

Биотехнология растений



Трансгенные растения-1

- 1. Молекулярные механизмы взаимодействия растения – агробактерии**
- 2. Векторы на основе агробактерии**
- 3. Селективные и репортерные гены**
- 4. Методы трансформации**
- 5. Замолкание (сайленсинг) генов у трансгенных растений**

Нобелевская премия , основоположник 1и2-ой Зеленой революции.



Норман Эрнст Борлаг

***Норман Борлаг получил новые сорта
пшеницы с повышенной урожайностью.
Начало «Зеленой Революции» в сельском
хозяйстве.***

1963

Методы традиционной селекции растений

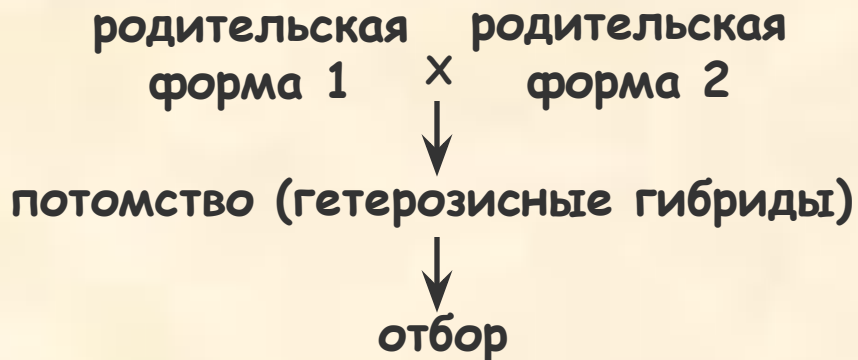
1. Близкородственное скрещивание (имбридинг)



3. Мутагенез



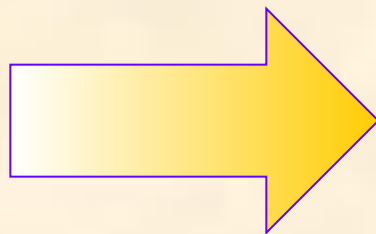
2. Отдаленное скрещивание (аутбридинг)



ТЕОСИНТЕ

кукуруз

Slide courtesy of Wayne Parrott, University of Georgia



Slide courtesy of Wayne Parrott, University of Georgia

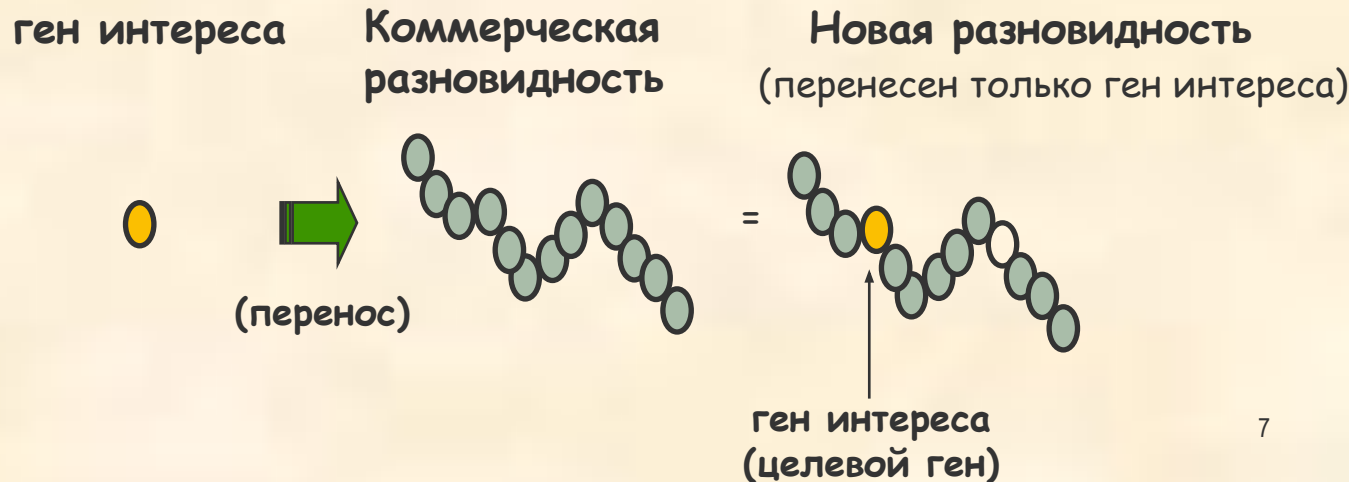
Традиционная селекция растений

ДНК - цепь генов.
Традиционная селекция сразу комбинирует много генов.
Переносится много «балласта»



Биотехнология растений

Используя биотехнологию, можно перенести только один ген



Генетически модифицированный организм (ГМО) -

организм, генетический материал которого (ДНК) изменен не в ходе естественной гибридизации (вертикального переноса генов от родителей потомству), а с помощью горизонтального переноса генов от одного организма - другому. Процесс горизонтального переноса называется генетической трансформацией, а ГМО - трансгенным организмом.

История развития получения трансгенных растений

1975г. - группы из компании Монсанто, из Гентского государственного университета (Бельгия), из Института растениеводства им. Макса Планка в Кельне (Германия) и группа из Вашингтонского университета создали первые трансгенные растения - санбин.

1990г. - первое коммерческое применение ГМО в США.

1992г. - в Китае начали промышленно выращивать трансгенный табак, устойчивый к насекомым.

1994г. - в США зарегистрировали первое трансгенное растение, предназначенное для употребления в пищу, - томаты “Флавр-Савр” с замедленным созреванием.

1999г. - получены трансгенные растения более чем 120
ВИДОВ.

В чём преимущества методов генной инженерии по сравнению с традиционной селекцией?

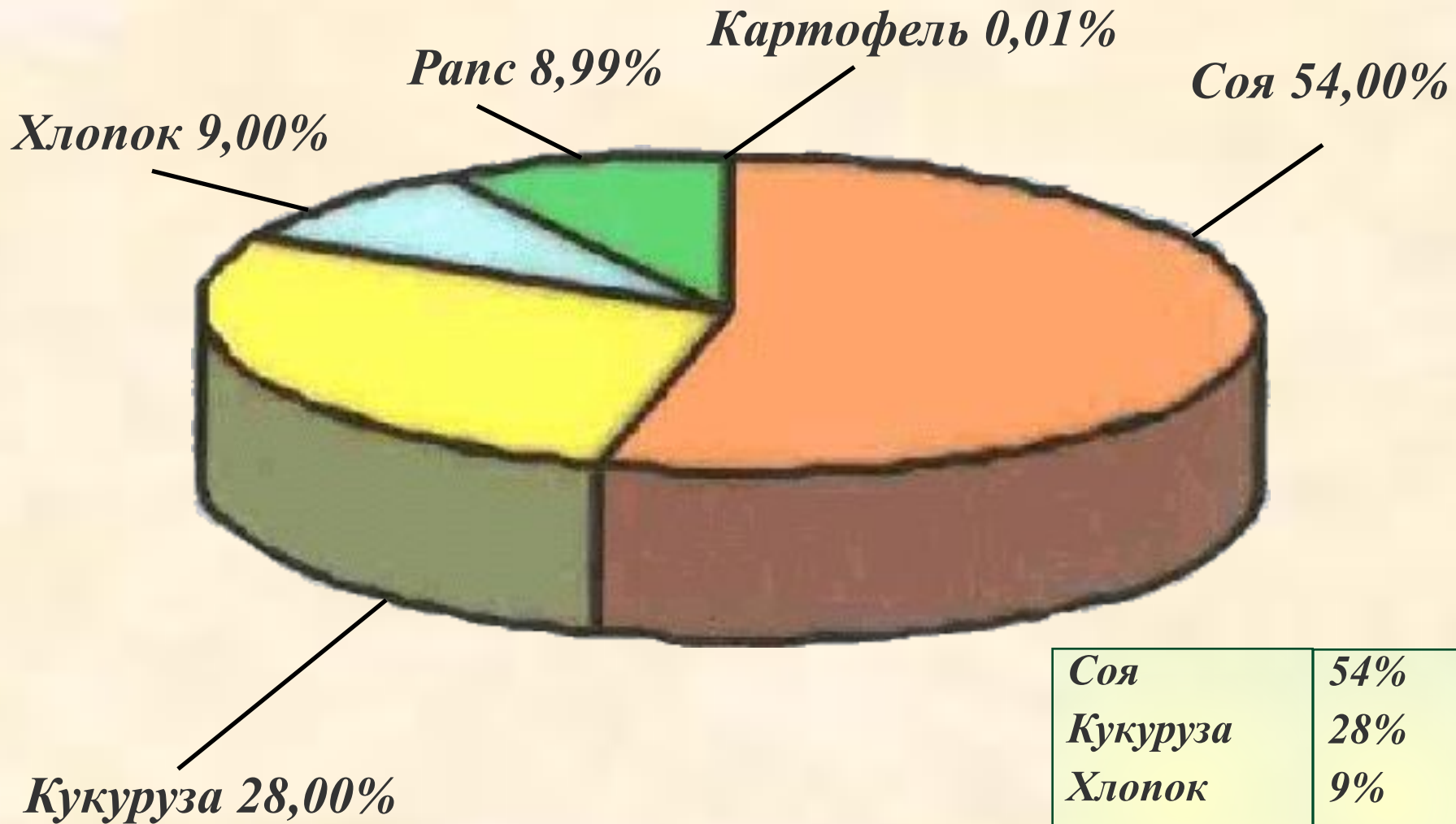
- ❑ Значительное ускорение создания сорта (1-3 года против 10 и более лет).
- ❑ Избавление от значительного количества «генетического балласта».
- ❑ Создание растений с заданными признаками. Традиционная селекция отбирает растения, которые нас устраивают, биотехнология создает растения, которые нам нужны.
- ❑ Большая возможность контроля целевого гена за счет управления его экспрессией в нужных органах, тканях и в нужное время.



Уолтер Гилберт

*Создание ГМ растений с полезными свойствами –
устойчивостью к гербицидам, вредителям и вирусам.
1980-е годы*

Основные культуры трансгенных растений



<i>Соя</i>	<i>54%</i>
<i>Кукуруза</i>	<i>28%</i>
<i>Хлопок</i>	<i>9%</i>
<i>Рапс</i>	<i>9%</i>
<i>Картофель</i>	<i>0,01%</i>

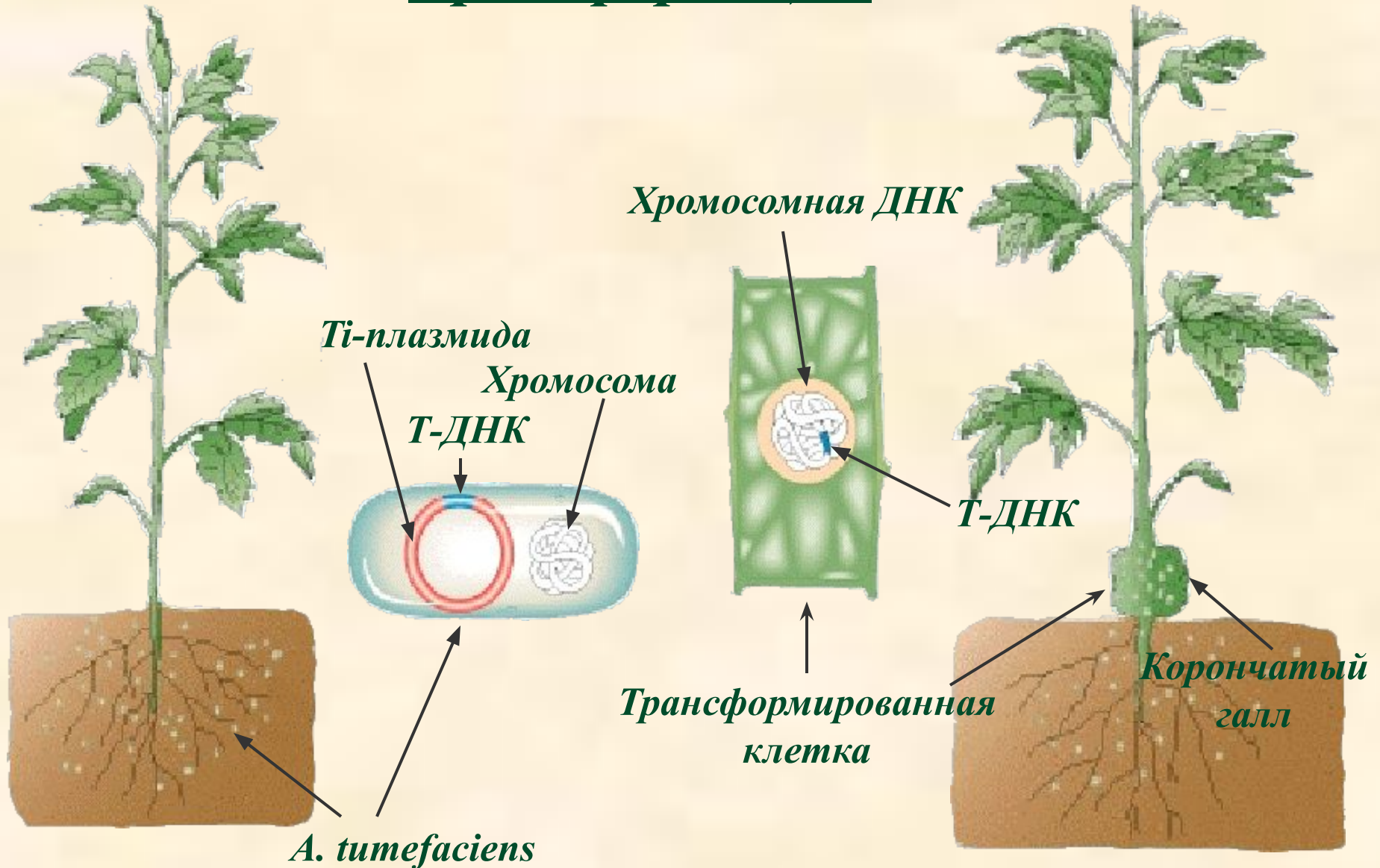
Основные направления биотехнологии:

- **производство продуктов питания с заданными характеристиками;**
- **производство веществ вторичного метаболизма и фармбелков;**
- **получение растений с декоративными признаками;**
- **использование трансгенных растений в фундаментальных исследованиях.**

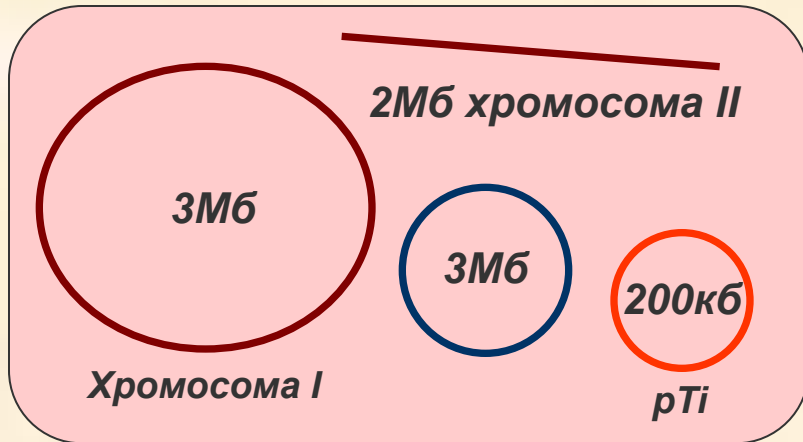
Векторные системы для переноса генов в растения

- Вирусы растений
- Транспозоны
- Агробактерии

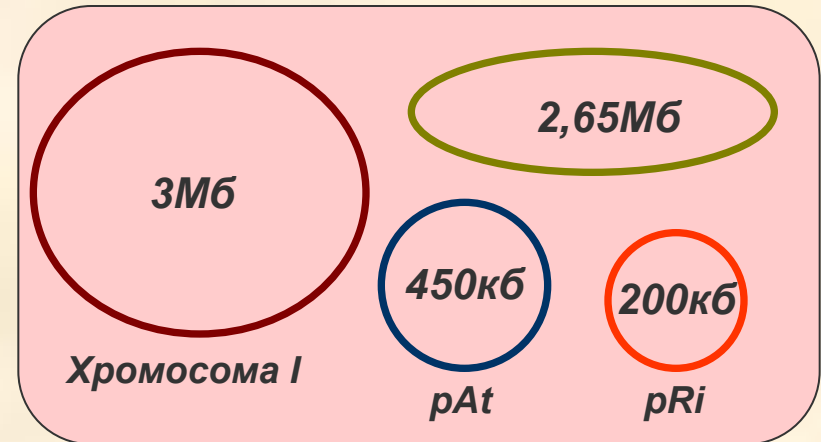
Схема агробактериальной трансформации



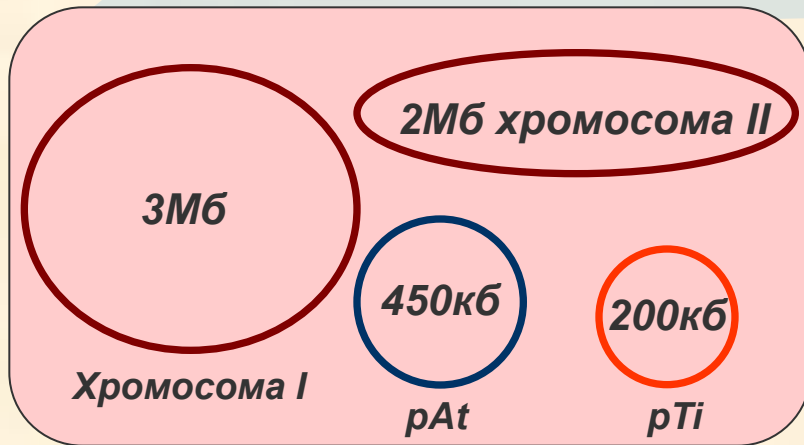
Геном агробактерий



A. tumefaciens

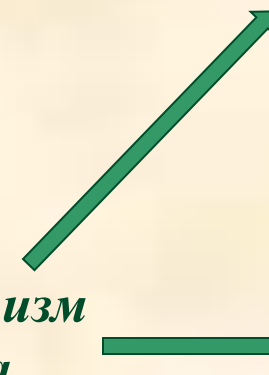
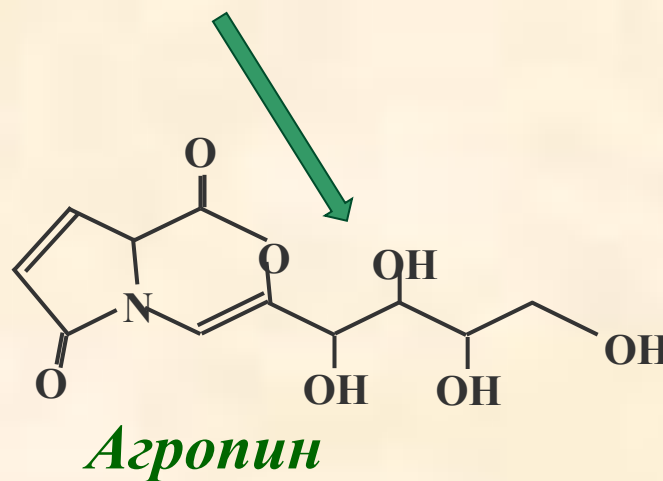
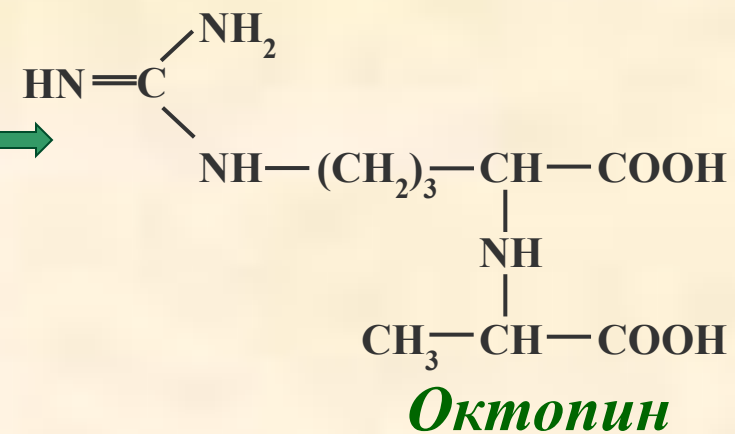
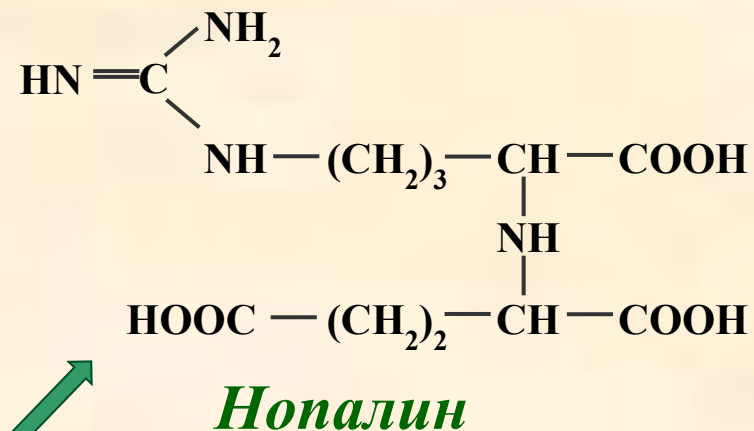
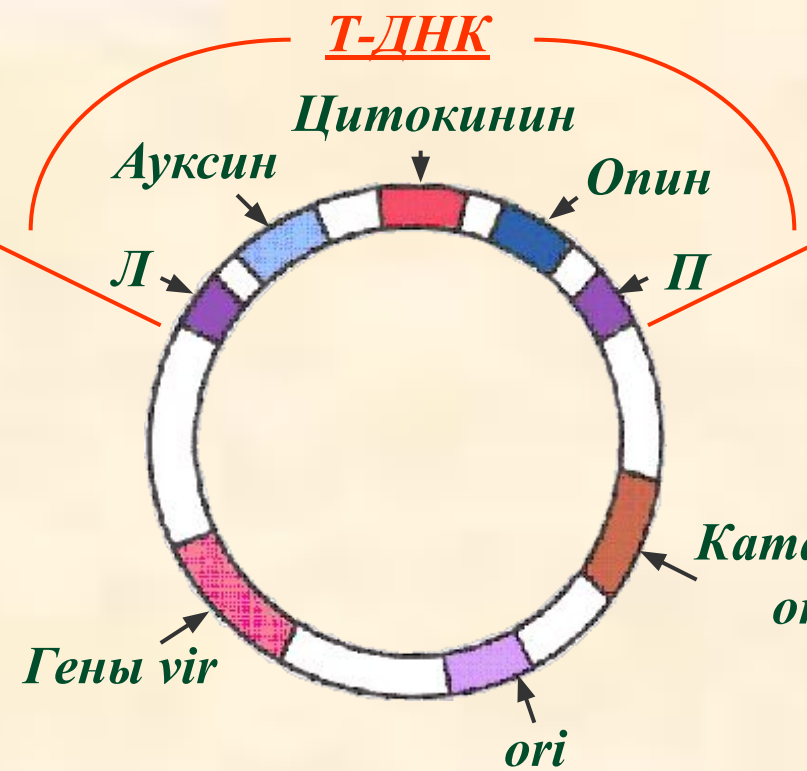


A. rhizogenes

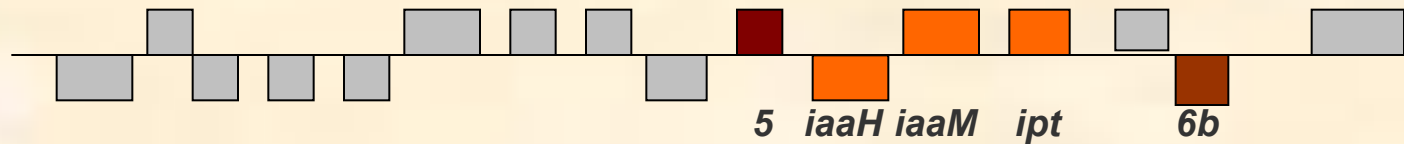


A. vitis

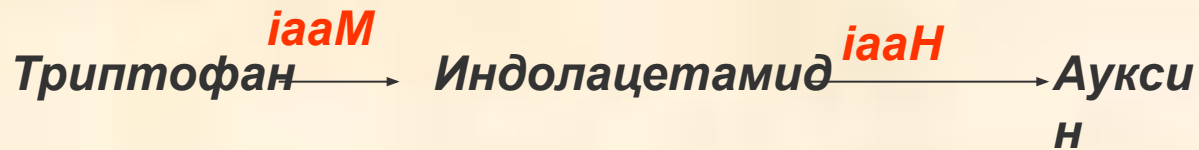
Структура Ti-плазмиды и основные опины



Онкогены *A. tumefaciens*



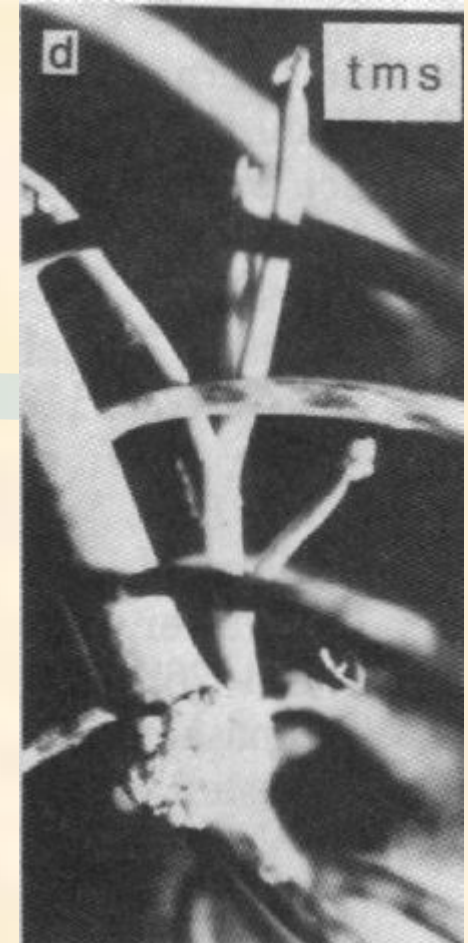
1. *tms*-гены (*iaaM*, *iaaH*)



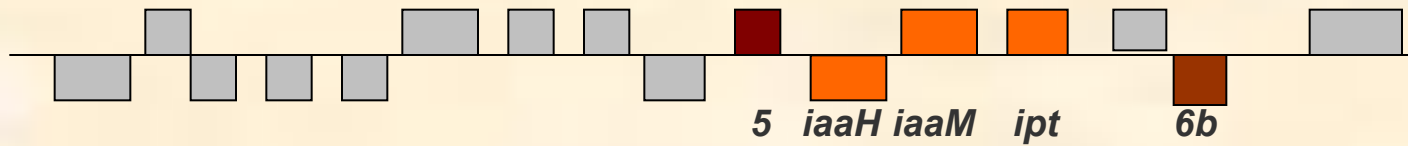
Гены бактериального происхождения, гомологи аналогичных генов у других ауксин-синтезирующих фитопатогенов



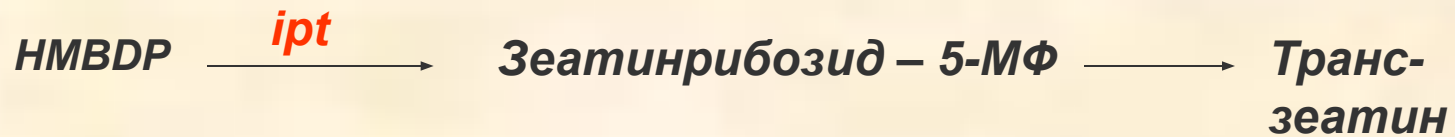
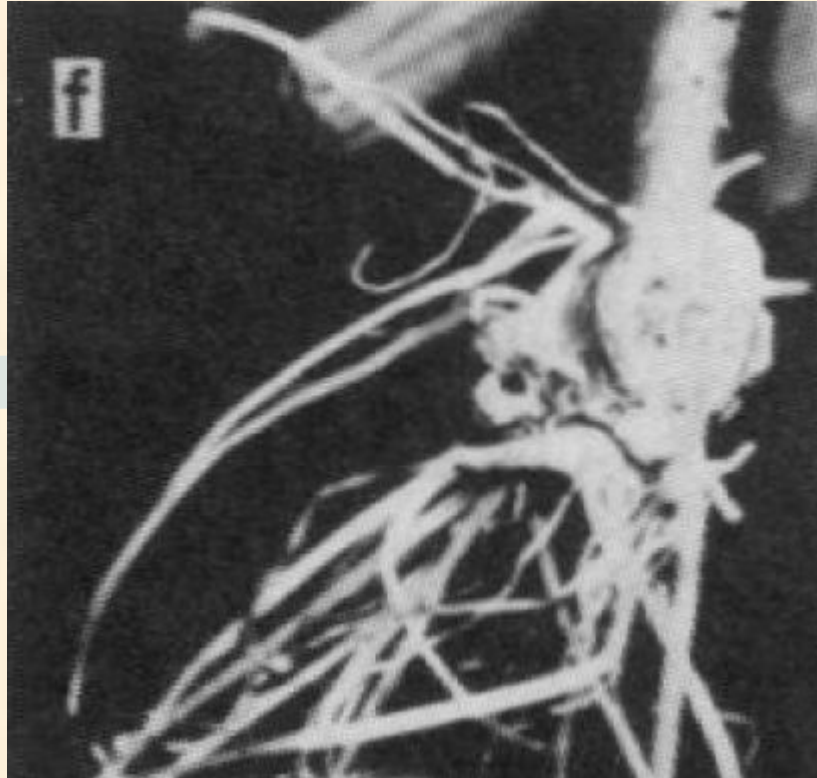
Pseudomonas savastanoi



Онкогены *A. tumefaciens*



2. *tmr*-ген (*ipt*)



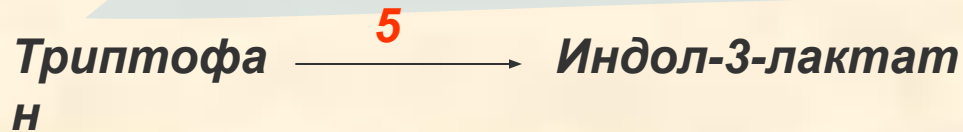
Онкогены *A. tumefaciens*

3. *tmi*-локус(6a, 6b)

6a – опиновая пермеаза

6b – онкоген с неизученным механизмом действия, взаимодействует с некоторыми хозяйскими ТФ.

4. ген 5.



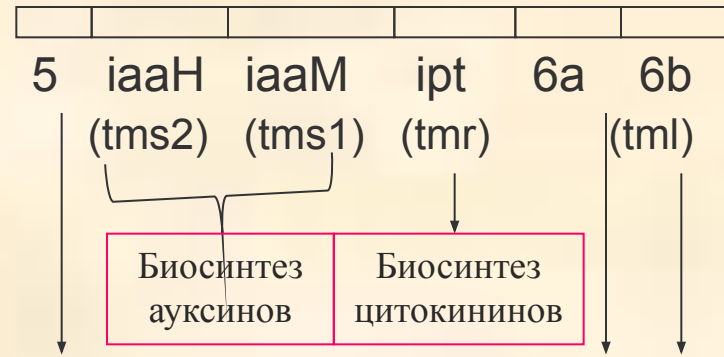
Онкогены T_i и R_i плазмид



T_i плазида
Agrobacterium tumefaciens

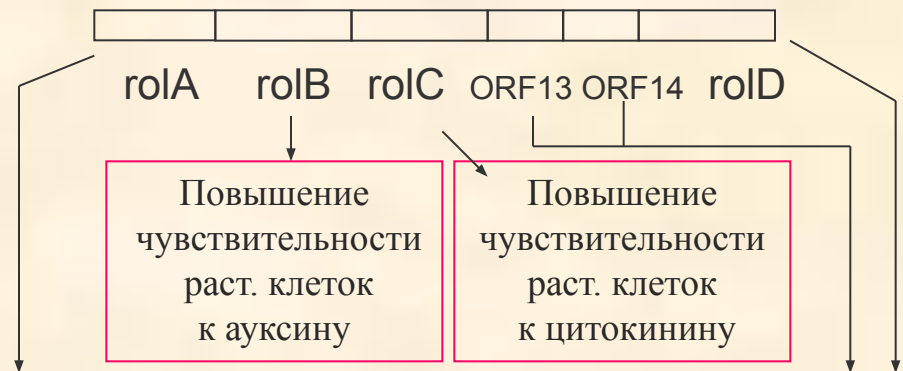
R_i плазида
Agrobacterium rhizogenes

T-ДНК T_i-плазмиды



Точная функция неизвестна, предположительно связана с метаболизмом ауксинов и цитокининов

T-ДНК R_i-плазмиды



Точная функция неизвестна, предположительно связана с метаболизмом ауксинов и цитокининов

Онкогены *A. rhizogenes*.

Набор онкогенов *A. rhizogenes* не совпадает с набором онкогенов *A. tumefaciens* и не всегда содержит гены синтеза гормонов.

RoIA - есть на всех *Ri*-плаزمидеах. Снижает концентрацию ауксина, повышает чувствительность к нему. Экспрессируется и в самих бактериях.

RoIB – рассматривается как основной онкоген *A. rhizogenes*. Повышает чувствительность клеток к ауксину

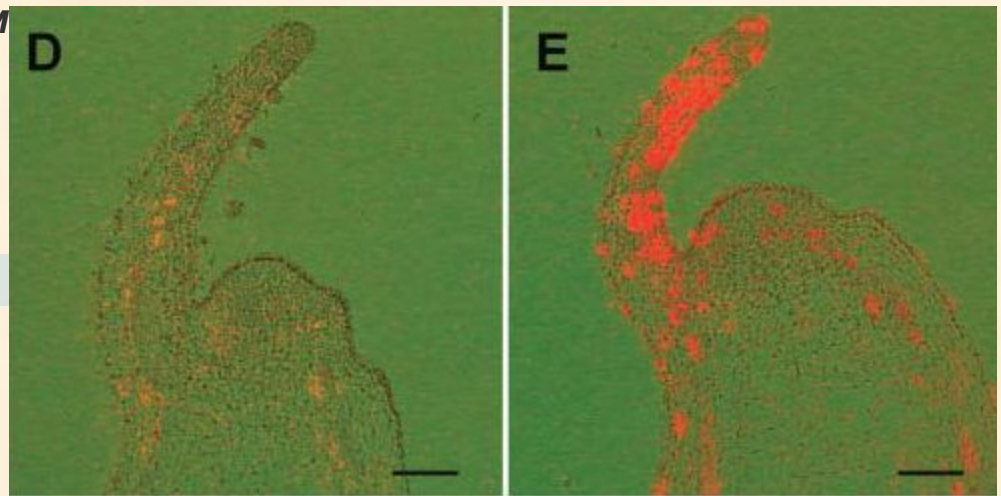
RoIC – β -гликозидаза. Гидролизует неактивные цитокинин-гликозиды или влияет на клеточный цикл через регуляцию метаболизма сахаров.

RoID – орнитин-циклодеаминаза



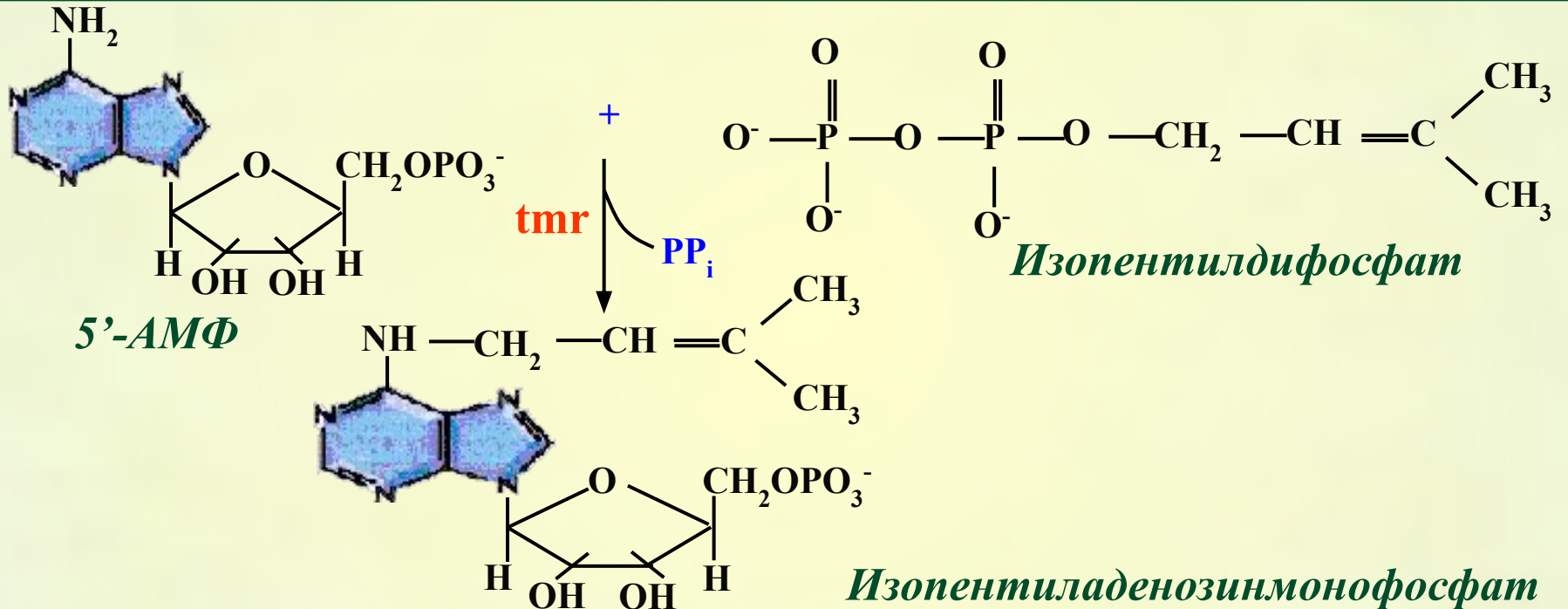
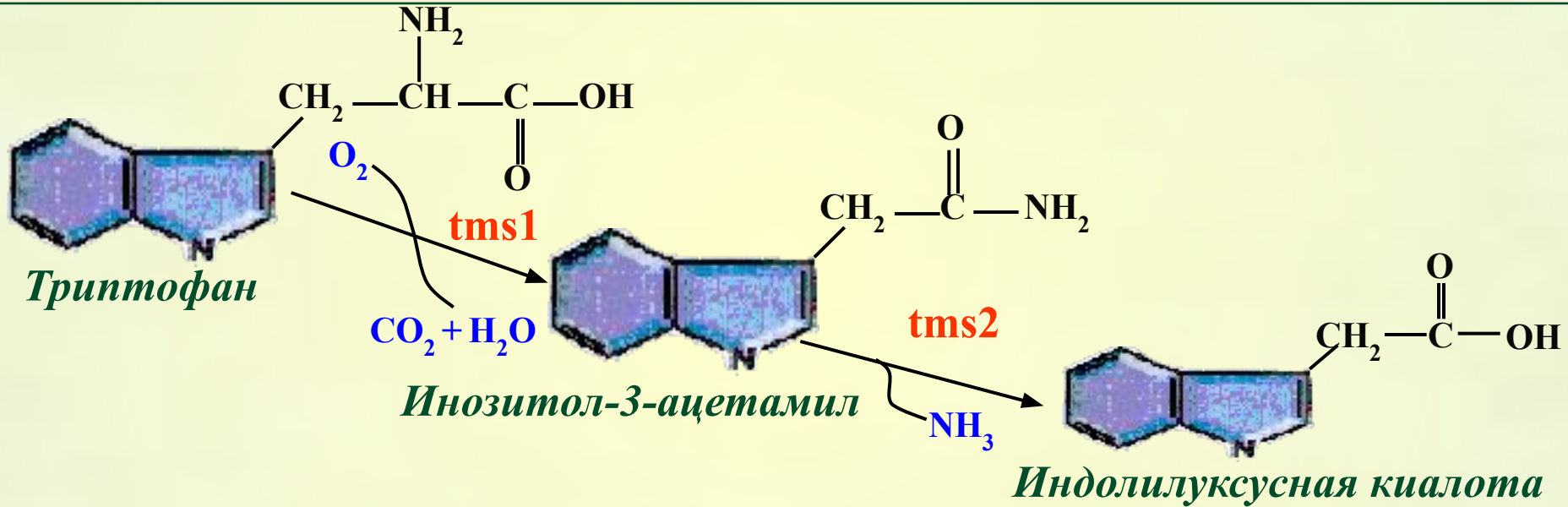
Онкогены *A. rhizogenes*.

ORF13 – связывает белок ретинобластомы (*Rb*). Стимулирует пролиферацию клеток, вызывает эктопическую экспрессию *KNOX*-генов. В конечном итоге способствует дедифференцировке трансформированных клеток и образованию новой м

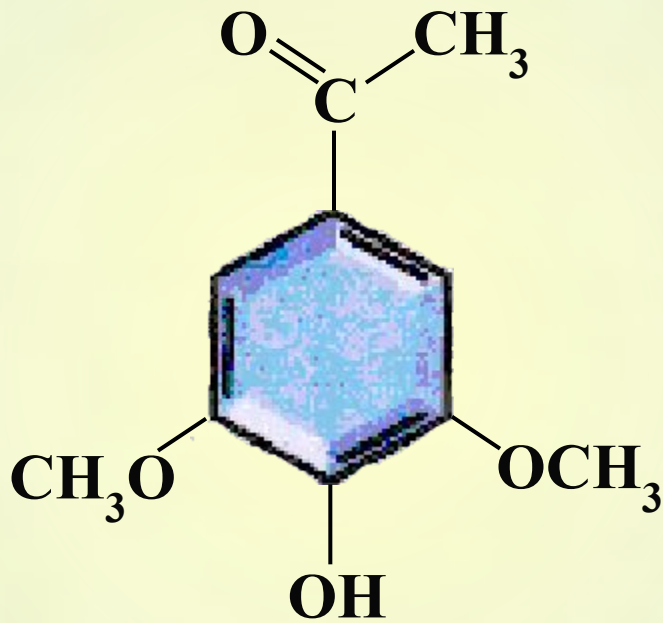


aux1, *aux2* – гены синтеза ауксина, гомологи *iaaM* и *iaaH*. Только у агропиновых штаммов.

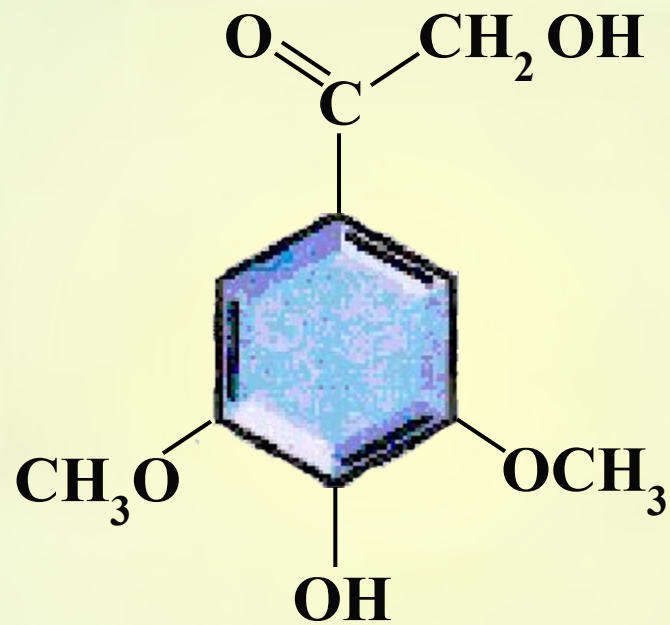
Пути биосинтеза основных гормонов в агробактерии



Сигнальные молекулы

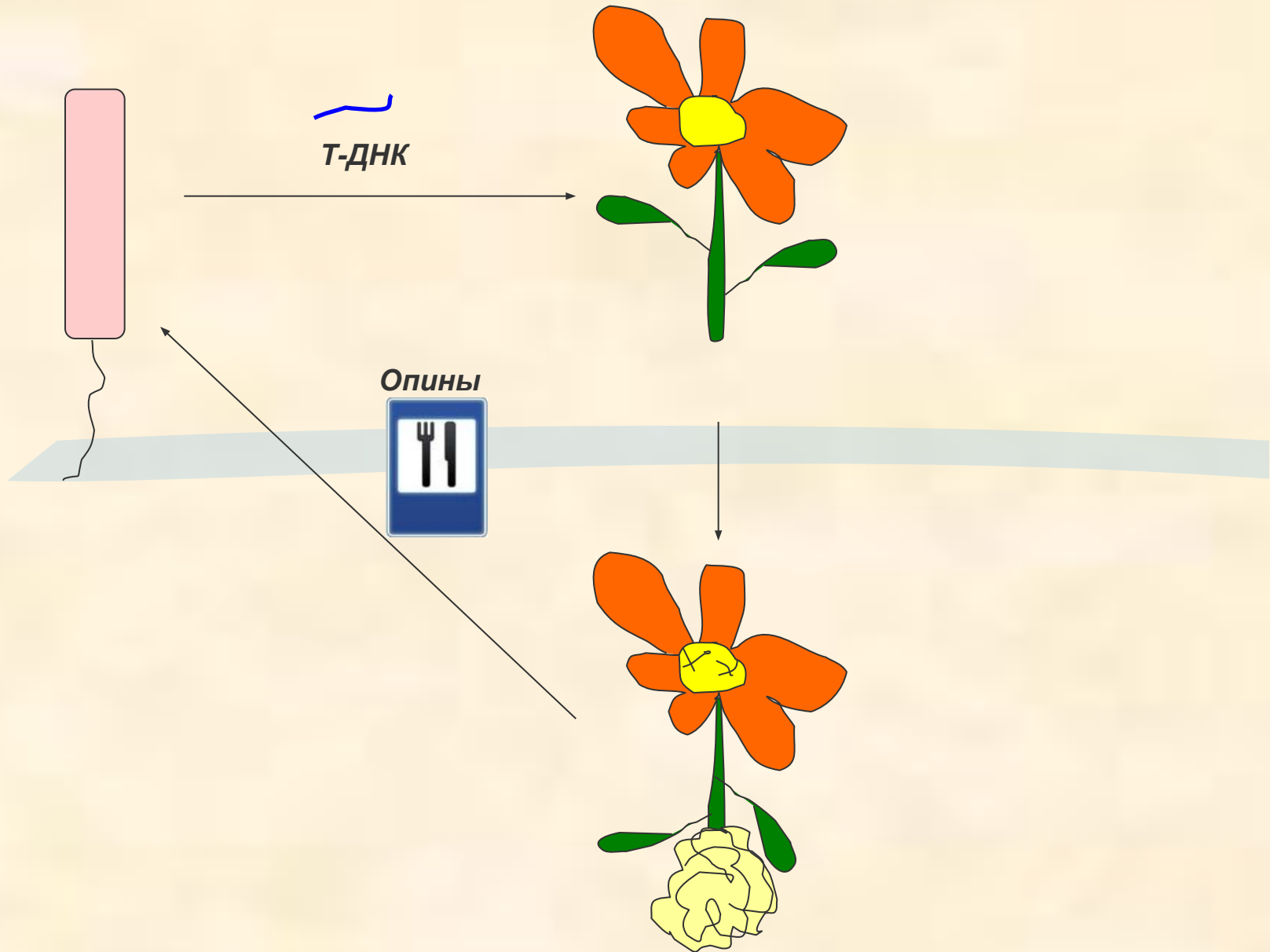


Ацетосалицилат

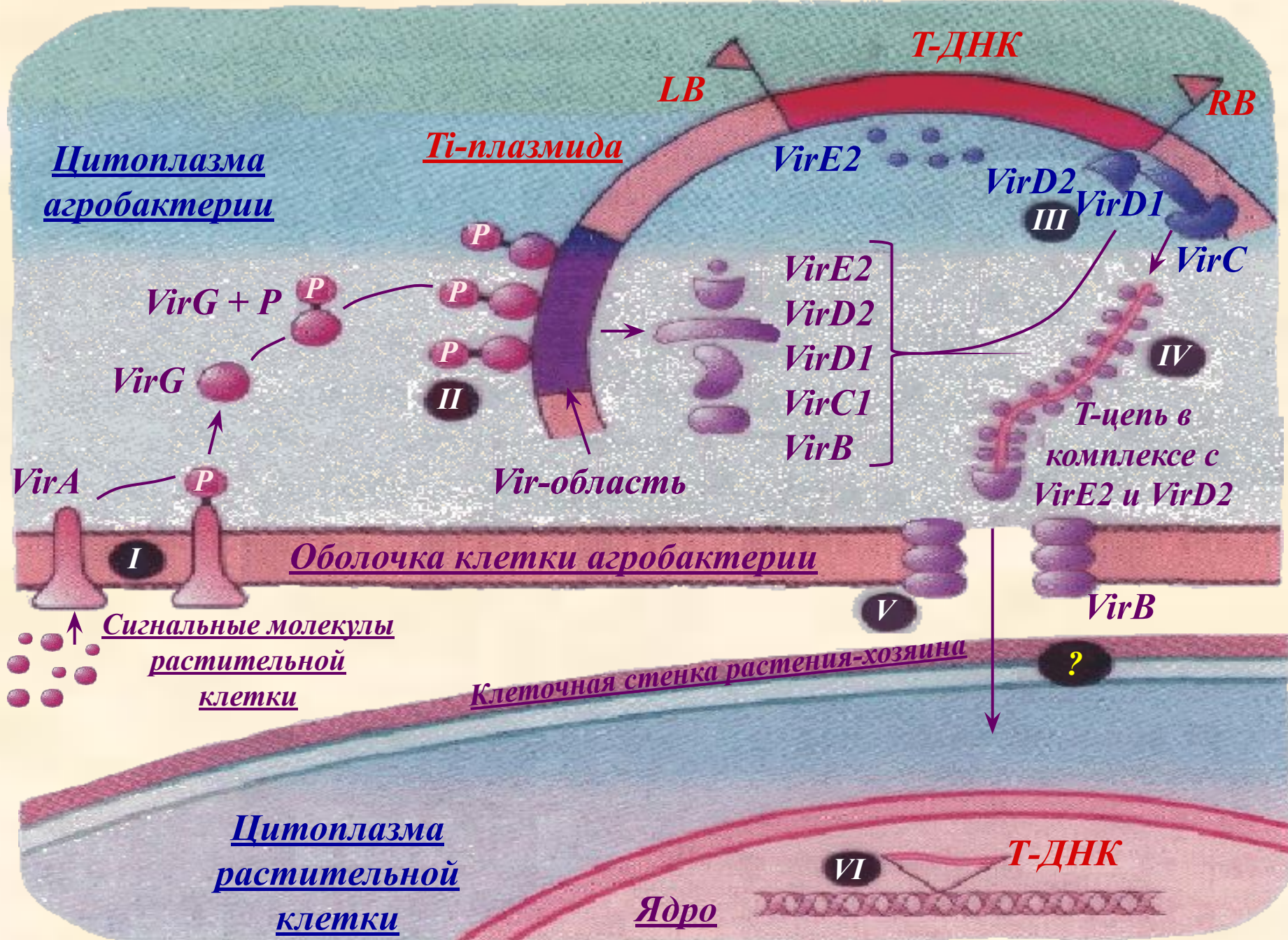


Гидроксиацетосалицилат

Опиновая концепция



Интеграция T-ДНК в геном растения



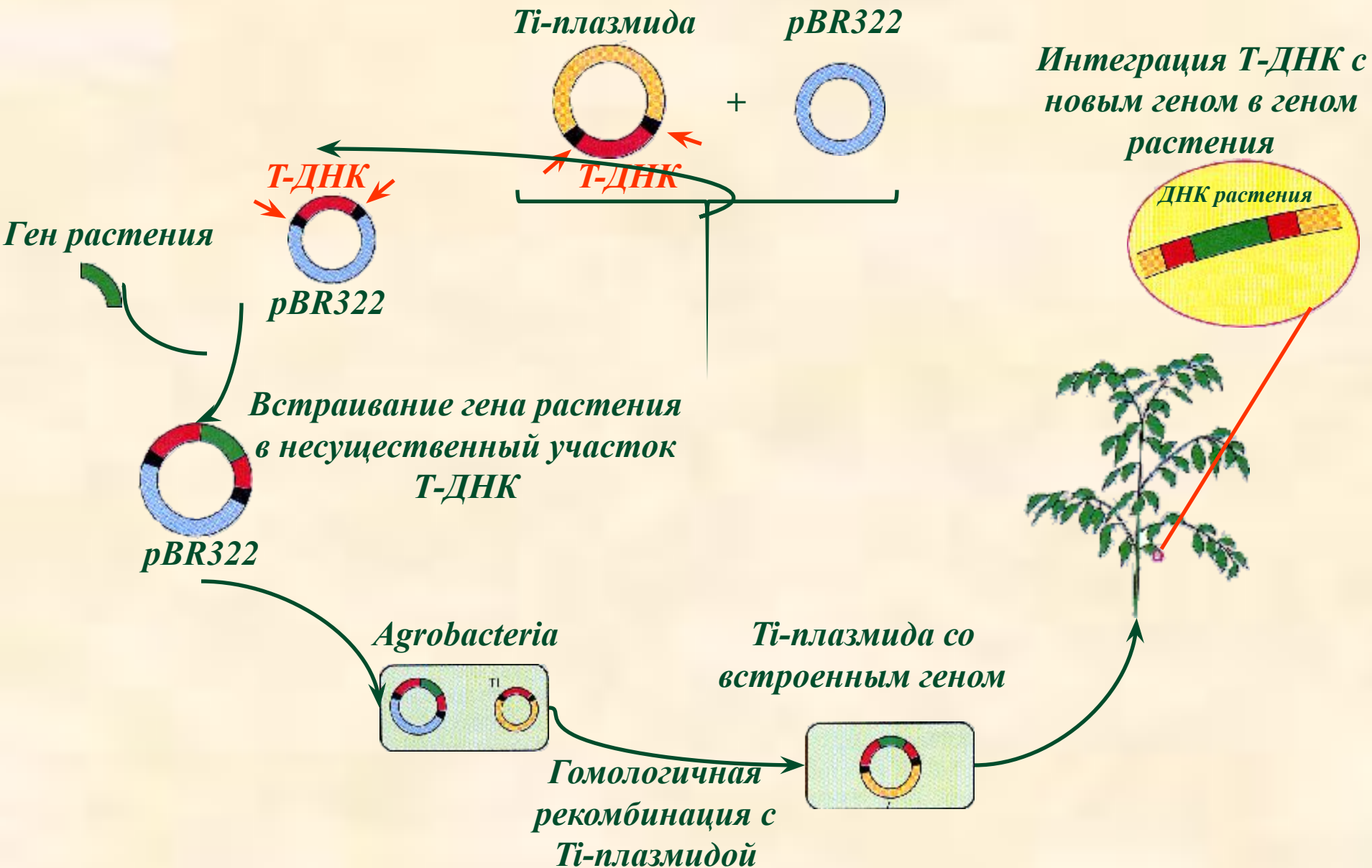
Требование к векторным системам

Идеальная векторная система на основе

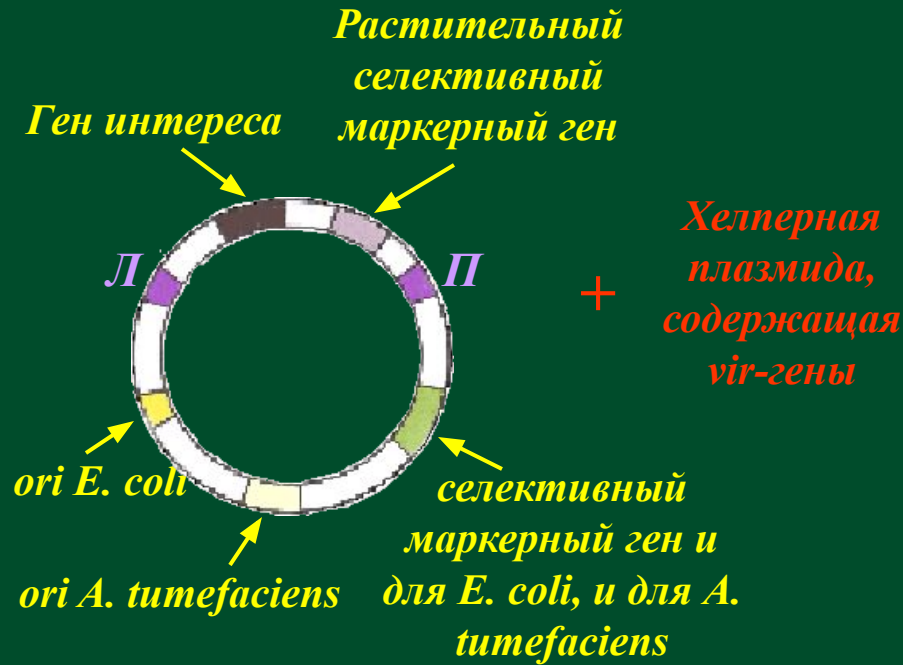
Ti-плазмиды должна содержать:

- ♦ *сигналы, необходимые для переноса и стабильной интеграции в ДНК растений;*
- ♦ *узнаваемый растительными полимеразами промотор;*
- ♦ *селективный маркер для селекции трансформированных клеток;*
- ♦ *репортерные гены для отбора трансгенных растений;*
- ♦ *полилинкер (уникальные сайты рестрикции), в который будет клонирован чужеродный фрагмент ДНК;*
- ♦ *не содержать онкогены.*

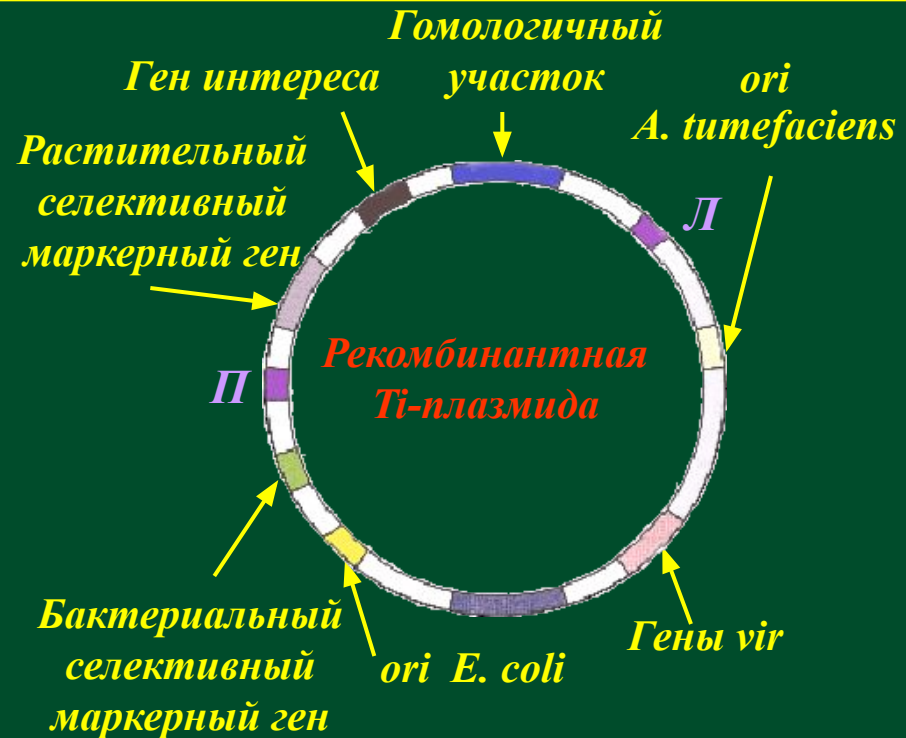
Схема конструирования вектора на основе Ti-плазмиды



Бинарный вектор



Коинтегративный вектор



Репортерные и селективные маркеры

неомицинофосфотрансфераза

гигромицинофосфотрансфераза

дигидрофолатредуктаза

хлорамфеникол-ацетилтрансфераза

гентамицин-ацетилтрансфераза

нопалинсинтаза

октопинсинтаза

β -глюкоронидаза

стрептомицинофосфотрансфераза

фермент, обуславливающий устойчивость к блеомицину

люцифераза светляка

бактериальная люцифераза

треониндегидрогеназа

металлотионеин II

енол-пирувилкинат-3-фосфатсинтаза

фосфинотрицин-ацетилтрансфераза

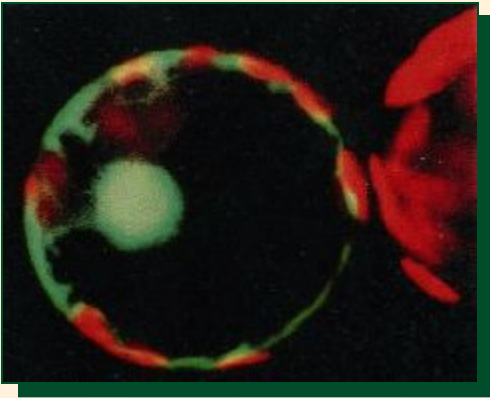
β -галактозидаза

бластицидин S-дезаминаза

ацетолактатсинтаза

бромоксинилнитраза

Репортерные гены

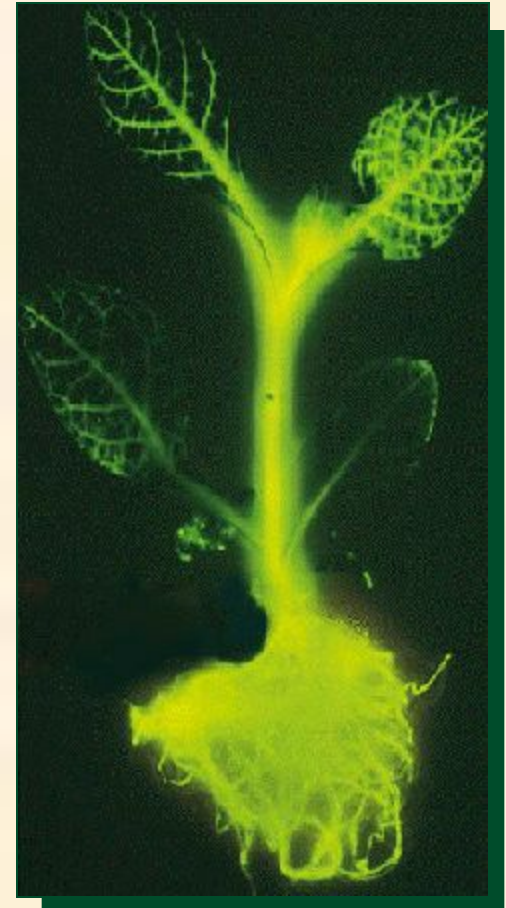


Ген GFP



Ген GUS

Ген LUX



Биолюминисценция у *Aequoria victoria*



aequorin



Зеленый флюоресцентный белок

Репортерные гены



Методы трансформации

☐ Методы прямого переноса

- ✓ электропорация
- ✓ биобаллистика
- ✓ трансфекция

☐ Методы непрямого переноса

- ✓ вирусная трансформация (трансдукция)
- ✓ агробактериальная трансформация

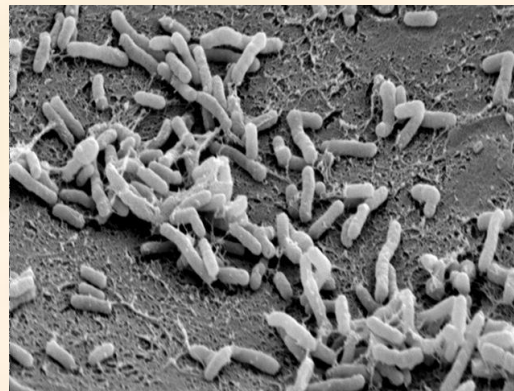
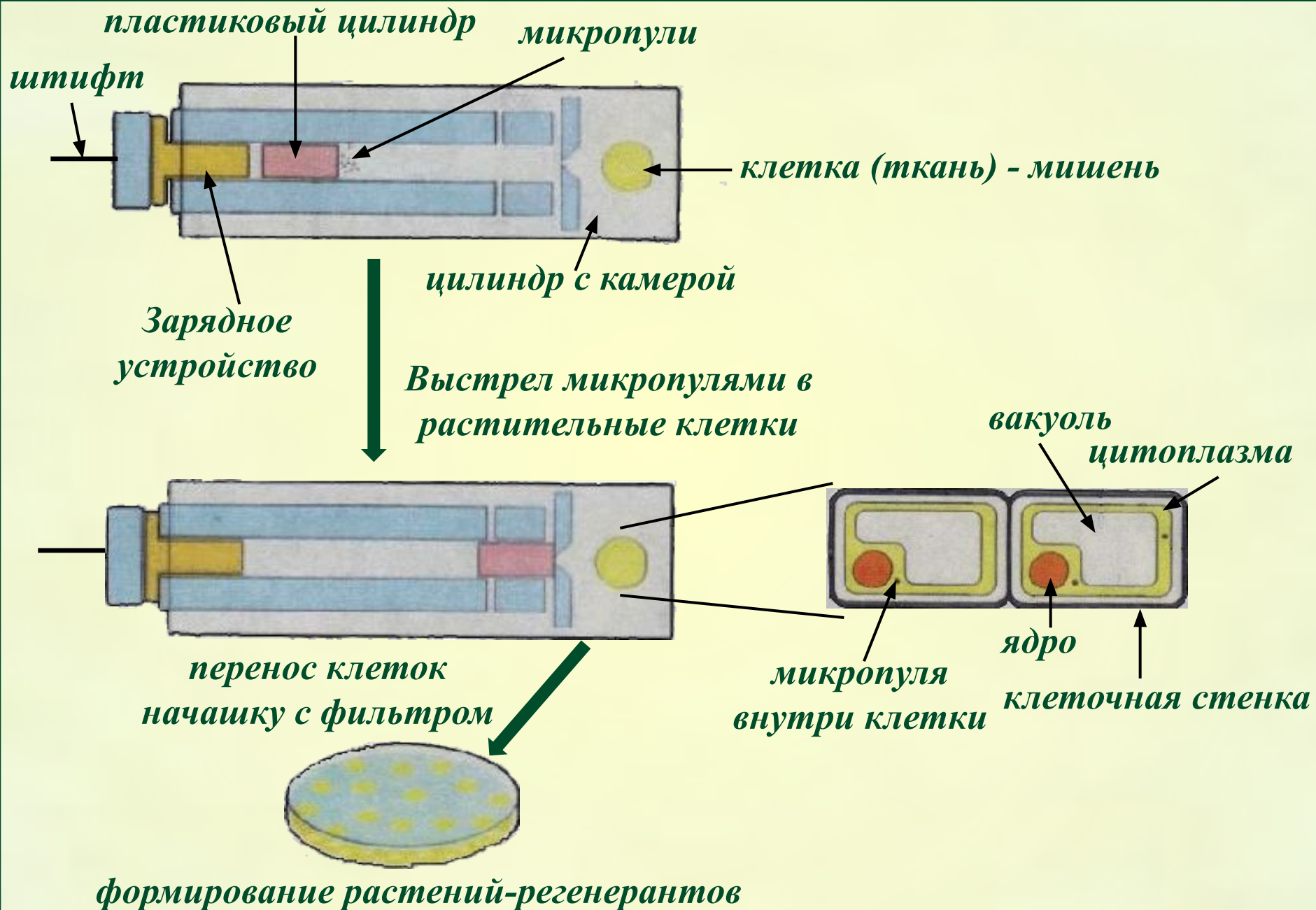
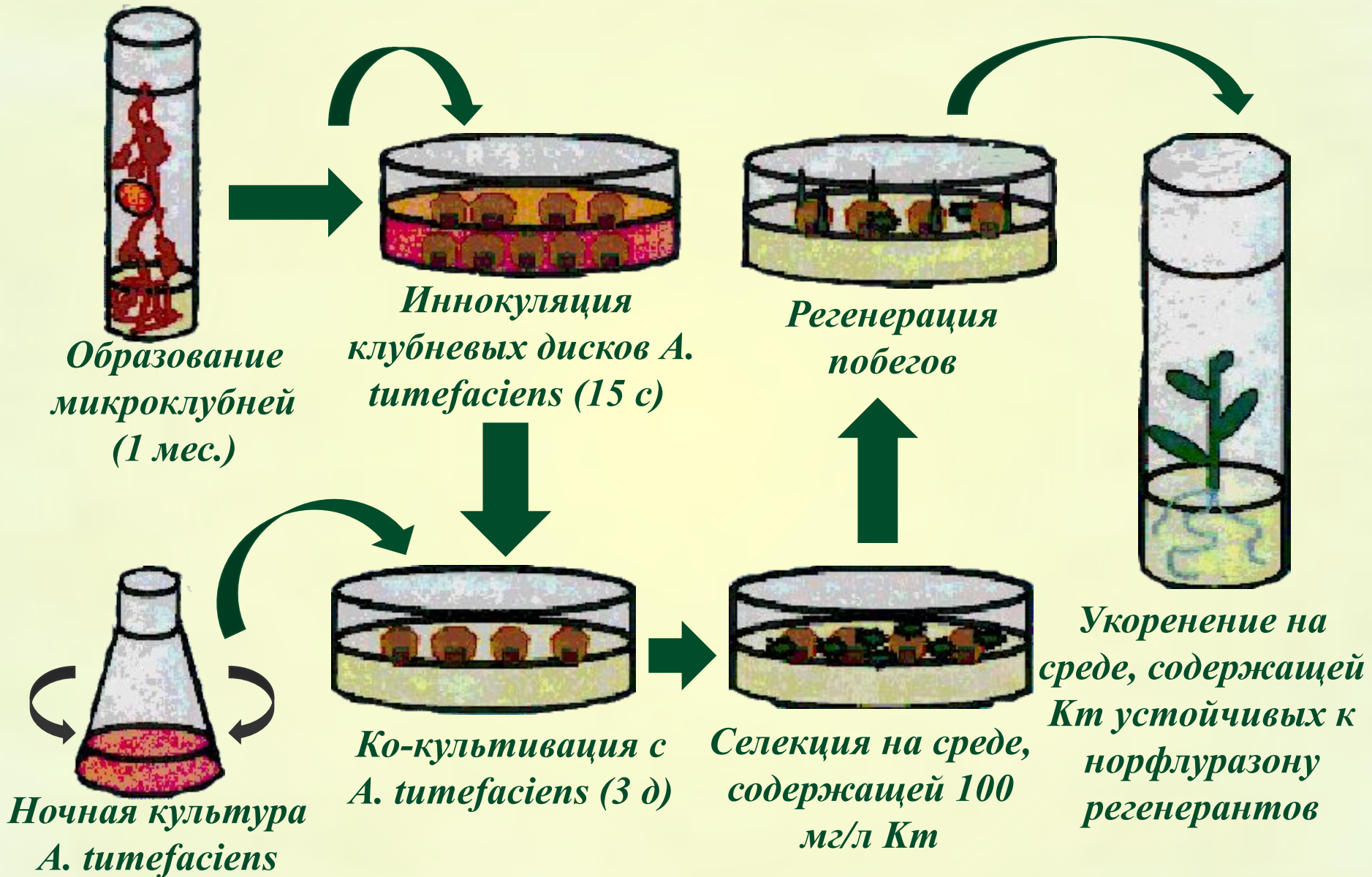


Схема баллистической трансформации



Трансформация картофеля *Agrobacterium*



Трансформация гороха *Agrobacterium*



Спелый горох

96% этанол,
20 минут



Удаление корней и
разделение горошины на
2-4 части



Среда B5: + 0,5 мг/л 2-4D
4,5 мг/л BAP

Вакуум

Агробактериальная
суспензия



Фильтровальная бумага



Среда MS: + 5 мг/л BAP

2 мг/л NAA, с *Agrobacterium*

48 ч



Среда MS: + 5 мг/л BAP

2 мг/л NAA, 500 мг/л Cf,

5 мг/л Азацетидин

20 д



Среда MS: + 5 мг/л BAP

2 мг/л NAA, 500 мг/л Cf,

5 мг/л Basta

ПЦР, GUS окрашивание

Agrobacterium tumefaciens

Природный генный инженер



**Опухоль, вызванная
внедрением бактериальной
ДНК в растительные клетки**



**Агробактерии на поверхности
растительной клетки**

Eugene Nester и Frank White обнаружили в геноме нетрансформированного *Nicotiana glauca* последовательности, гомологичные участку плазмиды *Agrobacterium*



Nicotiana glauca

Примеры ГПГ от агробактерий к растениям.



N. glauca

rolC, rolB, ORF13,



sei

rolC



N. benavidesii



N. actinomi

ensii



ORF14



N. suaveolens

nata



N.

arentsii rolB



N. tabacum

rolC, ORF13, ORF14



N. glauca

Copyright BG Nijmegen



N. tomentosiflora



N. bigelovii

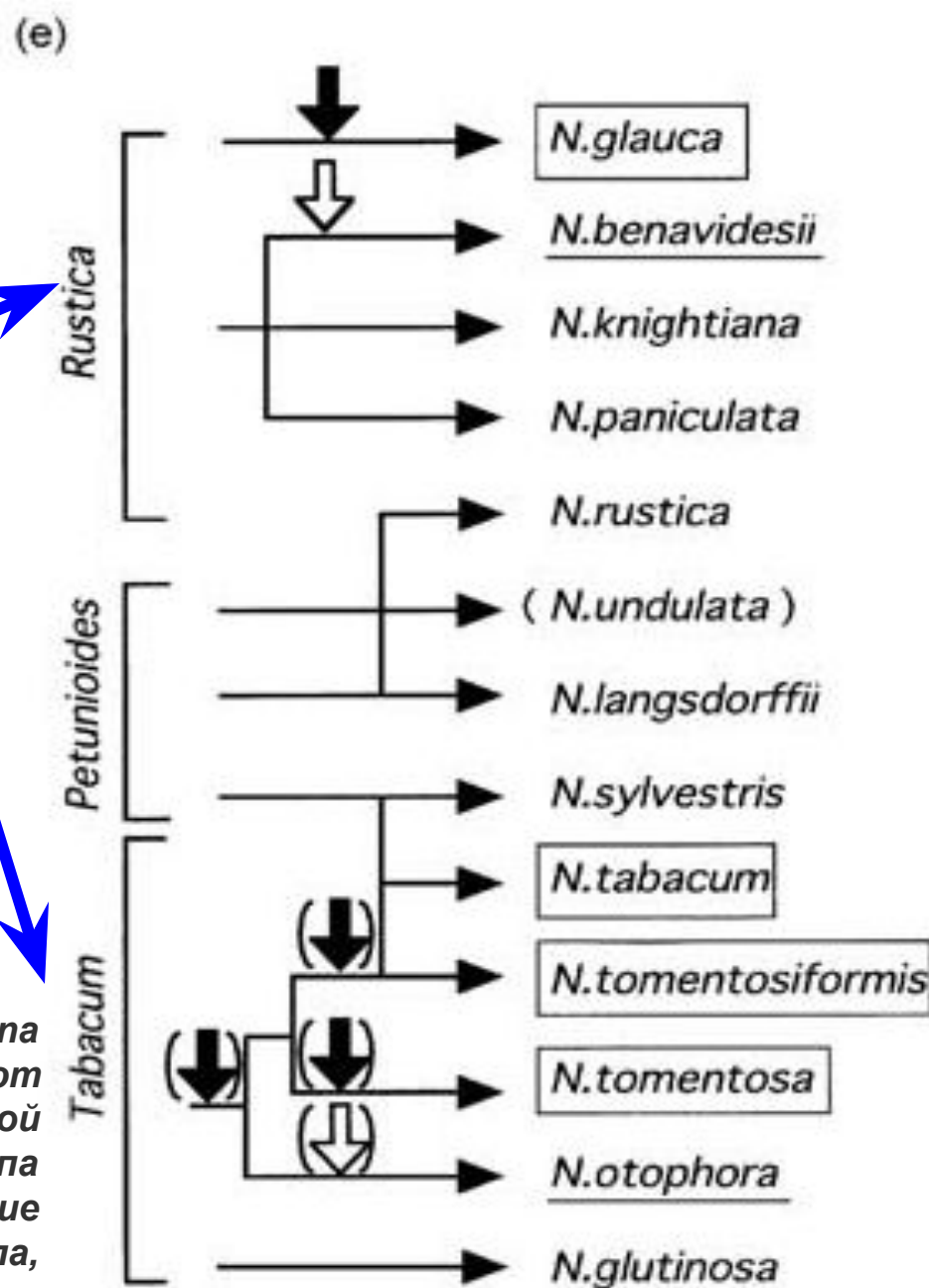


Актов трансформации в эволюции рода *Nicotiana* было несколько и проходили они независимо.

Существуют две группы Т-ДНК содержащих видов


Данные на основании сравнения приграничных последовательностей, а также гомологов микимопин синтазы.

Схема дивергенции части рода *Nicotiana* (черные и белые стрелки показывают предполагаемое инфицирование плазмидой микимопинового типа и неизвестного типа опинов, соответственно. Виды, содержащие Т-ДНК *Ri* плазмиды микимопинового типа, заключены в прямоугольник, виды, содержащие Т-ДНК *Ri* плазмиды неизвестного типа опинов, подчеркнуты)



(Suzuki et.al., 2001, 2002)

Expression of the oncogenes



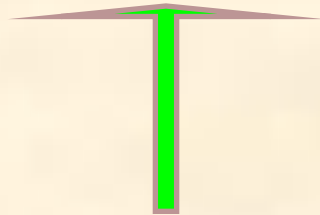
species	tissues	
	leaves	calli
N. glauca	rolC	rolB,rolC,ORF13, ORF14
N. cordifolia	rolC	rolB,rolC,ORF13, ORF14
N. tabacum	ORF13	ORF13
N. tomentosiformis	ORF13	ORF13
N. debneyi	-	rolC
N. miersi	-	rolB

*(Intrieri M.C., Buiatti
M. 2001)*

- **Закрепление Т-ДНК в геноме растений – это уникальная черта рода *Nicotiana*?**
- **Встречается ли у других родов?**
- **Какова эволюционная роль вставки?**



Скрининг видов на наличие Т-ДНК содержащих последовательностей



**Разработка подхода на основе
Real-time PCR:
использование вырожденных
праймеров и TaqMan-зондов**

Probe intact, reporter is quenched

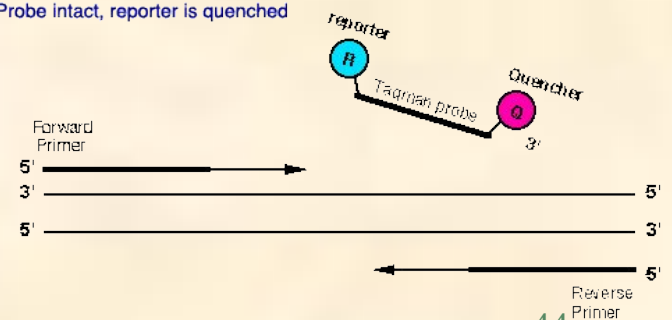
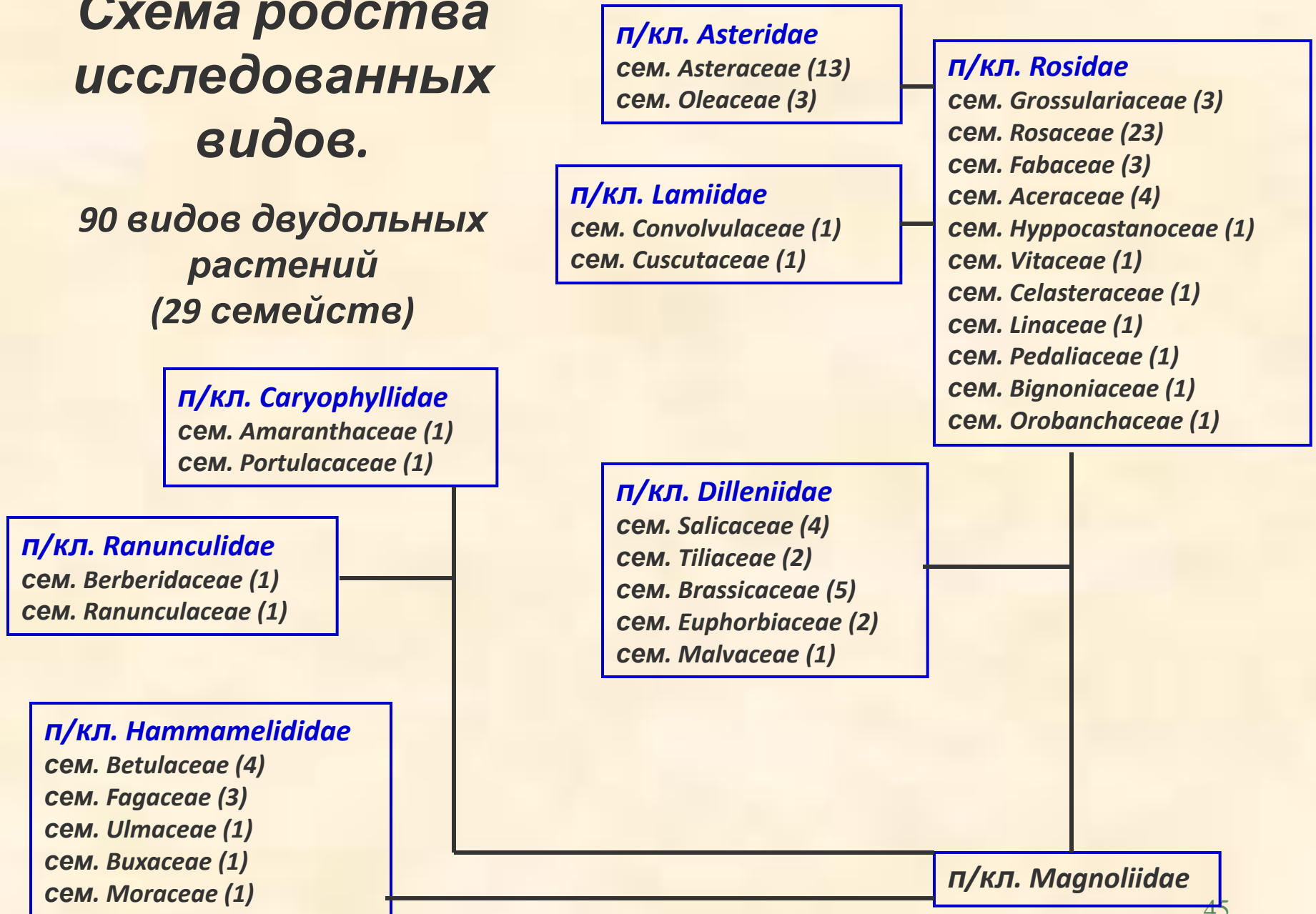


Схема родства исследованных видов.

90 видов двудольных
растений
(29 семейств)





Linaria vulgaris
L.

В 2006 году сотрудниками лаборатории ГКИР был обнаружен новый пример горизонтального переноса от агробактерий к высшим растениям.

В геноме *Linaria vulgaris* L. выявлены последовательности, гомологичные *Agrobacterium rhizogenes*.

Проведен целевой поиск подобных мотивов у других представителей рода *Linaria*

Linaria vulgaris L..

1. Выявлены последовательности, гомологичные *rolB*, *rolC*, *ORF13*, *ORF14* и *mis* (ген микимопин-синтазы)
2. Определена их нуклеотидная последовательность
3. Детально изучена структура вставки
4. Определено количество вставок
5. Охарактеризован район интеграции.

Анализ района инсерции у разных линарий.

- У разных видов совпадает район интеграции.

- Закрепление произошло до разделения видов, т.е. общий предок подвергся агротрансформации.



- «Видообразующий» характер вставки?!



Обнаружение явления косупрессии у растений

(Alexander R. van der Krol, et al 1990)



Окраска лепестков петунии,
трансформированной
генетическими конструкциями:
35S ::DFR и 35S::CHS



Гены DFR и CHS контролируют
биосинтез пигментов:
-ген DFR -кодирует
дихлорфлавонол-4-редуктазу
-ген CHS -кодирует халкон-синтазу