}, and N. O. Kalinina^{1,2,3*}**

¹ *Doka-Gene Technology Ltd., 141880 Rogachevo, Moscow Region, Russia; E-mail: mail@dokagene.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: kalinina@genebee.msu.ru*

³ *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia; E-mail: office@ibch.ru*

Received July 11, 2018

Revision received September 7, 2018

Accepted September 7, 2018

Recent applications of prokaryotic adaptive immune system CRISPR/Cas9 have led to real breakthrough in precise genome editing of eukaryotes. CRISPR/Cas technology allows to generate organisms with desirable characteristics by introducing deletions/insertions into selected genome sites, which leads to the knockdown or modification of target genes. This review focuses on the current state of CRISPR/Cas applications for generation of plants resistant to virus, bacterium and parasitic fungus. Resistance to DNA- and RNA-containing viruses is usually provided by generation of transgenic plants expressing the Cas endonuclease gene and short guide RNAs targeting certain sites of the viral or plant-host genomes. Such approaches lead to direct cleavage of virus genome or modification of the plant-host genome decreasing efficiency of virus replication. The editing of the plant genes involved in a defense response to infection with pathogens increases the resistance of plants to the bacterium and pathogenic fungus. The review explores the strategies and perspectives of the development of pathogen-resistant plants with a focus on the ways for production of non-transgenic (non-genetically modified) plants, in particular using plasmid (DNA)-free systems for delivery the editing complex, containing Cas/short guide RNA, into plant cells.

Keywords: plants, CRISPR/Cas system, genome editing, plant viruses, bacterium, fungus, resistance to pathogen infection