

Цис-, інтра-, субгенез, геномне редагування – передові технології модифікації геномів сільськогосподарських культур

Н. Е. Волкова, доктор біологічних наук

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення
natavolki@ukr.net

Мета. Огляд літератури про сучасні технології генетичної модифікації геномів сільськогосподарських культур. **Результати.** Проаналізовано сучасний стан створення генетично модифікованих рослин. Подано інформацію про цис-, інтра- та субгенні рослини та порівняння їх з трансгенними культурами. Наведено приклади застосування цис- та інтрагенезу для поліпшення ознак сільськогосподарських культур. Розглянуто найсучаснішу технологію модифікації геномів сільськогосподарських культур – геномне редагування. **Висновки.** Технології створення цис-, інтра-, субгенних рослин швидко розвиваються й впроваджуються в сільськогосподарських культурах ХХІ століття, що може розв'язати проблему забезпечення продовольством постійно зростаючого населення світу з найменшими суперечностями суспільних інтересів.

Ключові слова: генетична модифікація, цисгенез, інтрагенез, субгенез, геномне редагування, сільськогосподарські культури.

Вступ. Генетична інженерія сільськогосподарських культур є технологією, де геном культури-господаря доповнюється (змінюється) чужорідним геном, який регулюється певними регуляторними послідовностями (промотор, термінатор та ін.). Генетична інженерія рослин почалася в 1983 р. дослідженням експресії бактеріального гена в тютюні [1], а перша трансгенна (генетично модифікована, або ГМ) продовольча культура (помідор Flavr Savr) була комерціалізована компанією Calgene Company в 1994 р. [2]. На цей час трансгенні культури мають різні ознаки, зокрема толерантність до пестицидів, гербіцидів, біотичних і абіотичних стресів, продукування білків для зміни метаболічних шляхів та/або отримання нових функцій, щоб підвищити харчову цінність.

Хоч гени в сільськогосподарські культури додають і за допомогою традиційних селекційних підходів, селекційне потомство не вважають ГМ, тому що вбудовані гени та їхні регуляторні послідовності належать до тієї самої культури-господаря або, в деяких випадках (наприклад, у разі схрещування вівса та ячменю), до культури, здатної до схрещування з господарем.

Незважаючи на той факт, що трансгенні технології довели свою ефективність для

сільського господарства, вони залишаються дискусійною темою для громадськості з моменту їхньої появи. Етичні проблеми й питання безпеки (ризиків) щодо біотехнологічних культур, яким присвячено велику кількість публікацій, в основному пов'язані з тим, що більшість затверджених ГМ організмів містять генетичні елементи, отримані від несумісних видів, та селективні маркери антибіотиків або гербіцидостійкості [3].

Метою статті є огляд літератури стосовно сучасних технологій генетичної модифікації геномів сільськогосподарських культур.

Результати досліджень. Останнім часом розроблено нові інструменти генетичної модифікації сільськогосподарських культур – цисгенез, інтрагенез, геномне редагування [4].

Цисгенез. Термін «цисгенна рослина» був вперше введений у 2006 р. і означає «культурні рослини, які були генетично модифіковані з одним або кількома генами (які містять інтрони і фланкуючі регіони, такі як нативні регіони промотору і термінатору в смисловій орієнтації), ізольовані з донорної рослини, здатної до схрещування» [5]. Генетично модифіковані цисгенні культури містять гени, що зберігають їхній природний генетичний склад, тобто є ідеальною повною копією природного гена з усіма його регуля-

торними елементами. Джерелом цисгена є ті самі рослинні види або сексуально сумісні види, які використовують для традиційної селекції. Однак, на відміну від традиційної селекції, цисгенні культури містять виключно ген або гени, що становлять інтерес, і не містять небажані генетичні елементи [6].

У 2012 р. Європейське агентство з безпеки продуктів харчування (European Food Safety Authority) опублікувало доповідь з даними порівняння потенційної шкоди рослинних продуктів, отриманих різними способами. В результаті був зроблений висновок про те, що ризики, пов'язані з споживанням цисгенних рослин і сортів, отриманих методами класичної селекції, є співставними [7]. Але формально цисгенні рослини підходять під визначення генетично модифікованих організмів, і маркування їх є обов'язковим.

Інтрагенез. Інтрагенні культури відносять до ГМ організмів, де інтродукований інтраген також походить від того самого виду або здатних до схрещування видів, але, на відміну від цисгенів, інтрагени є гібридними генами, які можуть мати генетичні елементи з різних генів і локусів [8]. Це означає, що послідовності гена (з інтронами або без них) можуть регулюватися промоторами і термінаторами різних генів. Ці гени, що сприятимуть трансгенній регуляції, мають належати до того самого генофонду, здатного до схрещування [9]. У результаті, експресія певного гена може бути модифікована у разі використання різних промоторів або термінаторів. Інтрагенез дає можливість будувати нові генетичні комбінації, інтродукувати мінливість генної експресії, створювати нові профілі експресії і, отже, нові ГМ організми з інноваційними властивостями. На основі використання нативних генів, порівняно з використанням гібридних генів, цисгенез можна вважати набагато ближчим до традиційної селекції, ніж інтрагенез.

РНК-інтерференція. До підходів генетичної модифікації відносять і технологію на основі процесу пригнічення експресії генів – РНК-інтерференції (RNAi), в якій ген, що регулюється, завжди належить до тієї самої культури. Втім, його регуляторні послідовності можуть належати до тієї самої рослини-господаря, до будь-якої здатної до схрещування культури або до будь-якого іншого живого організму. Тому, залежно від джерел регуляторних послідовностей, такі культури можуть належати до трансгенної, цисгенної або інтрагенної категорій. Наприклад, технологію RNAi, яку використовують для зниження експресії гена *редуктази циннамо-*

іл CoA кукурудзи (cinnamoylcoenzyme A reductase, CCR, нативного гена, пов'язаного з біосинтезом лігніну), можна вважати інтрагенною [10], оскільки промотор, що регулює CCR у разі негативної регуляції, відносять до *Asteraceous chrysanthemum*, рослини, яка не може бути схрещена з рослиною кукурудзи.

Приклади застосування цис- та інтрагенезу для поліпшення ознак сільськогосподарських культур. Культури, для поліпшення ознак яких використано цис- та інтрагенний підходи, включають картоплю [11–13], яблуню [14, 15], полуницю [16], люцерну [17], райграс пасовищний [18], тополь [19], ячмінь [20], пшеницю тверду [21].

Перша інтрагенна картопля була розроблена для продукування високого вмісту амілопектину [22]. Цей підхід ґрунтується на сайленсингу гена гранулопов'язаної крохмальсинтази, який є відповідальним за синтез амілози. Склад крохмалю в картоплі є важливою ознакою, й нині складно отримати культивовану тетраплоїдну картоплю з потрібним вмістом амілози та амілопектину. Таким чином, стратегії сайленсингу синтетичних генів або амілози, чи амілопектину дали можливість отримувати тетраплоїдні сорти, які містять всі необхідні ознаки, наявні у вихідного сорту [23]. Ця форма картоплі (B/NL/07/04) була «випущена в поля» в ЄС у 2007 р. компанією AVEBE. Інші інтрагенні підходи стосуються переробної якості картоплі. Наприклад, ферментативне покорищення зменшено шляхом сайленсингу гена поліфенолоксидази, який каталізує окиснення цитоплазматичних поліфенолів, що зумовлюють преципітацію меланіну й погіршення якості бульб під час зберігання [24].

Іншою важливою ознакою картоплі є холод-індуковане підсолоджування, що зумовлено високою деградацією крохмалю, спричиненою низькою температурою під час зберігання. Щоб запобігти цьому, в інтрагенній картоплі проведено сайленсинг двох генів, що беруть участь у деградації крохмалю, – водна дикіназа (R1) і амілопласт-цільова фосфорілаза-L (PhL) [25]. Згодом проведено сайленсинг усіх генів (PPO, R1 і PhL) у картоплі для продукування бульб з поліпшеними властивостями [26].

Однією з основних проблем селекції картоплі є створення сортів, стійких проти фітофторозу – найпоширенішої хвороби картоплі, збудником якої є ооміцети *Phytophthora infestans*. Гени толерантності (R-гени), наявні в дикорослої картоплі, були перенесені в сорти методами традиційної селекції, але обмежено – через відмінності в рівні плодючості між ви-

дами картоплі [27]. З цієї причини у Програмі Durable Resistance against Phytophthora (DuRPh) використано цисгенний підхід для введення кількох R-генів з їхніми рідними регуляторними послідовностями з дикорослої картоплі в культивовану картоплю [28].

Найшкідливішим і поширеним захворюванням яблуні є парша, спричинена аскоміцетами *Venturia inaequalis*. Усі культивовані яблуні є сприйнятливими до цього патогена. Ген *HcrVf2*, наявний у локусі *Vf* стійкості проти парші, введено в сорт яблуні Gala [15]. Переданий ген містить свої власні регуляторні послідовності – промотор і термінатор. Фактично, це дослідження претендує бути першою доповіддю щодо покоління «істинної цисгенної рослини». Інтрагенний підхід також застосовано для індукції стійкості проти парші з використанням того самого гена *HcrVf2* [14], але в цьому разі ген стійкості контролюється промотором і термінатором малої субодиниці гена рубіско яблуні.

Модифікація архітектури й темпів росту є серйозною проблемою для промисловості деревних рослин. Цисгенний підхід, розроблений для тополі, спрямований на розв'язання обох проблем [19]. Для цього гени, що кодують ензими біосинтезу гіберелінової кислоти, разом зі своїми власними регуляторними послідовностями були надекспресовані в тополі, що призвело до збільшення темпів росту дерева. Відповідно до цього надлишкова експресія катаболічних генів, а також негативних регуляторів призводить до зменшення темпів росту й розміру дерева. Таким чином, цисгенна та інтрагенна стратегії можуть бути корисними для рослин з великою тривалістю життя та високим рівнем гетерозиготності, для яких традиційна селекція є дуже обмеженою.

Цисгенний ячмінь створено шляхом введення кількох копій гена власної фітази [20]. Фітаза каталізує вивільнення фосфату з фітинової кислоти, внаслідок чого фосфат стає доступним для засвоєння тваринами. Ця стратегія є перспективною для збільшення біодоступності фосфату і може являти собою альтернативу для уникнення додавання до корму мікробіологічно отриманої фітази й зменшення забруднення навколишнього середовища фосфатом.

Геномне редагування. Передовою технологією модифікації геномів сільськогосподарських культур є геномне редагування, призначене для точного й сайт-специфічного (замість випадкового) додавання, зміни або видалення генів. Ця технологія представлена системами цинк-пальцевих нуклеаз (zinc-finger nucleases,

ZFNs), транскрипційних активатор-подібних ефекторів нуклеаз (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) і кластеризованих регулярно інтерсперсованих коротких паліндромних повторів (clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR)/Cas). Якщо до цього часу трансгенної трансформації досягали за допомогою *Agrobacterium* або мікробомбардування ДНК, то нині ці нові біотехнології використовують для підвищення ефективності та точності процесу трансформації. Вони дають можливість розрізати ДНК у заздалегідь визначеному місці й точно вводити мутації або заміни окремих нуклеотидів в оптимальному місці в геномі для максимальної експресії.

Ці методи докладно розроблені, їхній опис наведено в багатьох публікаціях [29–33]. Система ZFN використана для успішного впровадження толерантності до гербіцидів у кукурудзи [34], TALENs – для видалення гена рису, який надає сприйнятливості до небезпечного бактеріального захворювання – опіку рису, та створення ароматичного рису [35]. За допомогою системи CRISPR/Cas введено сорт пшениці, стійкої проти борошнистої роси: дослідники видалили декілька копій генів, що кодують білки, які пригнічують захист проти хвороби [36]. Втім, експерти в цій галузі вважають, що потенційно «реальною силою» зазначених нових методів є їхня здатність «редагувати» й змінювати природні гени рослин, що кодують таку важливу ознаку, як посухостійкість, і поліпшувати властивості культур, що не є трансгенними. Крім наукового прогресу, використання таких технологій впливає на позитивне сприйняття отриманої рослинної продукції з боку громадськості.

Інший вид нових підходів перебуває ще на ранніх стадіях розвитку – транспортери мембран рослин. Останні дослідження свідчать, що спеціалізовані транспортери мембран рослин можуть бути використані для збільшення врожайності основних сільськогосподарських культур, вмісту мікроелементів і підвищення стійкості проти основних стресів, у тому числі засолення, патогенів та алюмінієвої інтоксикації [37].

Ідеальний сценарій редагування генома буде уникати введення будь-яких «нерослинних» генетичних послідовностей у геном культури-господаря стільки, скільки можливо, а потім вирізати всі нерослинні послідовності (наприклад, селективні маркерні гени, Cas і т. д.), якщо вони необхідні в процесі додавання цисгена до генома сільськогосподарської культури.

Хоч наведені системи геномного редагування можуть бути використані для видалення небажаних генетичних послідовностей з геномів культур, остання з них під назвою транспозаза PiggyBac [38] може бути кращим варіантом вирізання будь-яких небажаних послідовностей ДНК.

Усі перелічені технології редагування генома потребують знань геноміки, доповнених генетичною інженерією. Але нині є ряд компаній (наприклад, Sigma-Aldrich, Clontech і Addgene), які вже продають вектори геномного редагування та послуги заінтересованим науковим колективам. Незалежно від використаних систем редагування, культуру, геном якої редагується, називають «субгенною» [39].

Висновки. Передовими технологіями модифікації геномів сільськогосподарських культур є цис-, інтра-, субгенез, геномне редагування. Технології створення цис-, інтра-, субгенних рослин швидко розвиваються й реалізуються в сільськогосподарських культурах ХХІ століття, що може розв'язати проблему забезпечення продовольством постійно зростаючого населення світу з найменшими суперечностями суспільних інтересів.

Використана література

- Expression of bacterial genes in plant cells / R. Fraley, S. Rogers, R. Horsch [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1983. – Vol. 80, Iss. 15. – pp. 4803–4807.
- Bruening G. The case of the FLAVR SAVR tomato / G. Bruening, J. M. Lyons // *California Agriculture*. – 2000. – Vol. 54, Iss. 4. – pp. 6–7.
- Qaim M. *Genetically Modified Crops and Agricultural Development* / M. Qaim. – Basingstoke, UK: Palgrave MacMillan Publ., 2015. – 272 p.
- Cisgenesis and Intragenesis: New tools for improving crops / C. Espinoza, R. Schlechter, D. Herrera [et al.] // *Biol. Res*. – 2013. – Vol. 46, Iss. 4. – pp. 323–331.
- Schouten H. J. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? / H. J. Schouten, F. A. Krens, T. Jacobsen // *Nature Biotechnology*. – 2006. – Vol. 24, Iss. 7. – pp. 753.
- Cisgenics – a sustainable approach for crop improvement / R. Telem, S. Wani, N. Singh [et al.] // *Current Genomics*. – 2013. – Vol. 14, Iss. 7. – pp. 468–476.
- Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis // *EFSA Journal*. – 2012. – Vol. 10, Iss. 2. – pp. 2561–2594.
- The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding / C. Rommens, M. Haring, K. Swords [et al.] // *Trends Plant Sci*. – 2007. – Vol. 12, Iss. 9. – pp. 397–403.
- Sticklen M. Transgenic, cisgenic, intragenic and subgenic crops / M. Sticklen // *Adv. Crop Sci. Tech*. – 2015. – Vol. 3, Iss. 2. – e123. doi: 10.4172/2329-8863.1000e123.
- Down-regulation of maize cinnamoyl-CoA reductase via RNAi technology causes brown midrib and improves AFEXTM-pretreated conversion into fermentable sugars for biofuels / S. Park, C. Mei, M. Pauly [et al.] // *Crop Sci*. – 2012. – Vol. 52, Iss. 6. – pp. 2687–2701.
- Low-acrylamide French fries and potato chips / C. M. Rommens, H. Yan, K. Swords [et al.] // *Plant Biotechnol. J*. – 2008. – Vol. 6, Iss. 8. – pp. 843–853.
- Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by phytophthora infestans / A. J. Haverkort, P. C. Struik, R. G. F. Visser, E. Jacobsen // *Potato Research*. – 2009. – V. 52, Iss. 3. – pp. 249–264.
- Chawla R. Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield / R. Chawla, R. Shakya, C. Rommens // *Plant Biotechnol. J*. – 2012. – Vol. 10, Iss. 8. – pp. 913–924.
- Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples / S. Joshi, J. Schaart, R. Groenwold [et al.] // *Plant Mol. Biol*. – 2011. – Vol. 75, Iss. 6. – pp. 579–591.
- The development of a cisgenic apple plant / T. Vanblaere, I. Szankowski, J. Schaart [et al.] // *J. Biotechnol*. – 2011. – Vol. 154, Iss. 4. – pp. 304–311.
- Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene / J. Schaart, F. Krens, K. Pelgrom [et al.] // *Plant Biotechnol. J*. – 2004. – Vol. 2, Iss. 3. – pp. 233–240.
- Weeks J. T. Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) / J. T. Weeks, J. Ye, C. M. Rommens // *Transgenic Res*. – 2008. – Vol. 17, Iss. 4. – pp. 587–597.
- Towards engineering drought tolerance in perennial ryegrass using its own genome / S. Bajaj, S. Puthigae, K. Templeton [et al.] // *6th Canadian plant genomics workshop (Toronto, 23–26 June 2008)*: abstract. – Toronto, 2008. – p. 62.
- Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus* / K. Han, P. Dharmawardhana, R. Arias [et al.] // *Plant Biotechnol. J*. – 2011. – Vol. 9, Iss. 2. – pp. 162–178.
- Cisgenic barley with improved phytase activity / I. Holme, G. Dionisio, H. Brinch-Pedersen [et al.] // *Plant Biotechnol. J*. – 2012. – Vol. 10, Iss. 2. – pp. 237–247.
- A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1DY10 / A. Gadaleta, A. Giancaspro, A. Blechl, A. Blanco // *J. Cereal Sci*. – 2008. – Vol. 48, Iss. 2. – pp. 439–445.
- A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop / N. de Vetten, A. Wolters, K. Raemakers [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2003. – Vol. 21, Iss. 4. – pp. 439–442.
- Holme I. B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development / I. B. Holme, T. Wendt, P. B. Holm // *Plant Biotechnol. J*. – 2013. – Vol. 11, Iss. 4. – pp. 395–407.
- Crop improvement through modification of the plant's own genome / C. Rommens, J. Humara, J. Ye [et al.] // *Plant Physiol*. – 2004. – Vol. 135, Iss. 1. – pp. 421–431.
- Potatoes having improved quality characteristics and methods for their production / L. M. Kawchuk, J. D. Armstrong, D. R. Lynch, N. R. Knowles // *US patent application*, 1999. – US 5998701.
- Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation / C. M. Rommens, J. Ye, C. Richael, K. Swords // *J. Agric. Food Chem*. – 2006. – Vol. 54, Iss. 26. – pp. 9882–9887.
- Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis / T. H. Park, V. G. A. A. Vleeshouwers, E. Jacobsen [et al.] // *Plant Breeding*. – 2009. – Vol. 128, Iss. 2. – pp. 109–117.
- Сайт Wageningen UR (University & Research centre) [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/plant-research-international/DuRPh.htm>.
- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases / D. Carroll // *Genetics*. – 2011. – Vol. 188, Iss. 4. – pp. 773–782.
- Voytas D. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases / D. Voytas // *Annu. Rev. Plant Biol*. – 2013. – Vol. 64. – pp. 327–350.
- Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases / Y. Qi, X. Li, Y. Zhang [et al.] // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2013. – Vol. 3, Iss. 10. – P. 1707–1715.
- TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants / T. Wendt,

- P. Holm, C. Starker [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 83, Iss. 3. – P. 279–285.
33. Voytas D. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges / D. Voytas, C. Gao // *PLoS Biology*. – 2014. – Vol. 12, Iss. 6. – e1001877.
 34. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases / V. Shukla, Y. Doyon, J. Miller [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – pp. 437–441.
 35. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology / Q. Shan, Y. Zhang, K. Chen [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2015. – Vol. 13, Iss. 6. – P. 791–800.
 36. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system / Q. Shan, Y. Wang, J. Li [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2014. – Vol. 9. – pp. 2395–2410.
 37. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production / J. Schroeder, E. Delhaize, W. Frommer [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 497, Iss. 7447. – pp. 60–66.
 38. Precision genome editing in plants via gene targeting and piggyBac-mediated marker excision / A. Nishizawa-Yokoi, M. Endo, N. Ohtsuki [et al.] // *Plant J.* – 2015. – Vol. 81, Iss. 1. – pp. 160–168.
 39. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew / Y. Wang, X. Cheng, Q. Shan [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32, Iss. 9. – pp. 947–951.
- ### References
1. Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., ... Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(15), 4803–4807.
 2. Bruening, G., & Lyons, J. M. (2000). The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture*, 54(4), 6–7.
 3. Qaim, M. (2015). *Genetically Modified Crops and Agricultural Development*. Basingstoke, UK: Palgrave MacMillan.
 4. Espinoza, C., Schlechter, R., Herrera, D., Torres, E., Serrano, A., Medina, C., & Arce-Johnson, P. (2013). Cisgenesis and Intragensis: New tools for improving crops. *Biol. Res.*, 46(4), 323–331.
 5. Schouten, H. J., Krens, F. A., Jacobsen, E. (2006). Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nat Biotechnol.*, 24(7), 753.
 6. Telem, R. S., Wani, S. H., Singh, N. B., Nandini, R., Sadhukhan, R., Bhattacharya, S., & Mandal, N. (2013). Cisgenics – a sustainable approach for crop improvement. *Curr Genomics*, 14(7), 468–476.
 7. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragensis (2012). *EFSA Journal*, 10(2), 2561–2594.
 8. Rommens, C. M., Haring, M. A., Swords, K., Davies, H. V., & Belknap, W. R. (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends Plant Sci*, 12(9), 397–403.
 9. Sticklen, M. (2015). Transgenic, cisgenic, intragenic and sub-genic crops. *Adv Crop Sci Tech*, 3(2): e123. doi: 10.4172/2329-8863.1000e123.
 10. Park, S. H., Meib, C., Paulyce, M., Ongd, R. G., Daled B. E., Sabzikara, R., ... Sticklen, M. (2012). Down-regulation of maize cinnamoyl-CoA reductase via RNAi technology causes brown midrib and improves AFEXTM-pretreated conversion into fermentable sugars for biofuels. *Crop Sci.*, 52(6), 2687–2701.
 11. Rommens, C. M., Yan, H., Swords, K., Richael, C., & Ye, J. (2008). Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnol J.*, 6(8), 843–853
 12. Haverkort, A. J., Struik, P. C., Visser, R. G. F., & Jacobsen, E. (2009). Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 52(3), 249–264.
 13. Chawla, R., Shakya, R., & Rommens, C. (2012). Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnol. J.*, 10(8), 913–924.
 14. Joshi, S. G., Schaart, J. G., Groenwold, R., Jacobsen, E., Schouten, H. J., & Krens, F. A. (2011). Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Mol. Biol.*, 75(6), 579–591.
 15. Vanblaere, T., Szankowski, I., Schaart, J., Schouten, H., Flachowsky, H., Broggini, G. A., & Gessler, C. (2011). The development of a cisgenic apple plant. *J Biotechnol.*, 154(4), 304–311.
 16. Schaart, J. G., Krens, F. A., Pelgrom, K. T., Mendes, O., & Rouwendal, G. J. (2004). Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnol. J.*, 2(3), 233–240.
 17. Weeks, J. T., Ye, J., & Rommens, C. M. (2008). Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res.*, 17(4), 587–597.
 18. Bajaj, S., Puthigae, S., Templeton, K., Bryant, C., Gill, G., Lomba, P., ... Hanley, Z. (2008). Towards engineering drought tolerance in perennial ryegrass using its own genome. *6th Canadian plant genomics workshop*, Toronto, June 23–26 (p. 62).
 19. Han, K. M., Dharmawardhana, P., Arias, R. S., Ma, C., Busov, V., & Strauss, S. H. (2011). Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus*. *Plant Biotechnol. J.*, 9(2), 162–178.
 20. Holme, I. B., Dionisio, G., Brinck-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C. K., Vincze, E., & Holm, P. B. (2012). Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnol. J.*, 10(2), 237–247.
 21. Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A., & Blanco, A. (2008). A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1DY10. *J. Cereal Sci.*, 48(2), 439–445.
 22. de Vetten, N., Wolters, A.M., Raemakers, K., van der Meer, I., ter Stege, R., Heeres, ... Visser, R. (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol.*, 21(4), 439–442.
 23. Holme, I. B., Wendt, T., & Holm, P. B. (2013). Intragensis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol. J.*, 11(4), 395–407.
 24. Rommens, C. M., Humara, J. M., Ye, J., Yan, H., Richael, C., Zhang, L., ... Swords, K. (2004). Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol.*, 135(1), 421–431.
 25. Kawchuk, L. M., Armstrong, J. D., Lynch, D. R., & Knowles N. R., inventors (1999). Potatoes having improved quality characteristics and methods for their production. *US patent application*. US 5998701.
 26. Rommens, C.M., Ye, J., Richael, C., & Swords, K. (2006). Improving Potato Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. *J. Agric. Food Chem.*, 54(26), P. 9882–9887.
 27. Park, T. H., Vleeshouwers, V. G. A. A., Jacobsen, E., van Der Vossen, E., & Visser, R. G. F. (2009). Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breeding*, 128(2), 109–117.
 28. Website Wageningen UR (University & Research centre). (n.d.). Retrieved from <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/plant-research-international/DuRPh.htm>.
 29. Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger. *Genetics*, 188(4), 773–782.
 30. Voytas, D. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64, 327–350.
 31. Qi, Y., Li, X., Zhang, Y., Starker, C. G., Balthes, N.J., Zhang, F., ... Voytas, D. F. (2013). Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(10), 1707–1715.
 32. Wendt, T., Holm, P. B., Starker, C. G., Christian, M., Voytas, D. F., Brinck-Pedersen, H., Holme, I. B. (2013). TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol. Biol.*, 83(3), 279–285.

33. Voytas, D. F., Gao, C. (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol.*, 12(6), e1001877.
34. Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKever, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E. ... F. D. Urnov (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459(7245), 437–441.
35. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang K., & Gao, C. (2015). Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol. J.*, 13(6), 791–800.
36. Shan, Q., Wang, Y., Li, J., & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.*, 9, 2395–2410.
37. Schroeder, J. I., Delhaize, E., Frommer, W. B., Lou Guerinot, M., Harrison, M. J., Herrera-Estrella, L., ... Sanders, D. (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 497(7447), 60–66.
38. Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Ohtsuki, N., Saika, H., & Toki, S. (2015). Precision genome editing in plants via gene targeting and piggyBac-mediated marker excision. *Plant J.*, 81(1), 160–168.
39. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.*, 32(9), 947–951.

УДК 577.21:575.22:581.6

Н. Э. Волкова. Цис-, интра-, субгенез, геномное редактирование – передовые технологии модификации геномов сельскохозяйственных культур

Цель. Обзор литературы о современных технологиях генетической модификации геномов сельскохозяйственных культур. **Результаты.** Проанализировано современное состояние создания генетически модифицированных растений. Приведена информация о цис-, интра- и субгенных растениях и их сравнение с трансгенными культурами. Представлены примеры применения цис- и интрагенеза для улучшения признаков сельскохозяйственных культур. Рассмотрена самая современная технология модификации геномов сельско-

хозяйственных культур – геномное редактирование. **Выводы.** Технологии создания цис, интра-, субгенных растений быстро развиваются и внедряются в сельскохозяйственных культурах XXI века, что может решить проблему обеспечения продовольствием постоянно растущего населения мира с наименьшими противоречиями общественных интересов.

Ключевые слова: генетическая модификация, цис-генез, интрагенез, субгенез, геномное редактирование, сельскохозяйственные культуры.

UDC 577.21: 575.22: 581.6

N. E. Volkova. Cis-, intra-, subgenesis, genome editing as modern technologies for modifying the crop genomes (review)

Purpose. Reviewing the literature on modern technologies of genetic modification of crop genomes. **Results.** The current state of genetically modified plants creation is analyzed. The information on cis-, intra- and subgenetic plants and their comparison with transgenic crops is given. Examples of cis- and intragenesis application for improving characteristics of crops are provided. Such state-of-the-art technology of crop genome modification as genome editing

is considered. **Conclusions.** Technologies for producing cis-, intra-, subgenetic plants are rapidly developing and resulting in crops of the 21st century that can solve the problem of food provision for a constantly growing world population with the least contrary to the public interest.

Keywords: genetic modification, cisgenesis, intragenesis, subgenesis, genome editing, crops.

Надійшла 03.12.2015