

Съвременна селекция на растения по системата CRISPR-Cas

от д-р Джефри Сандър¹ и д-р Марк Джечке²

Общ преглед

- Много бактерии се предпазват от нахлуването на вируси с помощта на адаптивни имунни системи, наречени CRISPR-Cas. Тези CRISPR-Cas системи могат да разпознават генетични последователности (секвенции), специфични за тези на вредителите и ги съкращават или „изрязват“.
- Предназначението на CRISPR-Cas превръща тази система в молекулярни ножници, които функционират в определени места от растителния геном. След коригиране на структурата от ендегенния възстановителен механизъм на клетката може да се въведат точни промени на конкретното място.
- CRISPR-Cas, като усъвършенстван инструмент за размножаване на растения, предвещава добри перспективи и потенциал. Тя може да улесни прецизното развъждане на културите, като работи с характеристиките в рамките на културата – един процес, който често е наричан „редактиране на геном“.
- DuPont Pioneer е световен лидер в приложенията на CRISPR-Cas за усъвършенстване на растителната селекция и в момента разработва първия си CRISPR-Cas търговски продукт: восьмична царевица от следващото поколение, която да бъде първият земеделски продукт на пазара, разработен с помощта на CRISPR-Cas.
- Pioneer приветства възможността да си сътрудничи с други компании, за да се реализира пълният потенциал на технологията за усъвършенстване на размножаване CRISPR-Cas. Като пример е учредено публично-частно партньорство с Международния център за подобряване качествата на царевицата и пшеницата (CIMMYT) за прилагането на CRISPR-Cas технологията, за да се отговори на нуждите на дребните земеделски производители от цял свят.



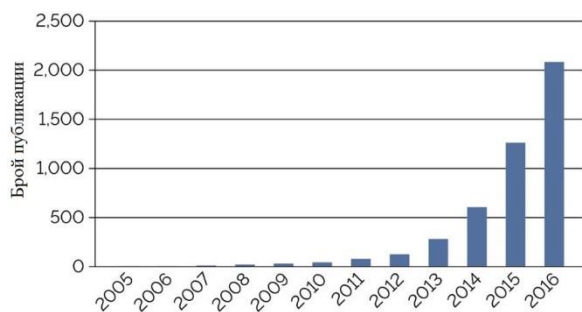
CRISPR-Cas има множество потенциални приложения в селското стопанство, вкл. увеличаване на добива, устойчивост на болести, устойчивост към суша и характеристики на крайния продукт.

Днес, благодарение на пробивите в областта на генното редактиране се ражда нова революция в областта на усъвършенстването на културите, което да се използва успоредно с вече съществуващи технологии. Редактирането на генома е процесът на нанасяне на целенасочени и точни промени в ДНК фрагментите, съставени от последователности от четири нуклеотидни бази (цитозин, гуанин, аденин и тимин), които съдържат гени и други геномни характеристики, определящи характеристиките и многообразието на растителните видове. Докато реалното изпълнение на CRISPR-Cas е по-комплексен процес, то е концептуално близо до редактирането на текстови документи с помощта на текстообработваща програма. В тази аналогия инструментът CRISPR-Cas е курсорът, който може да бъде насочен към желаното място в текста. Поставянето на този курсор позволява да изтриете, промените или въведете букви или дори думи в избраното местоположение, като по този начин се постига подобряване на текста. По същия начин, чрез използване на CRISPR-Cas, могат да бъдат разглеждани собствените генетични последователности на растението, но и целенасочено променени, с цел достигане до желаните характеристики. Очаква се тази новаторска технология да помогне на учените да разработят иновативни и устойчиви решения за производителите, подобни на тези, реализирани чрез конвенционални практики в растениевъдството, но с още по-голямо качество, точност и съкратени срокове за внедряване.

Въведение

През цялата си над 90-годишна история Pioneer е лидер в увеличаването на селскостопанската производителност чрез подобряване на културите. След основаването си през 1926 г., тогава познатото като Hi-Bred Corn дружество поведе една истинска революция в селекцията на царевица чрез хибридизация, водеща до драстично увеличаване на добивите.

Голяма част от геномното редактиране е концентрирано около CRISPR-Cas, която се възприема бързо поради своите предимства в сравнение с други инструменти за редактиране на генома, що се отнася до качество, ефективност и техническа гъвкавост. CRISPR-Cas има много потенциални приложения, простиращи се далеч извън селското стопанство, и се радва на голям медиен интерес през последните няколко години, тъй като се наблюдава истински бум на изследванията в тази област (Фигура 1). Pioneer е лидер в селскостопанския отрасъл в областта на CRISPR-Cas и обяви намеренията си да представи на пазара първия търговски земеделски продукт, разработен чрез прилагане на CRISPR-Cas, в рамките на пет години, като сме в очакване на полевите изпитания и приложимите регулаторни оценки. Целта на този материал е да представи кратък преглед на историята на CRISPR-Cas, използването му като инструмент за редактиране на генома, и как Pioneer използва тази технология за по-бързото достигане на нова ера в усъвършенстване селекцията на културите.



Фигура 1. Научни публикации, свързани с CRISPR в PubMed, 2005-2016 (от 12-9-16, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

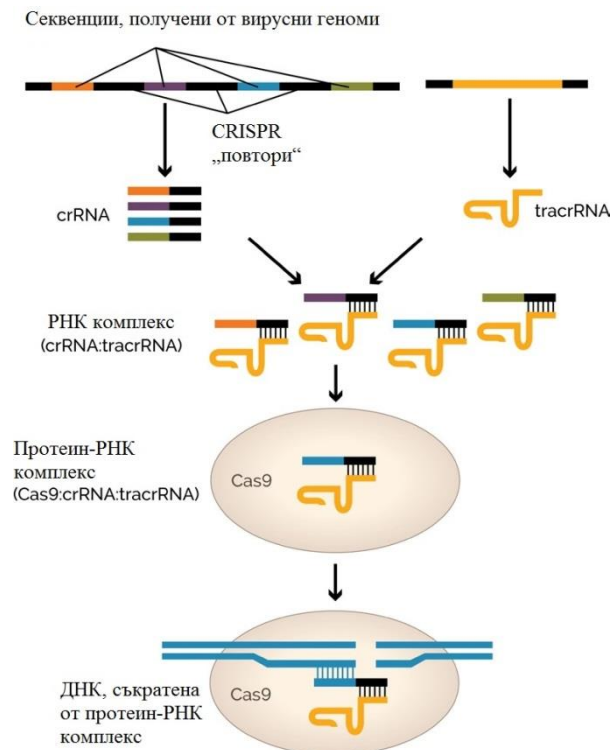
CRISPR-Cas: История

Първоначалното откритие на онова, което по-късно ще стане известно като CRISPR-Cas, бе съобщено през 1987 г. от изследователи в Япония, проучващи областта на генома Е.коли. Те откриват присъствието на пет еднакви повтарящи се ДНК секвенции, разделени с идентичен размер неповтарящи се ДНК секвенции. По това време откритието е прието като нещо любопитно, но все още е забулено в мистерия (Ishino et al., 1987). Тъй като все по-голям брой геноми биват секвенирани, тези повтарящи се функции са наблюдавани в множество видове бактерии, включително бактериите, използвани за направата на кисело мляко и сирене и онези, пребиваващи естествено в човешките черва. За да бъде мистерията още по-голяма, е забелязано, че тези застъпени повторения са придружавани от една обща група гени. Регионите на повторение в крайна сметка бяха наречени „CRISPR“, акроним за „кълъстер на равномерно прекъснати къси палиндромни повтори“, а придружаващите гени били наречени Cas, съкратено от „CRISPR-свързани гени“ (Jansen et al., 2002). В крайна сметка, стана ясно, че последователностите между повторите имат обща идентичност с вируси, които инфектират тези бактерии, както и че някои от свързаните с Cas гени кодират протеинови области, за които е известно, че разрязват ДНК.

Тъй като бактериите са известни с това, че използват протеини за намаляване на ДНК на нахлуващите бактериофаги (вируси, които инфектират бактериите), бързо се стигна до предположението, че CRISPR по някакъв начин асимилира последователност от геномите на тези нахлуващи вируси в разделителите между

повторенията и след това с помощта на тези дистанционни последователности и Cas протеини, изрязват ДНК на заразни вируси. Изследователски екип на Danisco (придобит от DuPont през 2011 г.), воден от Филип Хорват предоставя първото биологично доказателство, че CRISPR-Cas представлява имунна система срещу вируси в бактериите. Изследването, проведено от екипа показва, че шамове на бактериите в киселото мляко *Streptococcus Thermophilus* които оцеляват на вирусната инфекция са включили секвенции от нахлуващия вирусен геном в техните CRISPR локуси. След това тези шамове на *Streptococcus Thermophilus* стават резистентни към последващо заразяване с този вирус (Barrangou et al., 2007). Този пробив надгради новаторската работа на Хорват и негови колеги в началото на 21 век, които първоначално използваша CRISPR за бактериална идентификация, а след това и за способността ѝ да подобрява устойчивостта на шамовете на стартерни култури срещу атака на бактериофаги.

С течение на годините, са били идентифицирани множество CRISPR-Cas системи с различни характеристики. Въпреки това, именно поредицата от открития през 2011 г. и 2012 г. изведе една от тези CRISPR-Cas системи на челните редици на революцията на геномното редактиране. Чрез тези открития, три компонента на тази система се характеризират като едновременно необходими и достатъчни за разпознаването и съкращаването на ДНК, молекулата, която съставя геноми и кодира „инструкциите за живот“ (Фигура 2).



Фигура 2. Илюстрация на естествено възникваща CRISPR система. Вирусните ДНК последователности са включени в бактериални CRISPR масиви, които след това произвеждат crRNAs които са комплементарни на мястото с чужда ДНК. crRNAs се хибридизира до tracrRNAs и се свързва с протеина Cas9. Комбинираният комплекс разпознава и отрязва чужда ДНК, която съответства на последователността, предварително инкорпорирана в масива CRISPR в бактериите.

Първият компонент е протеинът Cas9 – протеин, кодиран от гена Cas9. В допълнение към укриването на механизма, отговорен за съкращаване на ДНК молекулата, той също така разпознава много кратък участък от близка ДНК последователност, отговаряща за започването на процеса на разпознаване на ДНК. Вторият компонент е РНК (роднина на ДНК) с произход от CRISPR локуса, който съдържа секвенцията, която определя на ДНК последователността да се съкрати. Този РНК се нарича CRISPR РНК (crRNA) и е отговорен за свързване с целевата ДНК. Третият компонент е втора РНК (наричан tracrRNA), също произхождащ от CRISPR локуса и служи като връзка между crRNA последователността и протеин Cas9 (Deltcheva et al., 2011).

През 2012 г., няколко научни списания публикуват, че тези три компонента са били достатъчни, за да се познава и съкращава ДНК и че crRNA биха могли да бъдат променени, за да разпознават почти всяка ДНК последователност, от всеки организъм. За да се опрости системата и да се подобри нейната ефикасност, бе решено, че crRNA и tracrRNA могат да бъдат комбинирани в една РНК (Фигура 2). Тази леснопрограмируема, двукомпонентна, ръководена от РНК Cas9 система е най-широко използваният CRISPR-Cas инструмент днес, и то във всички клонове на науките за живота (Jinek et al., 2012; Mali et al., 2013).

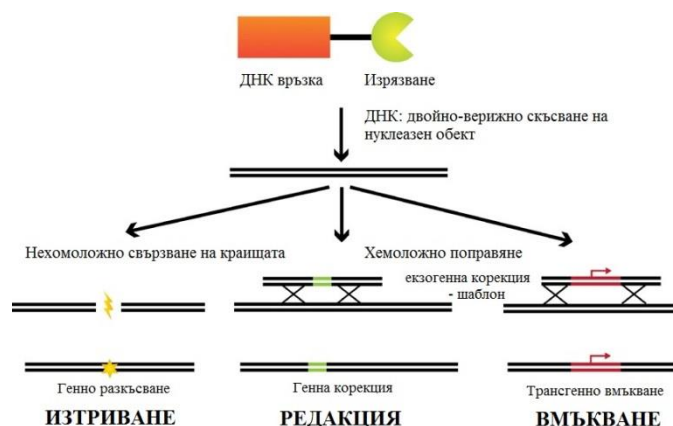
Усъвършенстване на растения, с помощта на CRISPR-Cas

CRISPR-Cas протеинът – Cas9 – улеснява геномното редактиране като функционира като точна и програмируема молекулярна ножица, която изрязва ДНК на определено място. След прерязването на целевата последователност на ДНК, CRISPR-Cas системата се възползва от естествено срещащи се клетъчни механизми за възстановяване на ДНК, за да изтрива, редактира или вмъква гени.

Висшите организми, включително растенията, непрекъснато се сблъскват с ДНК фрагменти от външни източници като слънчева светлина, както и вътрешни процеси, като например тези, които освобождават свободните радикали. За да издържат, тези организми са развили ефективни механизми за поправяне на множеството на ДНК фрагменти, които се случват ежедневно във всяка клетка. ДНК поправките може да се класифицират по два начина: 1) нехомоложно свързване на краищата и 2) хомоложно насочено поправяне (Фигура 3).

Нехомоложното свързване на краищата, съкратено NHEJ, е основната пътека за поправка на ДНК при растенията. Той не използва ДНК шаблон за процеса на поправка и вместо функции, като просто идентифицира две фрагментирани краища на ДНК и ги съединява обратно заедно. Този процес на възстановяване на ДНК, често може да доведе до вмъкване или заличаване на произволни ДНК секвенции в мястото за поправка. Ако прекъснатата ДНК секвенция представлява гена на растението, функцията на този ген се разкъсва и той бива „изтрит“.

HDR изисква втори непрекъснат ДНК сегмент със секвенция, идентична на тази, която съпътства разбитата ДНК, както и промяна (редакция, конкретна и търсена промяна на секвенцията или допълнителен генетичен материал за вмъкване). ДНК фрагментът се използва като шаблон за поправка на ДНК.



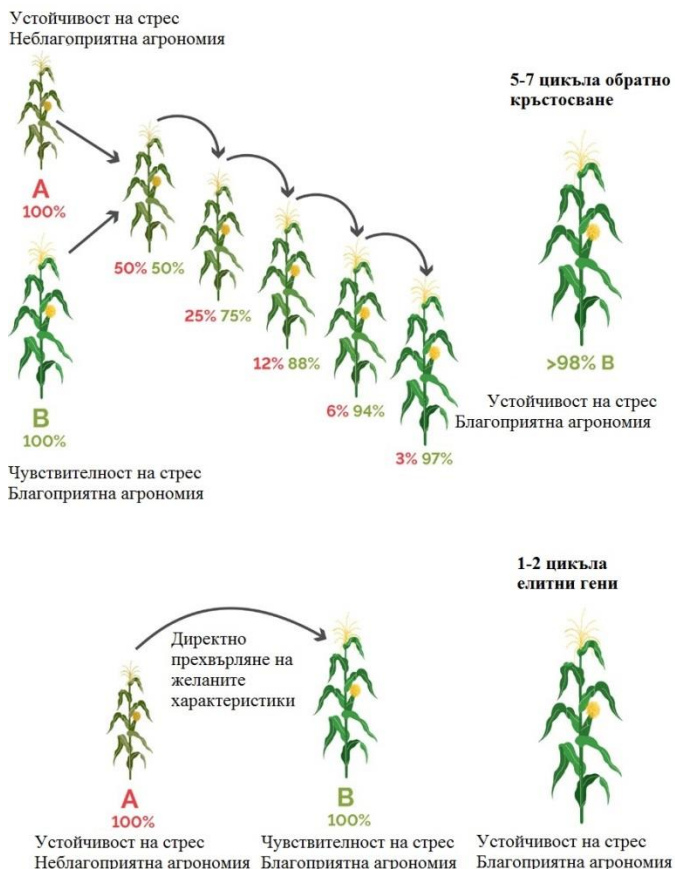
Фигура 3. Поправка на ДНК с помощта на CRISPR-Cas. Поправката без шаблон става чрез нехомоложно свързване на краищата (NHEJ) и може да се използва за разкъсване на функцията на гена и в крайна сметка – до делецията му. Поправката с шаблон чрез хомоложна поправка (HDR) може да активира прецизни алтерации и вмъквания от шаблонната ДНК секвенция в генома.

Отстраняване на гени

Гените могат да бъдат изтрети чрез насочване на Cas9 срещу съответния ген. Поправката чрез NHEJ може да се използва или да наруши ДНК секвенцията, която кодира гени или, в случай на две съкращения, може да бъде отстранен целия ген. Пример за такова приложение е следващото поколение хибриди на осъщца царевица на Pioneer.

Подпомогната селекция

CRISPR-Cas позволява директен трансфер на характеристики сред представителите на един и същи вид, например различни царевични линии. HDR може да бъде постигната при царевица, при която близкородственото кръстосване е станало с помощта на поправен шаблон, получен от ДНК секвенцията от различна царевична линия. Това пряко и целенасочено прехвърляне единствено и само на желаната характеристика (**например устойчивост на стрес**), използването на CRISPR-Cas е по-ефективно от традиционните методи за размножаване на растения, а и с него се избягва въвеждането на каквито и да било нежелани характеристики на изходната линия. Тъй като Pioneer също има опит в преместването на характеристики директно в елитни линии, прецизността на размножаване, свързана с този процес, осигурява способността да се въведат характеристиките директно в най-новите елитни линии и с по-малко отрицателно въздействие (напр. т. нар. „намаляване на добива“) от процеса на интрогресия (Фигура 4).



Фигура 4. Сравнение на традиционната интрогресия с подпомогната селекция. Традиционна интрогресия изисква до седем поколения обратно кръстосване и все още носи със себе си някои неелитни гени. Подпомаганото размножаване изисква само от един до два репродуктивни цикъла и се състои само от елитни гени.

Практическо приложение на съвременната селекция по системата CRISPR-Cas

Компанията Pioneer разработва платформа за CRISPR-Cas, която ще помогне за създаването на семена и продукти с по-голяма сухоустойчивост, продуктивност и стабилност. CRISPR-Cas намира широко приложение в селското стопанство, като допринася за увеличение на добива, устойчивостта към болести, поносимостта към суша, а също така подобрява качеството и увеличава хранителната стойност на крайния продукт.

В един от последните си публикувани доклади, учени от Pioneer описват първия си опит с CRISPR-Cas върху царевично растение, чиято цел е да се подобрят способностите на растението да се справя със сушата (Shi et al., 2016). CRISPR-Cas е бил използван върху определен ген, отговарящ за вродената и развиваща се способност за справяне със сушата. Резултатите от опитите на полето са отчели среден увеличението на добива при царевичните хибриди, от 30 кг/дка, при воден стрес във фенофаза извисяване и равен добив, при оптимален воден баланс. Допълнителни опити продължават да се извършват, с цел да се установи генетичния потенциал при различни условия. В други публикации на Pioneer относно CRISPR-Cas технологията са включени доклади, описващи ефикасността и гъвкавостта на CRISPR-Cas системата, при царевични (Svitashev et al., 2015; Svitashev et al., 2016) и соеви растения (Li et al., 2015).

Селекция на хибриди восьмична царевица

През лятото на 2016г. от Pioneer обявяват своя първи търговски продукт, разработен чрез CRISPR-Cas технологията за селекция – следващото поколение хибриди восьмична царевица (Публично обявено от Pioneer, 2016 г.). Поради все още извършващите се опити и наблюдения, се очаква тези хибриди да са достъпни за американските производители в близките три години. Зърната на восьмичната царевица, позната ни от началото на 20 век, съдържат >97 % амилопектиново нишесте, за сравнение със съдържащите се ~75% в жълтата (нормална) царевица и намират голямо приложение, в храните ежедневно консумирани от потребителя. В Съединените щати годишно се отглеждат около два милиона декара восьмична царевица. Компанията Pioneer е най-големият доставчик на восьмична царевица в света.

Предизвикателствата и ограниченията в конвенционалното отглеждане на восьмичната царевица, я правят идеален продукт за експериментирание на CRISPR-Cas технологията. Сегашната хибриди от восьмична царевица страда от частична липса на гена, който отговаря за производството на амилоза в ендосперма. Премахването на този ген води до спиране производството на амилоза в ендосперма и така почти цялото зърно бива съставено от амилопектин. От Pioneer постоянно интродуцират този ген в нови високодобивни царевични линии, но този процес отнема няколко години и носи със себе си вмъкване на нежелани гени. В резултат на това добивът на царевичните хибриди намалява, в сравнение с базовите линии. Чрез използването на CRISPR-Cas технологията генът може да бъде директно и изцяло премахнат от повечето съществуващи линии.

Това директно вкарване на характеристики намалява времето, необходимо за създаването на хибриди и се очаква да елиминира забавянето, което се свързва с интрогресията на характеристиките чрез конвенционалната селекция.



Фигура 5. Восьмичната царевица е обогатена с амилопектин, което ѝ придава свойствата, които търсим в храната, производството на хартия, гофрирането и лепящите материали.

Партньорство с Международния център за подобряване качествата на царевицата и пшеницата

През есента на 2016 г. Pioneer и Международният център за подобряване качествата на царевицата и пшеницата (CIMMYT) сключиха споразумение за съвместно разработване на подобрените култури с помощта на геномно редактиране CRISPR-Cas за характеристики, които адресират нуждите на фермерите в цял свят. Първият проект ще приложи CRISPR-Cas инструмента в борбата срещу некрозата по царевицата в Субсахарска Африка. Първоначално открита в Кения през 2011 г., болестта се разпространява в съседните държави за по-малко от пет години и намалява добива на царевица със средно 3 процента в сухите области и 32 процента в по-влажните места, а в някои ферми води до 90 процента загуби. В Кения болестта засяга почти една четвърт от общата площ с царевица, с годишни загуби от близо 52 милиона долара (Mahuku et al., 2015). Pioneer е компания, която би се радвала на колорабация, за да се реализира пълния потенциал на технологията CRISPR-Cas.

Библиография

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709-1712.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E. 2011 CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471:602-607.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, 1987 A. Nucleotide sequence of the iap gene for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escheria coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169:5429-5433.
- Jansen, R., van Embden, J.D.A., Gaastra, W., Schouls, L.M. 2002 Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43:1565-1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. 2012 A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821.
- 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. 2015 Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology* 169:960-970.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo J.E., Church, G.M. 2013 RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339:823-826.
- Mahuku, G., Lockhart, B.E., Wanjala, B., Jones, M.W., Kimunye, J.N., Stewart, L.R. Cassone, B.J., Sevgan, S., Nyasani, J.O., Kusia, E., Kumar, P.L., Niblett, C.L., Kiggundu, A., Asea, G., Pappu, H.R., Wangai, A., Prasanna, B.M., Redinbaugh, M.G. 2015 Maize lethal necrosis (MLN), an emerging threat to maize-based food security in sub-Saharan Africa. *Phytopathology* 105:956-965.

Pioneer news release. 2016 <https://www.pioneer.com/home/site/about/news-media/news-releases/template.CONTENT/guid.1DB8FB71-1117-9A56-E0B6-3EA6F85AAE92>

Sander, J., Joung, J.K. 2014 CRISPR-Cas systems for editing, regulating, and targeting genomes. *Nature Biotechnology* 32:347-355.

Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H.R., Archibald, R.L., Yang, M., Hakimi, S.M., Mo, H., Habben, J.E. *Plant Biotechnology Journal* Epub ahead of print.

Svitashev, S., Young, J.K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C., Cigan, A.M. 2015 Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology* 169:931-45.

Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J.K. Young, and A.M. Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* 7:13274.

¹ Учен на DuPont Pioneer – Молекулярен инженеринг

² Мениджър „Информация в областта на агрономията“ на DuPont Pioneer

Горепосочените данни са предоставени единствено с информативна цел. Моля, свържете се с Вашия търговски представител на Pioneer, ако желаете да получите информация и предложения, конкретни за Вашата сфера на дейност. Ефективността на продукта зависи от множество фактори, като например влага и топлинен стрес, вида на почвата, управленски практики и екологичен стрес, както и болести по растенията и натиск от вредители. Резултатите могат да варират.