

Генетическая инженерия в создании стрессоустойчивых растений и биофарминге

Долгов С.В.

Станция искусственного климата
«Биотрон» ФИБХ РАН г.Пушино

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

- - ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ
- - СОЗДАНИЕ ПРИНЦИПИАЛЬНО НОВЫХ СОРТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР
- - «БИОФАРМИНГ» ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ, ВЕТЕРИНАРИИ И СУБСТРАТОВ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Динамика мировых площадей, занятых ГМ культурами (млн. га)

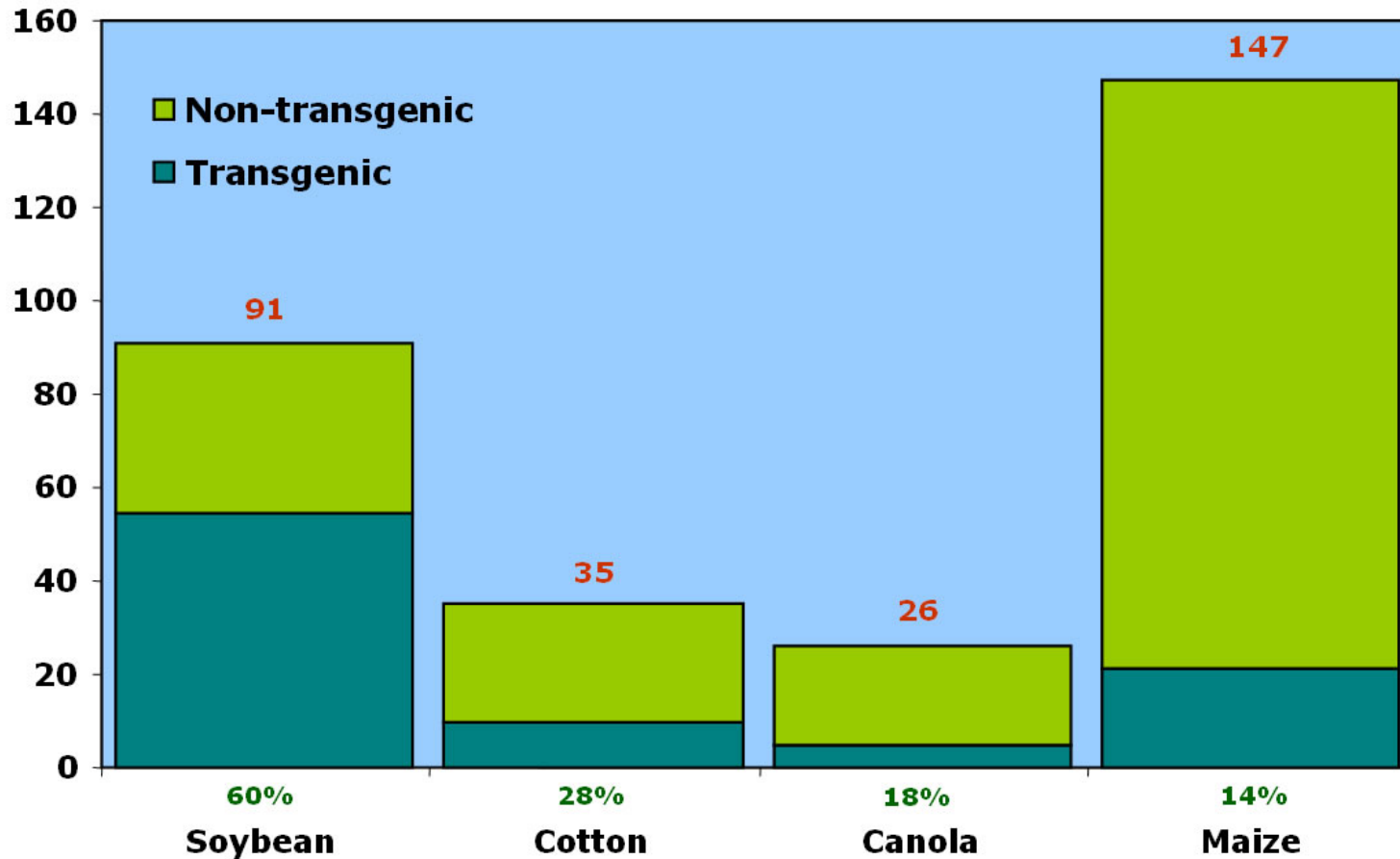


За 2007 г. площади под трансгенными с/х культурами выросли на 12.3 млн. га

Источник: Clive James, 2007.

Будущее сельского хозяйства планеты немыслимо без трансгенных растений

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares)



Source: Clive James, 2005

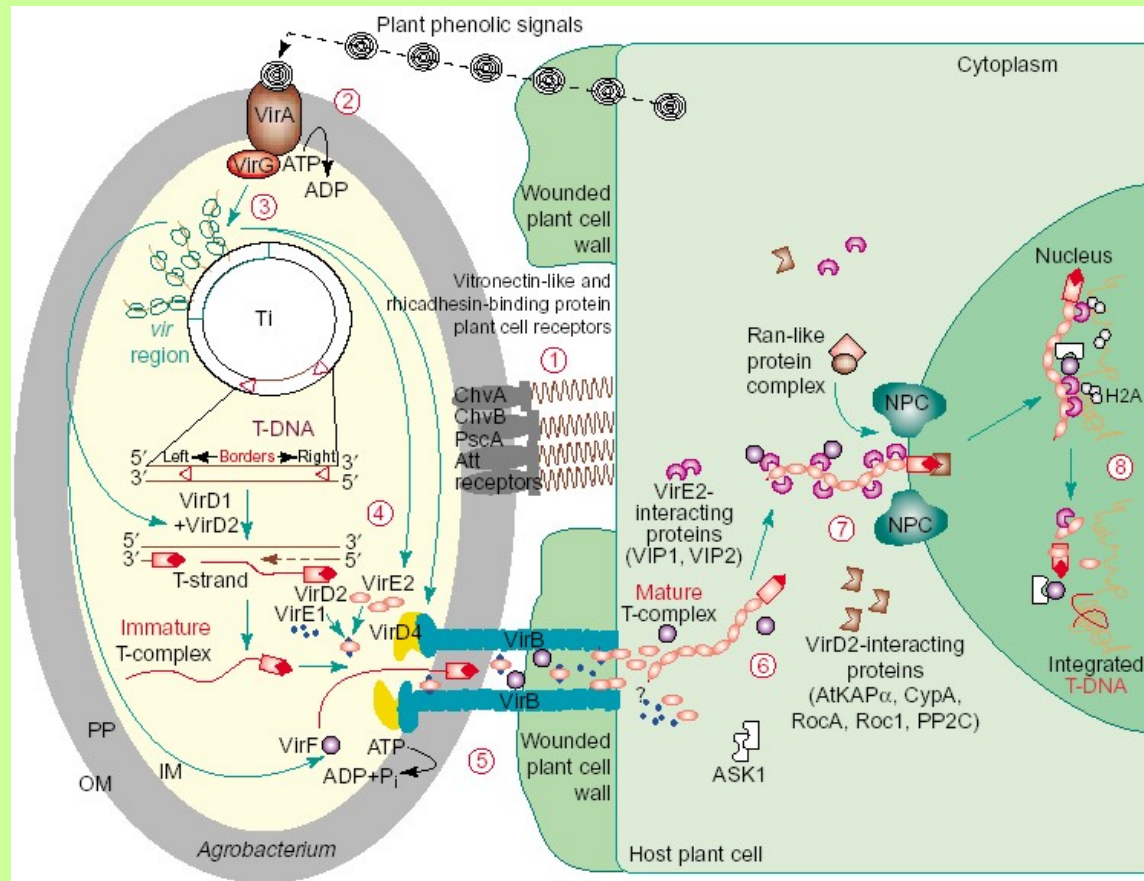
Основные этапы генетической трансформации и получения ГМР

- 1. Индукция морфогенного каллуса или прямой регенерации структуры, компетентной к вторичной регенерации
- 2. Доставка генов в клетку-мишень, компетентную к регенерации в растение
- 3. Встраивание чужеродных генов в геном реципиента - путем гомологичной - рекомбинации или случайно
- 4. Отбор - селекция трансформированной клетки. Введение наряду с геном «интереса» селективного гена для негативной (*hug*, *nptII*) или позитивной селекции (*bar*, *PMI*) фосфоманозаизомеразы
- 5. Индукция регенерации побегов или эмбриогенеза *in vitro*
- 6. Укоренение или прививка побегов
- 7. Адаптация пробирочных растений к условиям теплицы
- 8. Молекулярный - ПСР и саузерн анализы на предмет интеграции в геном и определение числа копий гена
- 9. Отбор трансформантов с высокой экспрессией трансгена и с наименьшими отклонениями от исходного фенотипа
- 10. UPOF - полевые испытания и испытания на биобезопасность



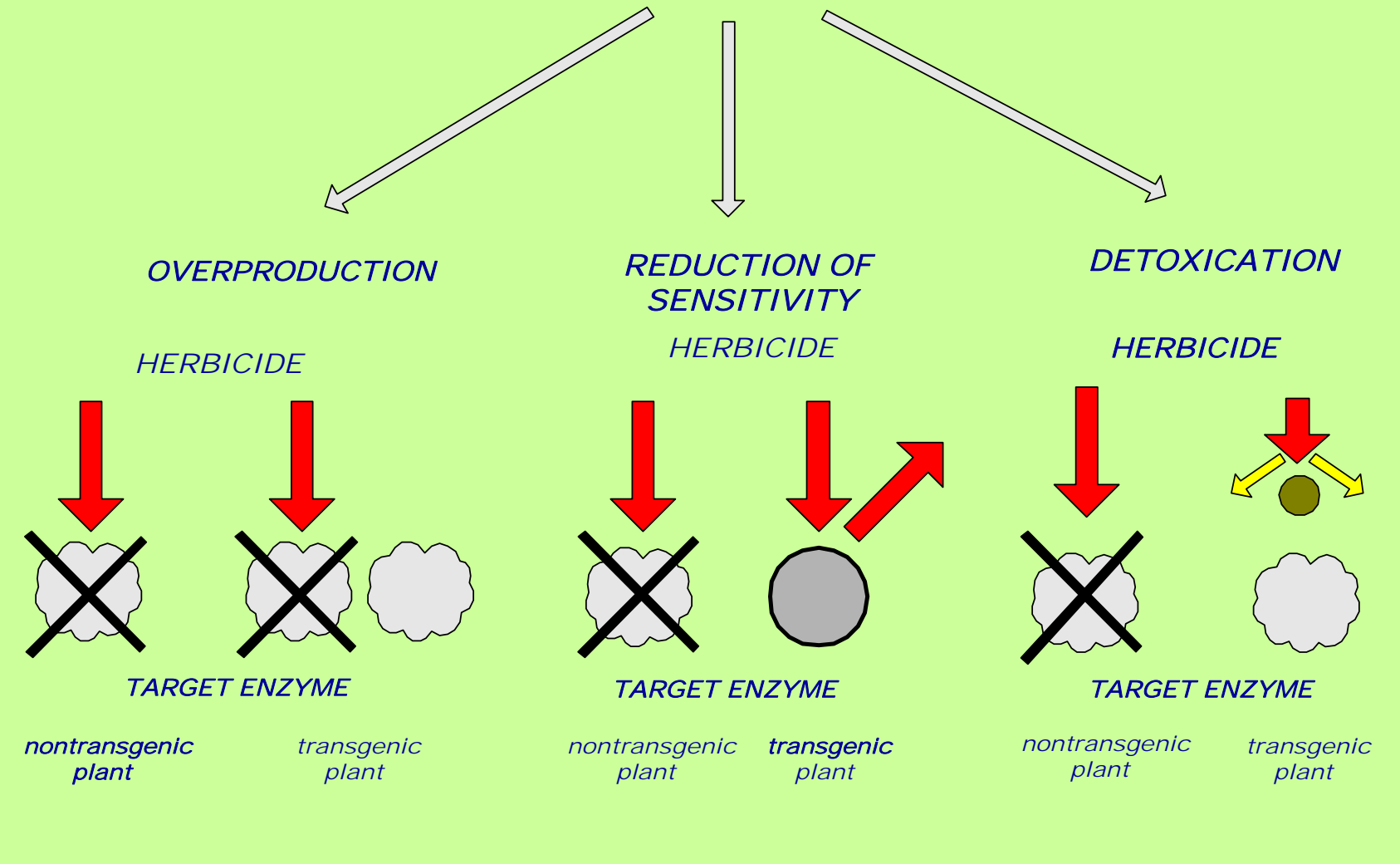
СИС. ГЕН.
ТРАНСФ.

Агробактериальная трансформация



Цитируется по Tzvi Tzfira and Vitaly Citovsky
TRENDS in Cell Biology Vol.12 No.3 March 2002

STRATEGIES FOR HERBICIDE RESISTANCE

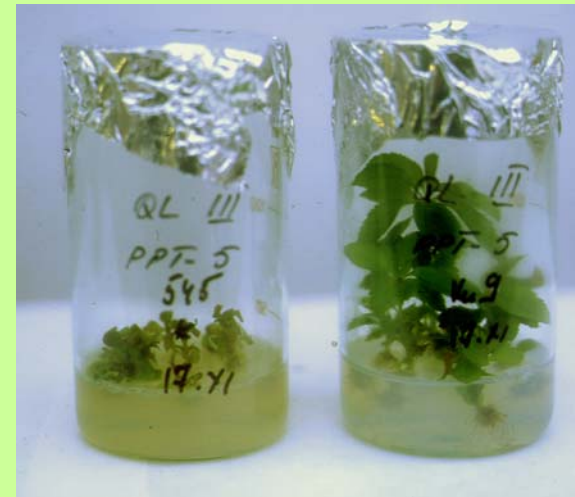


Resistance of transgenic pear rootstock plants to phosphinothricin in vitro

Clone	Phosphinothricin concentration, mg/l							
	0	100	200	300	500	750	1000	1500
P-BK	+	+/-	+/-	+/-	-	D		
P-BK2	+	+	+/-	-	D			
P-BU	+	+/-	-	D				
P-BU2	+	+	+/-	-	-	D		
P-BW	+	+	+	-	D			
P-BX	+	+	+	-	-	-	-	D
T-AP	+	+	-	-	D			
T-BO	+	+	+/-	-	-	D		
T-BT	+	+	-	-	-	-	D	
T-CD	+	+	-	D				
T-CF	+	-	D					
T2-AF	+	+	-	D				
T2-BF	+	+	+	+/-	-	-	-	D
T2-BR	+	+	+/-	-	-	-	-	D
T2-BS	+	+	+	+	-	D		
T2-DE	+	+/-	+/-	-	D			
T2-ES	+	+	+/-	+/-	-	-	-	D

nontransgenic plants died on 2 mg/l

- + - multiplication without damage
- +/- - without multiplication and without damage
- - various degree of necrosis
- D - death



Resistance of transgenic rootstock plants to herbicide "Basta" in greenhouse

Culture	Clone	Herbicide dosage equivalent to field treatment			
		3 l/ha	6 l/ha	12 l/ha	24 l/ha
Apple	control	D	D	D	D
	P9	++	++	++	+
Pear	control	D	D	D	D
	P-BK	++	++	++	NT
	P-BK2	++	+	+	NT
	P-BU2	++	++	+	+
	P-BW	++	++	++	+
	P-BX	++	++	++	+
	T-CD	+	+	+/-	-
	T-CF	+/-	-	-	NT
	T2-AF	++	++	+	+
	T2-BF	++	++	+	+/-
	T2-BR	++	+	-	-
	T2-BS	++	++	+/-	+/-
	T2-DE	++	++	+	-
	T2-ES	++	++	++	NT

++ - without damage
 + - weak damage (less that 20% leaf area)
 +/- - damage 20-50% leaf area
 - - hard damage (more that 50% leaf area)
 D – death
 NT – not tested



Resistance of transgenic rootstock plants to herbicide “Basta” in field (20 l/ha)

Culture	Clone	Response to spray
Apple	control	D
	P9	++
Pear	control	D
	P-BK	+
	P-BK2	+
	P-BU	+
	P-BU2	+
	P-BW	++
	P-BX	+
	T-CD	+
	T2-AF	+
	T2-BF	+
	T2-BR	+
	T2-BS	++
	T2-DE	+

++ - without damage
 + - weak damage (less that 20% leaf area)
 D – death



Nursery of herbicide resistant apple and pear rootstocks



**Pear clonal rootstock
GPN217**

**Apple clonal semidwarf
rootstock N545**

Insect-resistant transgenic plants

Most commonly used resistance genes:

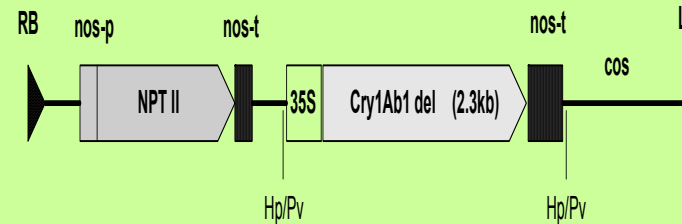
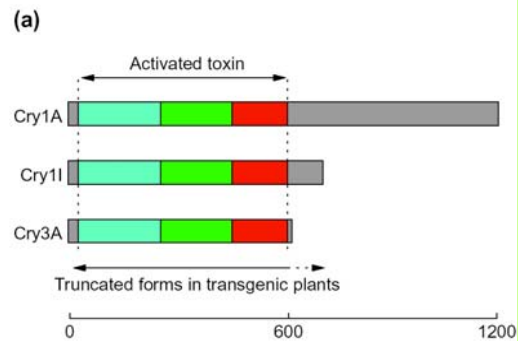
Bt-toxins

Proteinase inhibitors

A-amylase inhibitors

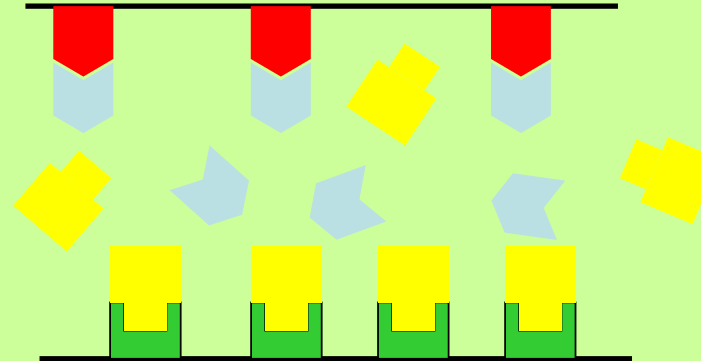
Lectins

Chitinases



pBTP 41

Жесткокрылые (Coleoptera)

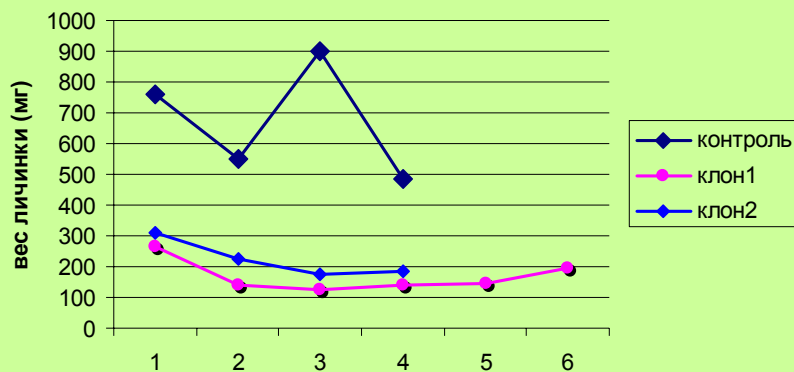


Чешуекрылые (Lepidoptera)

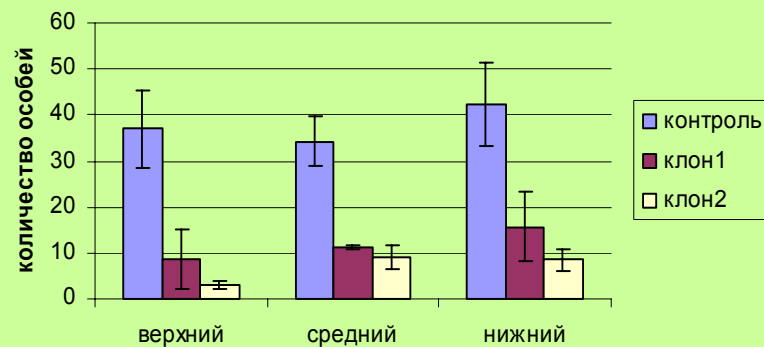


а) Схематичное изображение структуры типичного белка δ -эндотоксина *Bac.thuringiensis*(Cry белок)
 б) Трехдоменная структура активного токсина, Cry 1 Aa:
 I домен (голубой) встраивается в мембрану и образует поры;
 II домен(зеленый) и III домен (красный) гипервариабельный,
 участвуют в узнавании и связывании рецепторов. (Maagd R.1999).

Устойчивость хризантем сорта White Hurricane трансформированного CryIAb1 bt toxin геном под 35S промотором



Тест на устойчивость к *Spodoptera exigua*

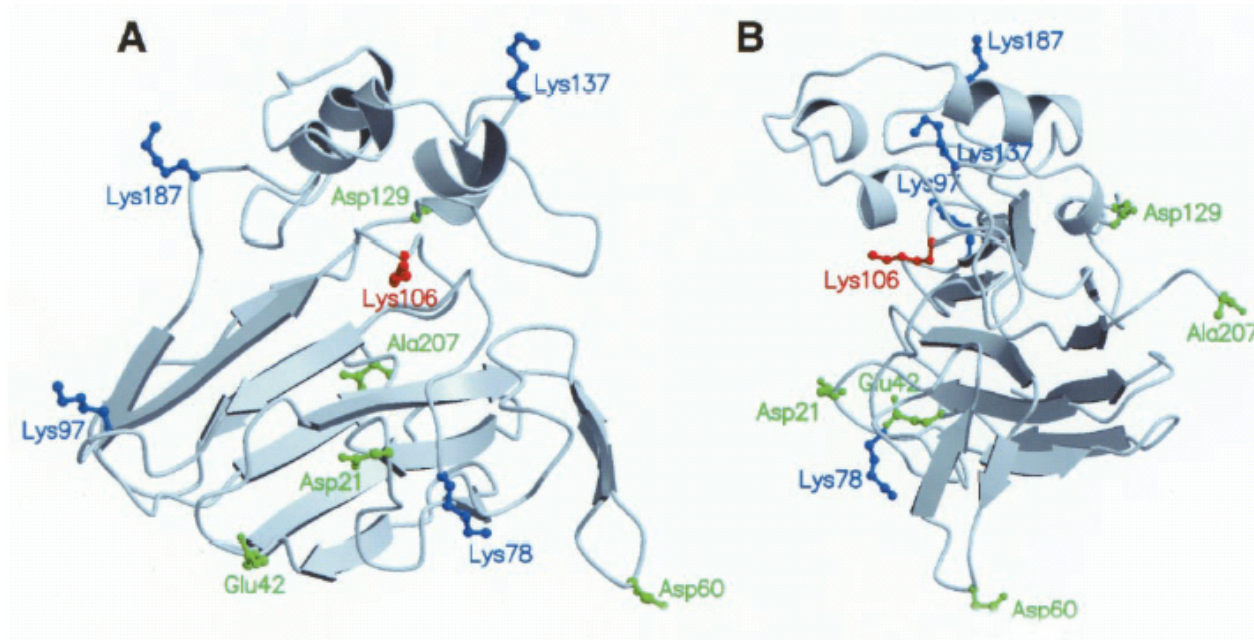
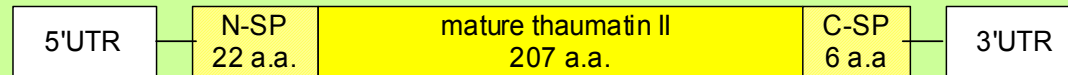


Тест на устойчивость к паутинному клещу (*Tetranychus urticae* Koch.)

**EXPRESSION LEVELS OF BT-TOXIN IN TRANGENIC PLANTS
TRANSFORMED BY DIFFERENT GENE CONSTRUCTS**

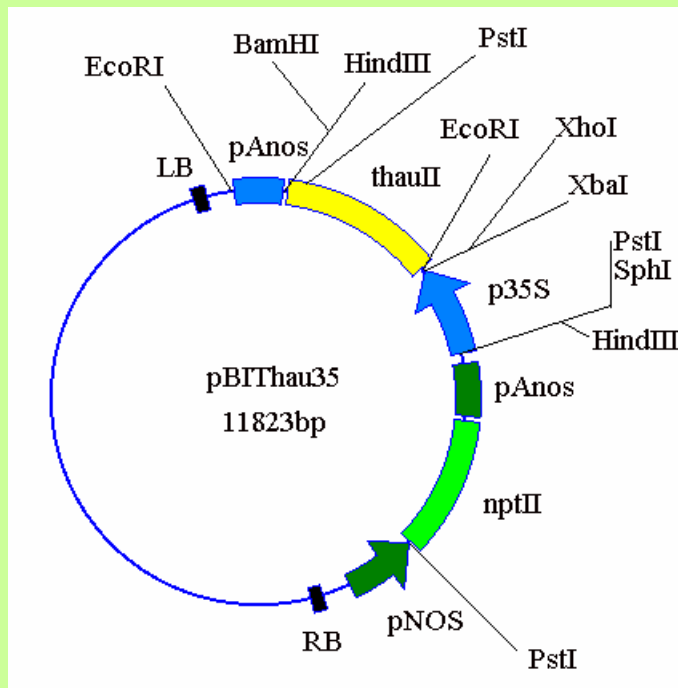
Transformation type	Gene construct	Expression level, % of total protein	Reference
Nuclear	Whole gene (~4 kb)	0 plants died	M.van Montagu (1987)
	Truncated active toxin (~2 kb)	~0.001-0.1, soluble	M.van Montagu (1987) F.Perlak (1990)
	Artificial, codon optimized active toxin (~2 kb)	~0.1-0.6, soluble	F.Perlak (1993), J. Wunn (1996), N.Strizhov (1996)
Chloroplast	Native active toxin (~2 kb)	~2-5, soluble	P.Maliga (1995)
	Bt-toxin operon (three genes)	~45, crystal formation	H.Daniell (1998) H.Daniell (2000)

Schematic representation of thaumatin II gene structure and three-dimensional structure of protein



Location of modified residues on three-dimensional structure of thaumatin. Schematic representation of the structure of thaumatin in two different orientations (front view and side view). α -Helices are represented by belts, and helical ribbons and strands of β -sheets by arrows. The side chains of amino acid residues modified in this study are colored as follows: phosphopyridoxylation and pyridoxylation of residues colored red reduced sweetness; phosphopyridoxylation of residues colored blue reduced sweetness; modification with PM of residues colored green did not affect sweetness. These residues are shown as ball-and-stick models and labeled as Lys, Asp, Glu or Ala with numbers showing their positions in the primary sequence. The diagram was drawn using data for thaumatin (Ko *et al.*, 1994) (PDB # 1THV) and the programs MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) and Raster 3D (Merritt and Murphy, 1994).

Introduction of thaumatin II protein into agricultural crops



Vector pBIThau35

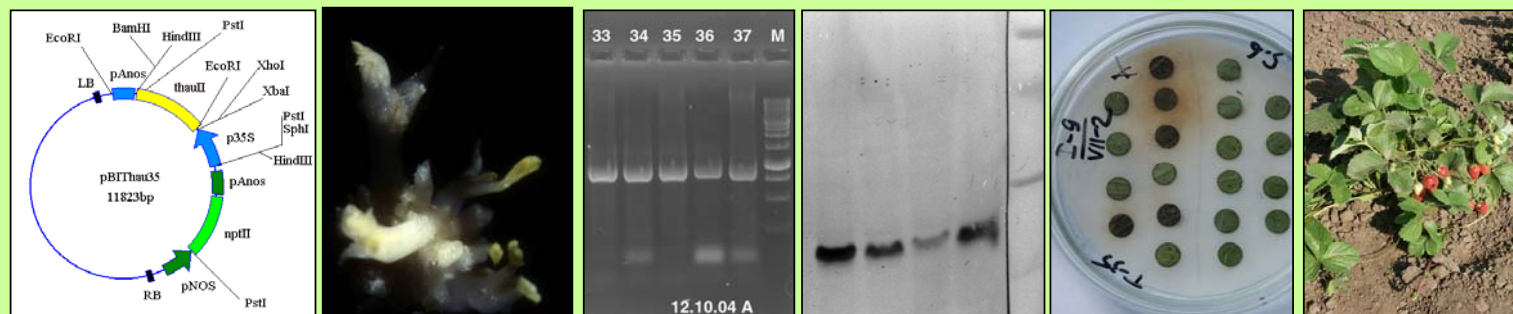
Plant	Variety	Lines	Collaborators
apple	Melba	2	
pear	Burakovka	4	
Strawberry	Feyerverk Selecta	19 13	
tomato	Yalf	22	ВНИИСБ
carrot	Nantskaya	123	ВНИИССОК
potato	Lugovskoy Nevskiy et al.		Bioengineering

Молекулярная селекция земляники садовой на повышение устойчивости к фитопатогенам и улучшение вкуса путем интродукции гена суперсладкого белка тауматина II.

Сводная таблица результатов генетической трансформации, молекулярно-биологических анализов, биотестов и полевых испытаний.

Исходный Генотип	Кол-во рег-тов	Кол-во транс-тов	Линии с целевым геном	Экспрессия белка	Соответствие исходному сорто типу	Повышенная устойчивость	Улучшенный вкус	Кол-во перспективных линий
Фейерверк	27	23	18	14	7	6	4	4
Selekta	15	15	14	14	12	2/5	5	5

Этапы получения трансгенных линий



Полевые испытания и органолептический анализ трансгенных линий сорта Seleкта с геном *thaumatin II*

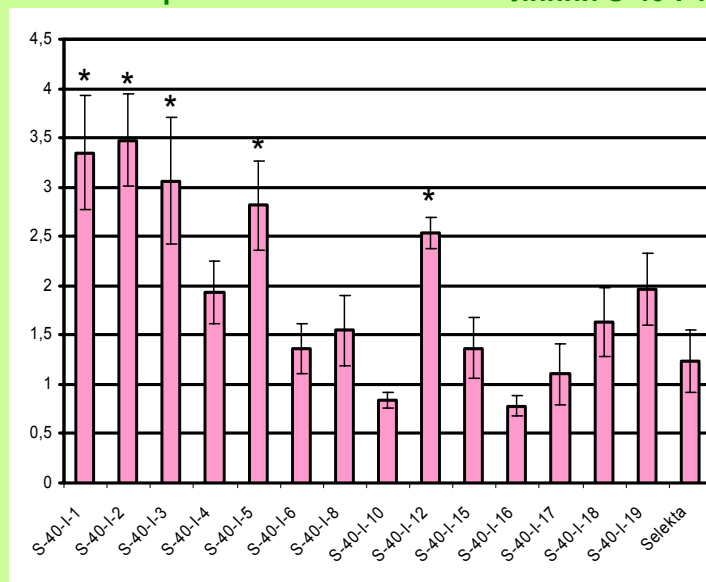
Ряд 1	Ряд 2	Ряд 3
S-40-I-1 S-40-I-1 S-40-I-1	S-40-I-15 S-40-I-15 S-40-I-15	S-40-I-6 S-40-I-6 S-40-I-6
S-40-I-2 S-40-I-2 S-40-I-2	S-40-I-16 S-40-I-16 S-40-I-16	S-40-I-8 S-40-I-8 S-40-I-8
S-40-I-3 S-40-I-3 S-40-I-3	S-40-I-17 S-40-I-17 S-40-I-17	S-40-I-10 S-40-I-10 S-40-I-10
S-40-I-4 S-40-I-4 S-40-I-4	S-40-I-18 S-40-I-18 S-40-I-18	S-40-I-12 S-40-I-12 S-40-I-12
S-40-I-5 S-40-I-5 S-40-I-5	S-40-I-19 S-40-I-19 S-40-I-19	S-40-I-14 S-40-I-14 S-40-I-14
S-40-I-6 S-40-I-6 S-40-I-6	Seleкта Seleкта Seleкта	S-40-I-15 S-40-I-15 S-40-I-15
S-40-I-8 S-40-I-8 S-40-I-8	S-40-I-1 S-40-I-1 S-40-I-1	S-40-I-16 S-40-I-16 S-40-I-16
S-40-I-10 S-40-I-10 S-40-I-10	S-40-I-2 S-40-I-2 S-40-I-2	S-40-I-17 S-40-I-17 S-40-I-17
S-40-I-12 S-40-I-12 S-40-I-12	S-40-I-3 S-40-I-3 S-40-I-3	S-40-I-18 S-40-I-18 S-40-I-18
S-40-I-14 S-40-I-14 S-40-I-14	S-40-I-4 S-40-I-4 S-40-I-4	S-40-I-19 S-40-I-19 S-40-I-19
F. Vesca F. Vesca F. vesca	S-40-I-5 S-40-I-5 S-40-I-5	Seleкта Seleкта Seleкта



Полигон испытаний
в г. Орле.



Спелые плоды трансгенной
линии S-40-I-1



Органолептический анализ плодов трансгенных растений сорта Seleкта с геном суперсладкого белка тауматин.

Поражаемость *Fusarium avenaceum* растений контрольных и трансгенных линий моркови ТЗ (семья 40-61)



**Признаки поражения
грибным патогеном**

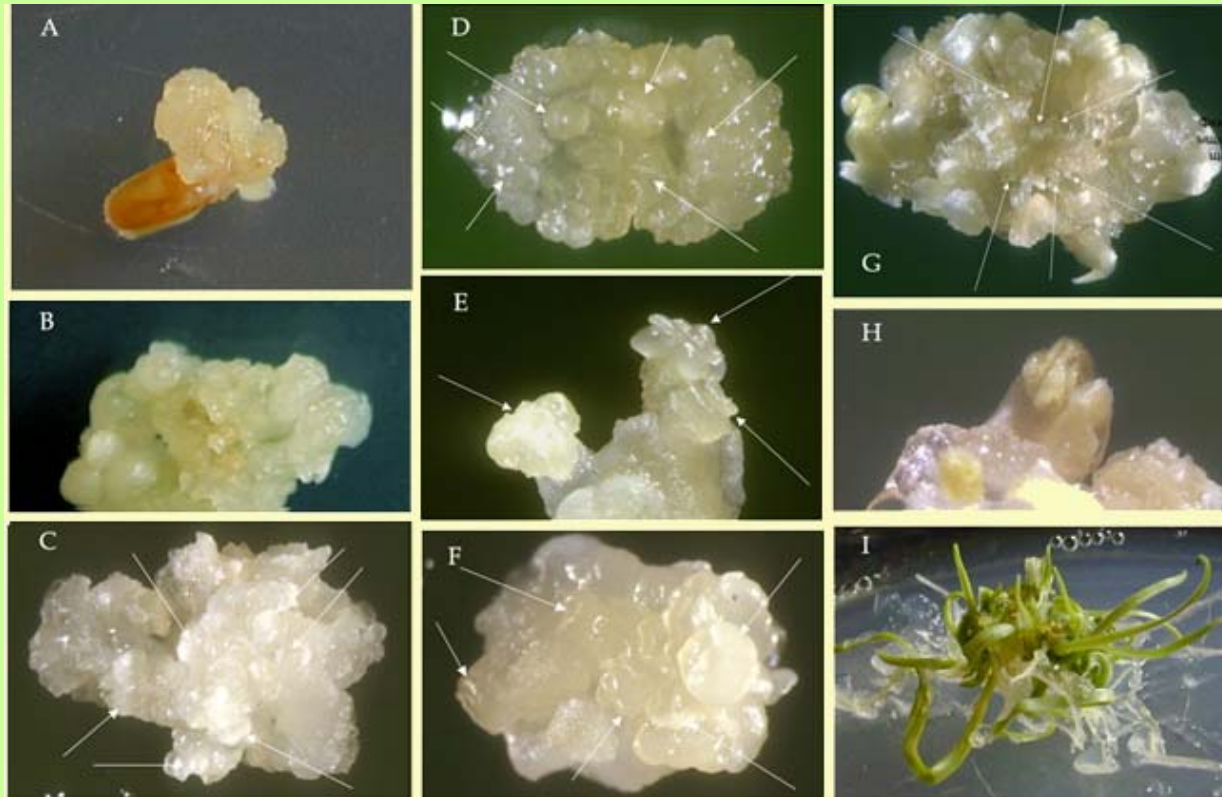
Линия 40-61

Контрольные растения

**Инфицированность листьев моркови *Fusarium avenaceum*
сравнение с полевым контролем**

№ сортообразца	Инфицированность, % от проанализированных растений	Разность с контролем %	Статистические критерии
К2(ВНИИССОК)	75.23	-	-
1	73.56	1.67	$\chi^2 = 0.02; P=0.876$
4	0.00	75.23	$\chi^2 = 58.09; P=0.000$
5	70.83	4.40	$\chi^2 = 0.20; P=0.653$
6	70.59	4.64	$\chi^2 = 0.37; P=0.546$
7	15.13	60.10	$\chi^2 = 19.54; P=0.000$
22	10.00	65.23	$\chi^2 = 17.21; P=0.000$
95	72.34	2.89	$\chi^2 = 0.05; P=0.819$
125	33.33	41.90	$\chi^2 = 18.35; P=0.000$

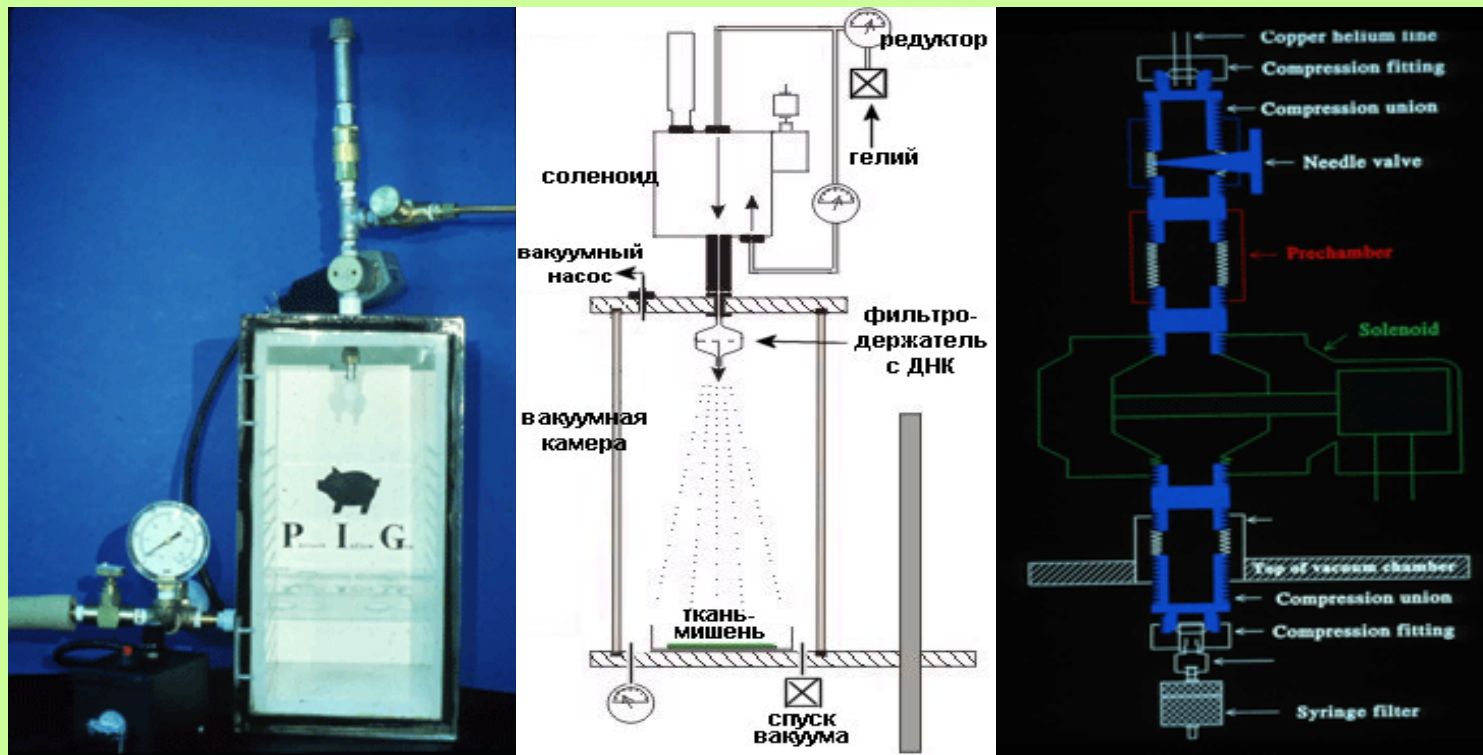
Индукция каллуса и соматический эмбриогенез в культуре ткани пшеницы



А.Индукция каллуса из зрелых семян. **В.** Индукция каллуса из незрелых соцветий. **С-Ф** Формирование соматических эмбрионов (показаны стрелками) from immature zygotic embryo cultured on medium supplemented with: **(С)** 2,4-D after 15 days of culture, **(D)** Dicamba after 12 days of culture, **(E)** CPA after 25 days of culture, **(F)** 2,4,5-T after 20 days of culture. **Г.** Длительно культивируемый каллус (2,5 мес) с признаками вторичного эмбриогенеза. **Н.** Развитие соматического эмбриона. **И.** Формирование растений из соматических эмбрионов через полтора месяца после инициации каллусогенеза

СИС. ГЕН.
ТРАНСФ.

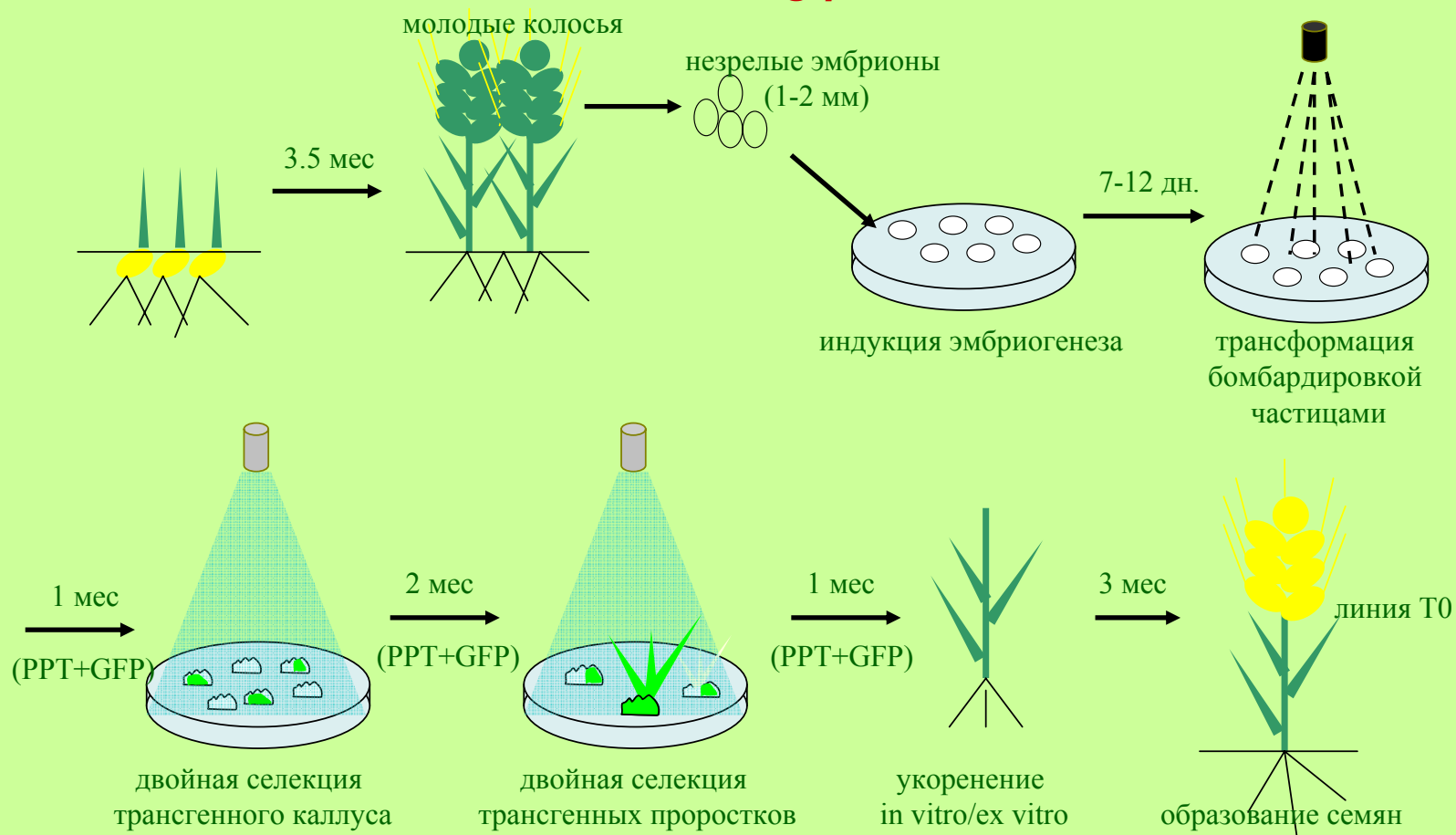
Общий вид и схема установки для биобаллистической доставки генов в клетки растений. Particle Inflow Gun, (John Finer, Philip Vain et al. 1992)



Сравнение свойств агробактериальной и биобаллистическая трансформации

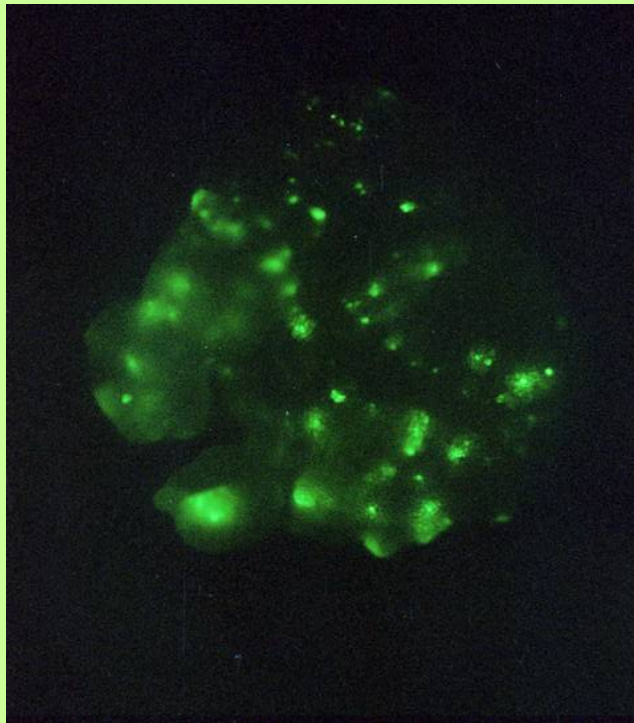
Агробактериальная трансформация		Биобаллистическая трансформация	
Плюсы	Минусы	Плюсы	Минусы
<p>Относительная дешевизна и изученность метода</p> <p>Более предсказуемые результаты внедрения трансгена в геном реципиента</p>	<p>Вид и генотип зависимость - невозможность применения для многих видов и генотипов</p> <p>Ограничения по количеству вводимых генов</p>	<p>Пригодна для любых объектов <i>in vitro</i> (хвойные, злаки, бобовые).</p> <p>Универсальная доставка ДНК в любую ткань и орган.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Возможно использовать при прямой регенерации растений, минуя каллус. • Позволяет вводить одновременно несколько генов. • Не нуждается в сложных векторах. • возможно использовать для трансформации пластид 	<p>Относительная дороговизна метода</p> <p>Непредсказуемость интеграции и копийности вводимых генов</p>

Протокол трансформации пшеницы: сочетание селекции на фосфинотрицине (PPT) с визуальной селекцией по экспрессии гена *gfp*



Оптимизация условий трансформации пшеницы

Транзиентная экспрессия гена *gfp* в щитке незрелого зародыша пшеницы через 24 часа после обстрела частицами

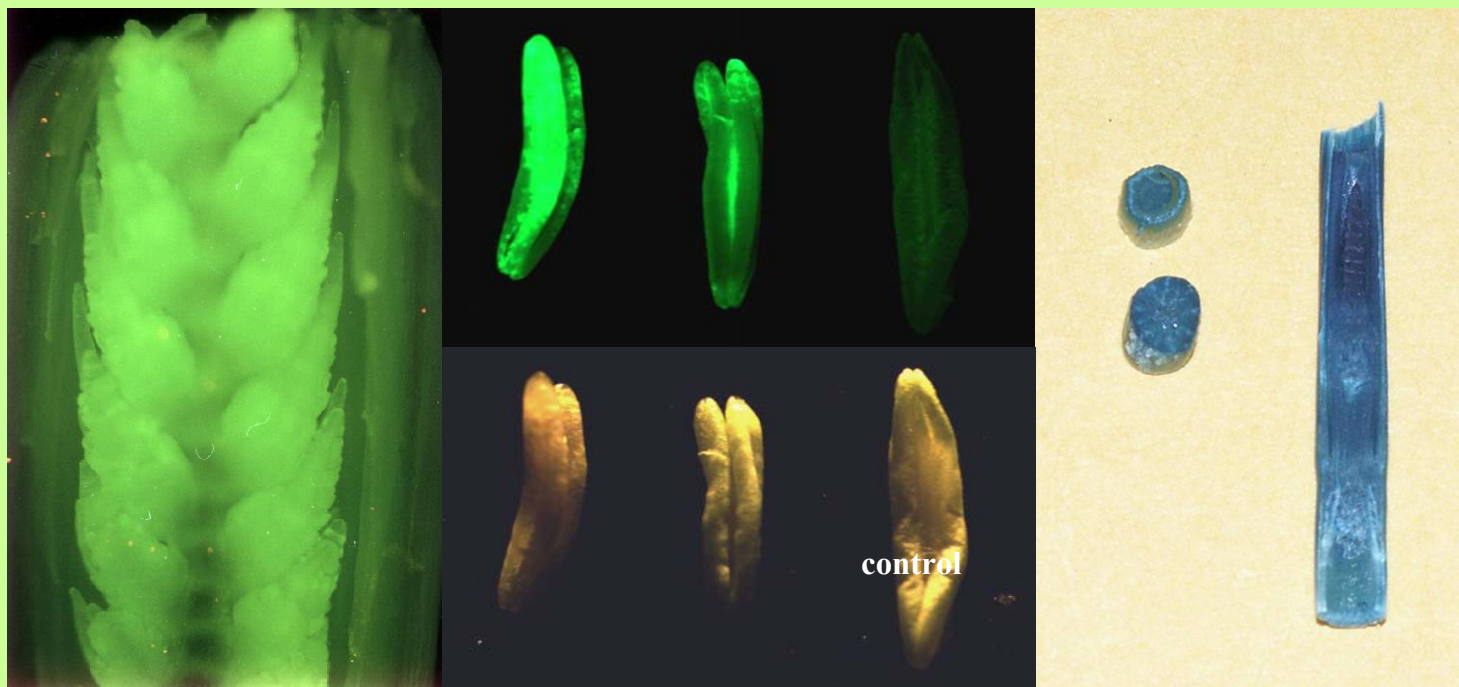


450-490 nm excitation filter
510-nm FT dichromatic mirror
515-565-nm barrier filter

1. Влияние давления гелия
2. Размер частиц
3. Тип частиц (вольфрамовые, золотые)
4. Сила выстрела
5. Дистанция выстрела
6. Периметр обстрела
7. Время культивирования эксплантов
8. Тип осмотической предобработки эксплантов
9. Тип экспланта
10. Ген репортерный маркер (GUS, GFP)

**Экспрессия *gfp*-гена в трансгенных линиях пшеницы T₀ ,
полученных в результате трансформации вектором
psGFPBAR/pAct1-F**

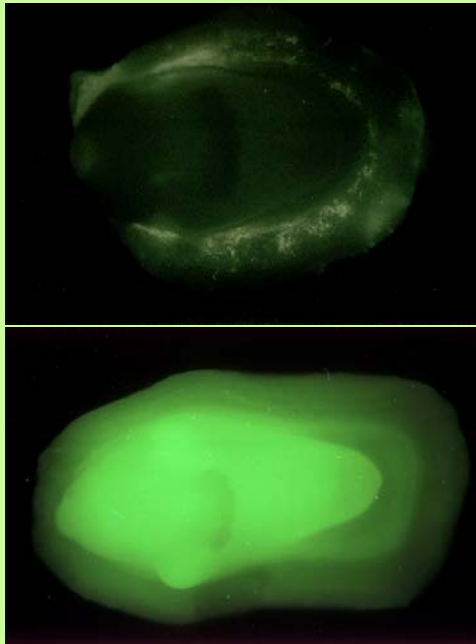
Слева- экспрессия *gfp* гена в незрелом соцветии трансгенной пшеницы
в центре - экспрессия *gfp* гена в пыльниках
справа - экспрессия гена *uidA* в молодом стебле и зачатке колоса
пшеницы T₀



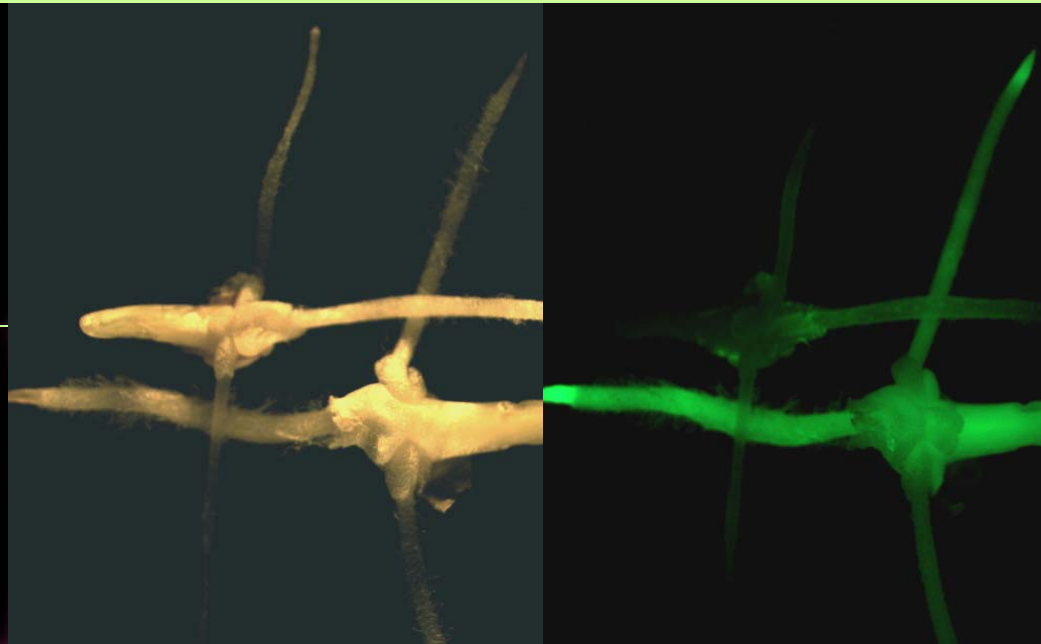
Отбор трансгенного потомства T_1 , полученного в результате самоопыления линий пшеницы T_0 , на основе экспрессии гена *gfp*

Незрелые зародыши помещались на питательную среду и анализировались с использованием флуоресцентного микроскопа

1 день



5 день



Устойчивость T1 поколения трансгенных линий пшеницы к гербициду Баста (2,5 % раствор)

Слева – поверхность листа смачивали гербицидом с помощью ватного тампона

Справа – растения опрыскивались гербицидом полностью

Степень повреждения оценивали через 10 дней после обработки



A18-34 A18-17 A20-12
Нетрансгенные
растения



A42-11
Нетрансгенное
растение

Схема проведения полевых испытаний на устойчивость трансгенных растений пшеницы к гербициду «Баста» (2004 г)

6	9	5	13
15	1	2	Н
2	13	10	7
4	A	14	1
Н	11	6	11
8	16	A	3
12	3	9	15
5	7	12	8
10	14	4	16
14	1	15	7
A	6	10	3
2	12	Н	16
8	16	6	2
Н	7	4	13
10	4	12	5
5	13	9	A
11	3	1	14
13	9	8	11

Исследовали гомозиготные растения T2/T3 поколения

Андрос

A-3 (две семьи T1)

A-18 (одна семья T1)

A-20 (пять семей T1)

A-34 (одна семья T1)

A-37 (четыре семьи T1)

A-46 (одна семья T1)

Норис

N-6 (одна семья T1)



**Полевые испытания на устойчивость трансгенных растений пшеницы к обработке гербицидом «Баста»
(июнь 2004 г)**



до обработки гербицидом



7 дней после обработки

Нокаут генов

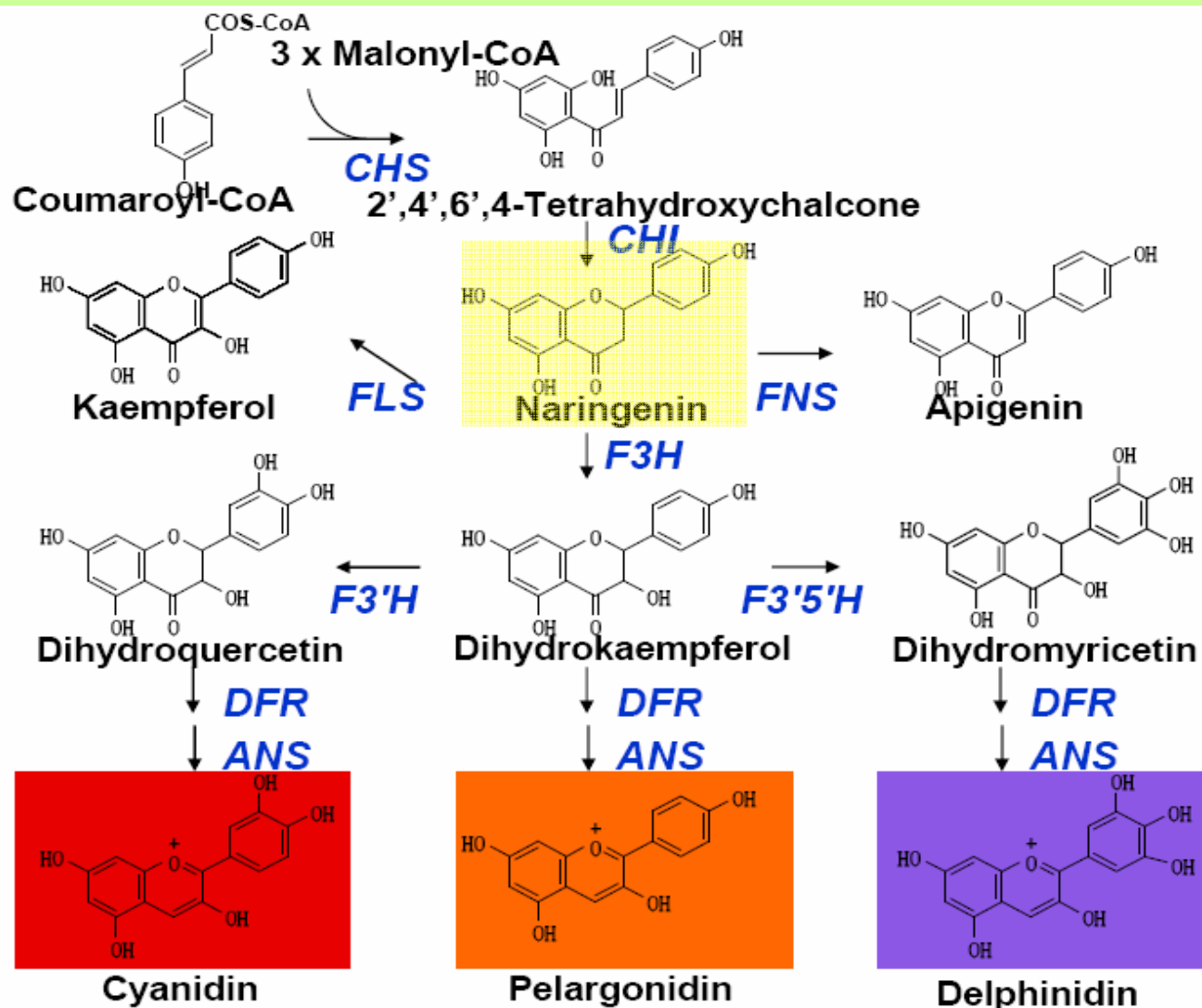
До транскрипции:

- ❑ Инсерционный мутагенез (бактерии)
- ❑ Мобильные элементы (млекопитающие)

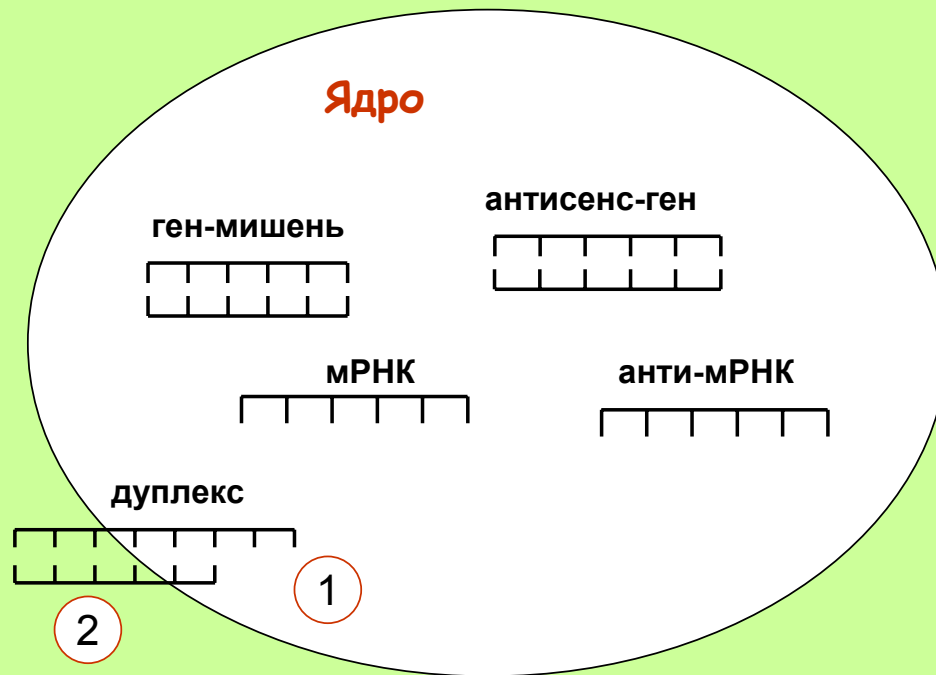
Посттранскрипционно (растения):

- ❑ Антисенс (антисмысловые копии)
- ❑ Косупрессия (смысловые копии)
- ❑ miРНК и siРНК

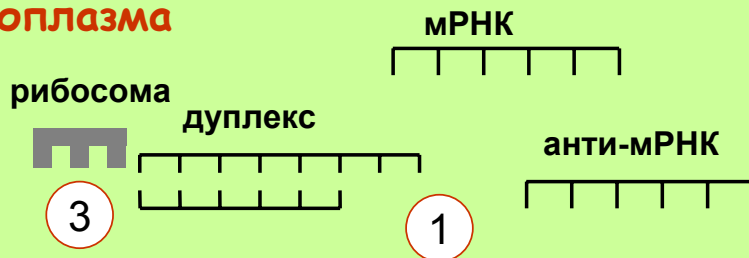
Схема синтеза пигментов



Пути воздействия антисмысловых копий



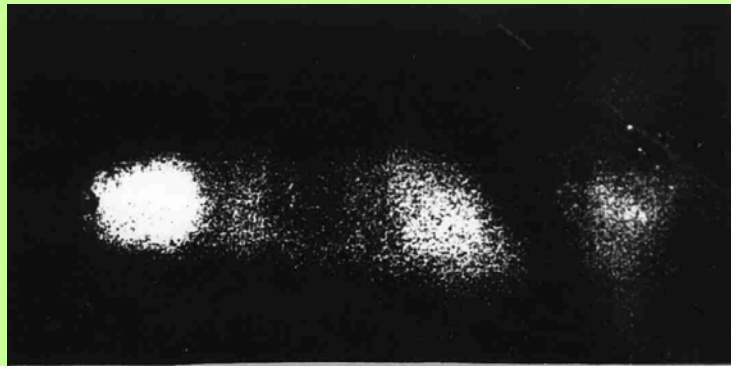
Цитоплазма



1-Деградация дуплекса

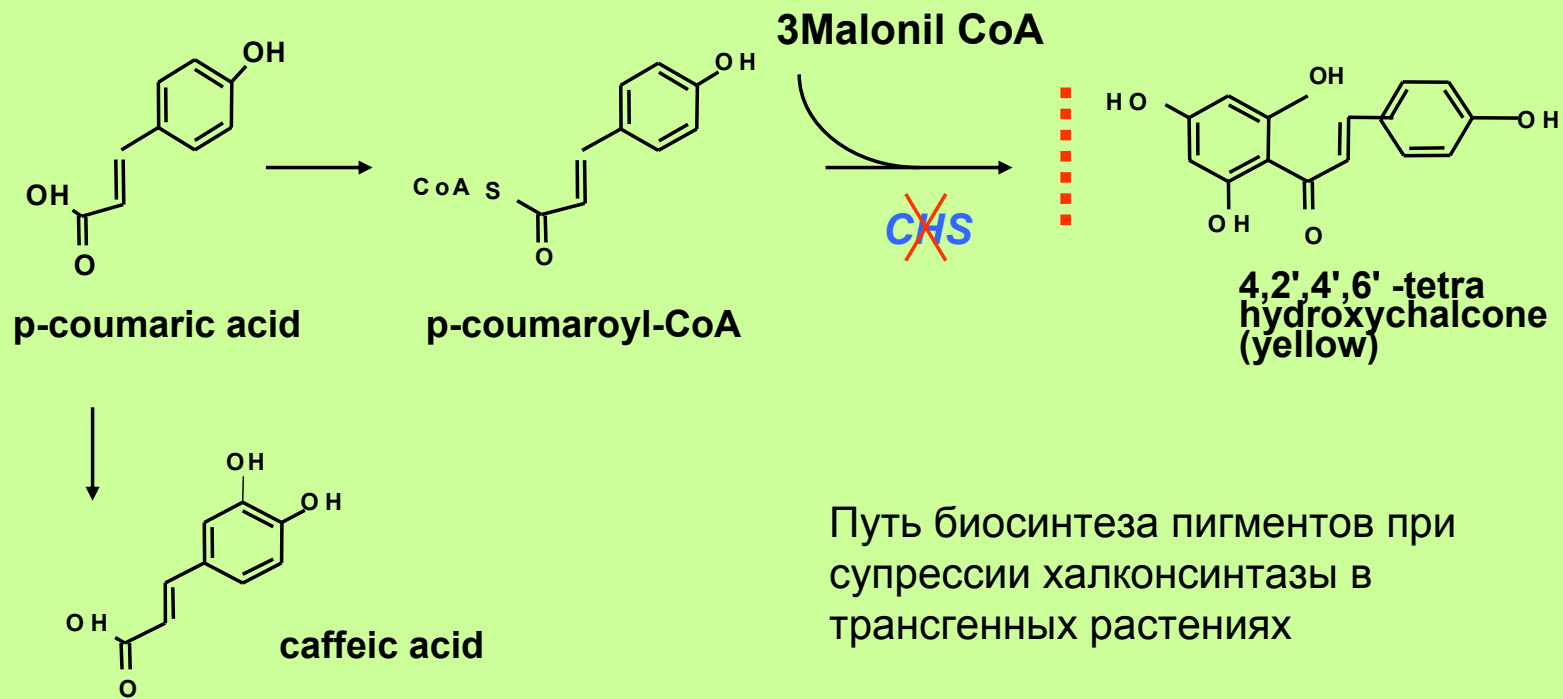
2-Блокирование транспорта в цитоплазму

3-Подавление инициации трансляции



Хроматографический анализ накопления в трансгенных растениях кофейной кислоты:

- 1 – кофейная кислота;
- 2 – нетрансгенное растение;
- 3 – растение клона 1;
- 4 – растение клона 2.



Путь биосинтеза пигментов при супрессии халконсинтазы в трансгенных растениях



контроль

клон 2

клон 1

Model of PTGS pathway

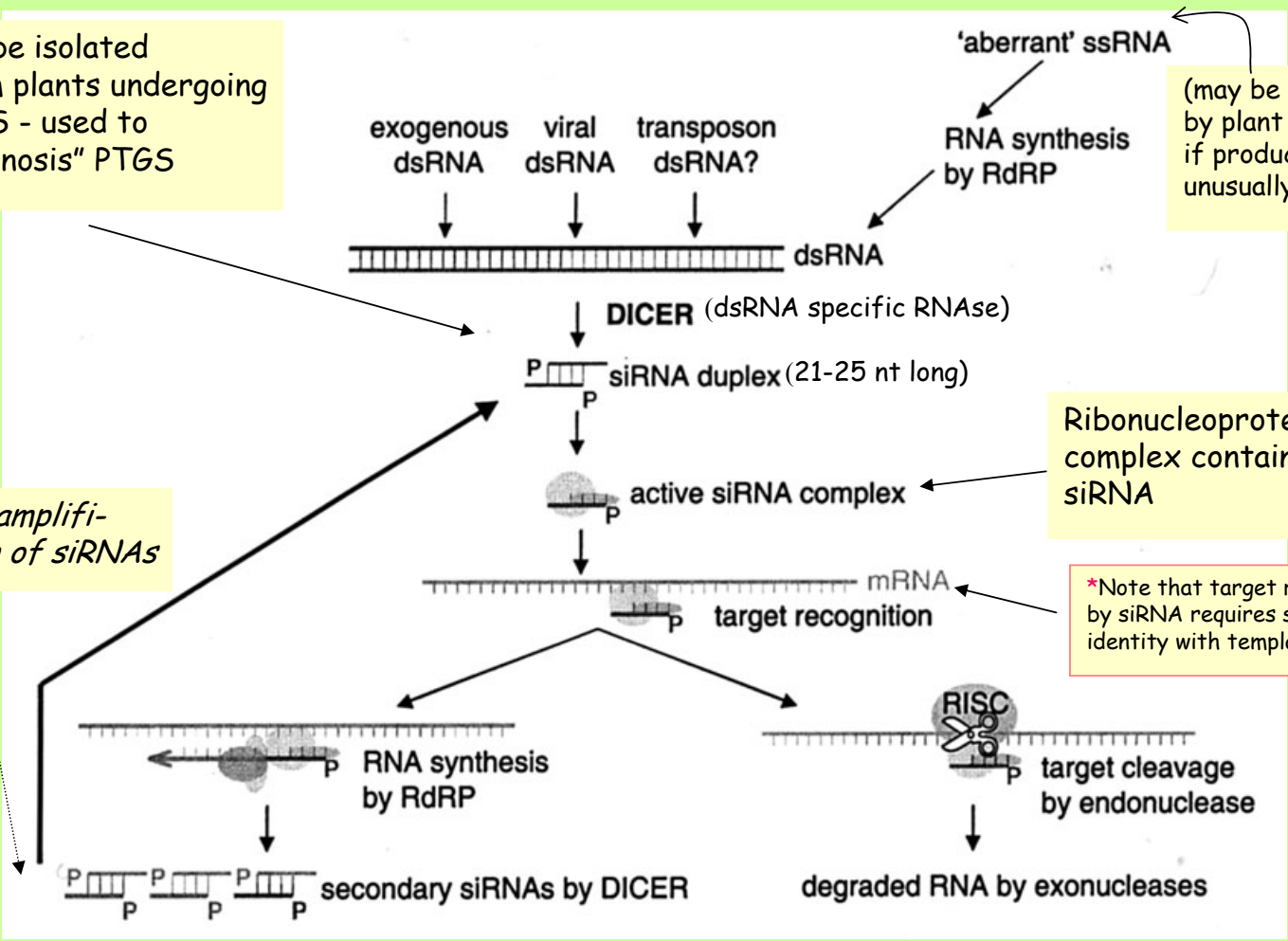
Can be isolated
From plants undergoing
PTGS - used to
"diagnosis" PTGS

(may be recognized
by plant as aberrant
if produced at
unusually high levels)

Note ampli-
fication of siRNAs

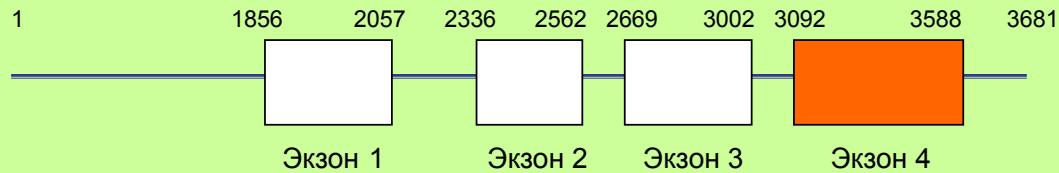
Ribonucleoprotein
complex containing
siRNA

*Note that target recognition
by siRNA requires sequence
identity with template

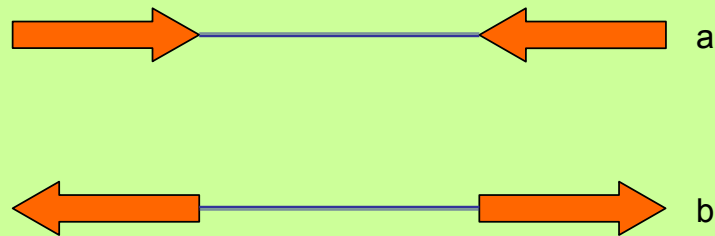


(modified from Plasterak, R.H.A. (2002) Science 296:1263-1265)

Структура гена LeACO томата и мишень для РНК-интерференции



Проектируемые шпилечные конструкции с последовательностями гена LeACO

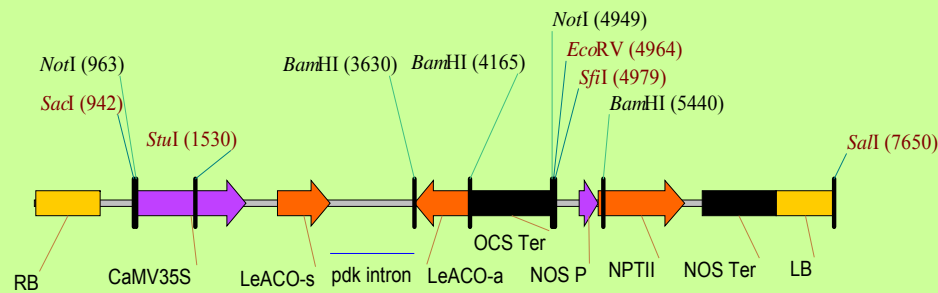


а) прямая и обратная последовательности гена LeACO с разделяющим их рdk интроном (850 пар оснований).

б) обратная и прямая последовательности гена LeACO с разделяющим их рdk интроном (850 пар оснований).

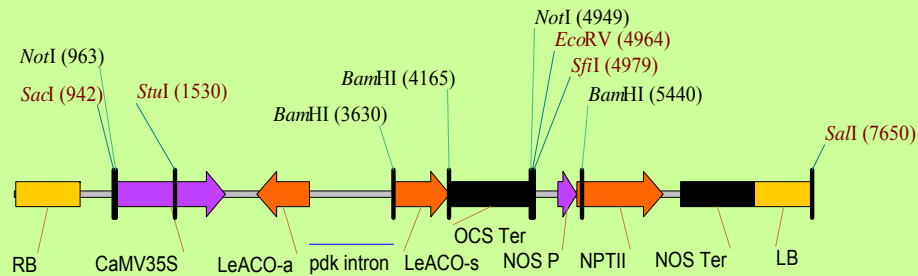
Структура Т-ДНК бинарных векторов pART с последовательностями гена LeACO

Краткая характеристика



pART-LeACO s-a T-DNA

7654 bp



pART-LeACO a-s T-DNA

7654 bp

Ген бактериальной устойчивости	Ген растительной устойчивости	Промотор и тип шпильки
--------------------------------------	-------------------------------------	------------------------------

Spec

npt II

CaMV35S

s-a

Spec

npt II

CaMV35S

a-s

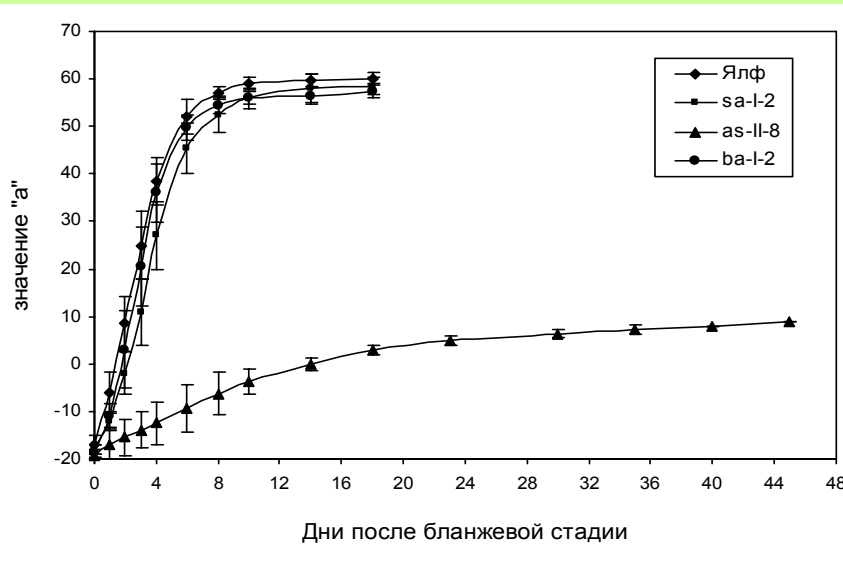
**Результаты трансформации томата
векторными конструкциями с
последовательностями гена LeACO1**

Штамм / вектор	Номер трансформации	Тип экспланта	Количество эксплантов	Количество линий, устойчивых к селективному агенту	ПЦР+		Эффективность трансформации
					<i>npt II</i>	<i>LeACO</i>	
CBE 21 / pARTLeAC Osa	sa-I	настоящие листья	160	20	20	20	12,5%
CBE 21 / pARTLeAC Osa	sa-II	семядоли	71	10	10	9	14,1%
CBE 21 / pARTLeAC Oas	as-II	семядоли	85	19	19	18	21,1%

Тепличный эксперимент



Изменение цвета плодов в процессе хранения



Точками показаны средние значения для 5 плодов каждой линии, доверительный интервал является стандартным отклонением



Плоды собраны на бланжевой стадии. А – плод контрольного растения (Ялф), Б – плод трансгенного растения линии AS.

Плодоношение контрольных и трансгенных растений томатов экспрессирующих инвертированные повторы гена LeACO



Контроль

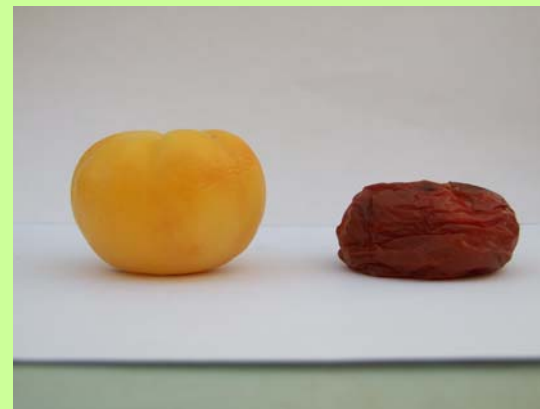
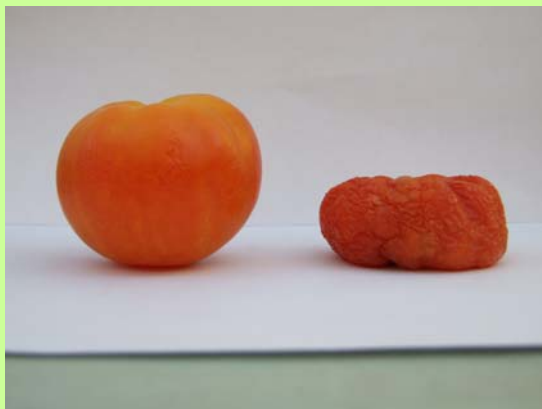


Трансген as-LeACO

ХРАНЕНИЕ ПЛОДОВ



Изменения качества плодов томатов в процессе хранения



Линия as II-13-4, 135 дней
Справа контроль



Линия as II-12-4, 140 дней
Справа контроль

Изменения качества плодов томатов в процессе хранения



Белки, экспрессируемые в трансгенных растениях:

- **человеческий сывороточный альбумин**
- **эритропоетин**
- **энкефалин**
- **человеческий интерферон**
- **колониестимулирующие факторы (гранулоцитов, макрофагов)**
- **соматотропин человека**
- **трипсиноген**
- **антитела**

Основные виды растений-биофабрик:

кукуруза, рис, пшеница, соя, томаты, картофель, турнепс, масличный рапс, люцерна, банан, табак, арабидопсис.

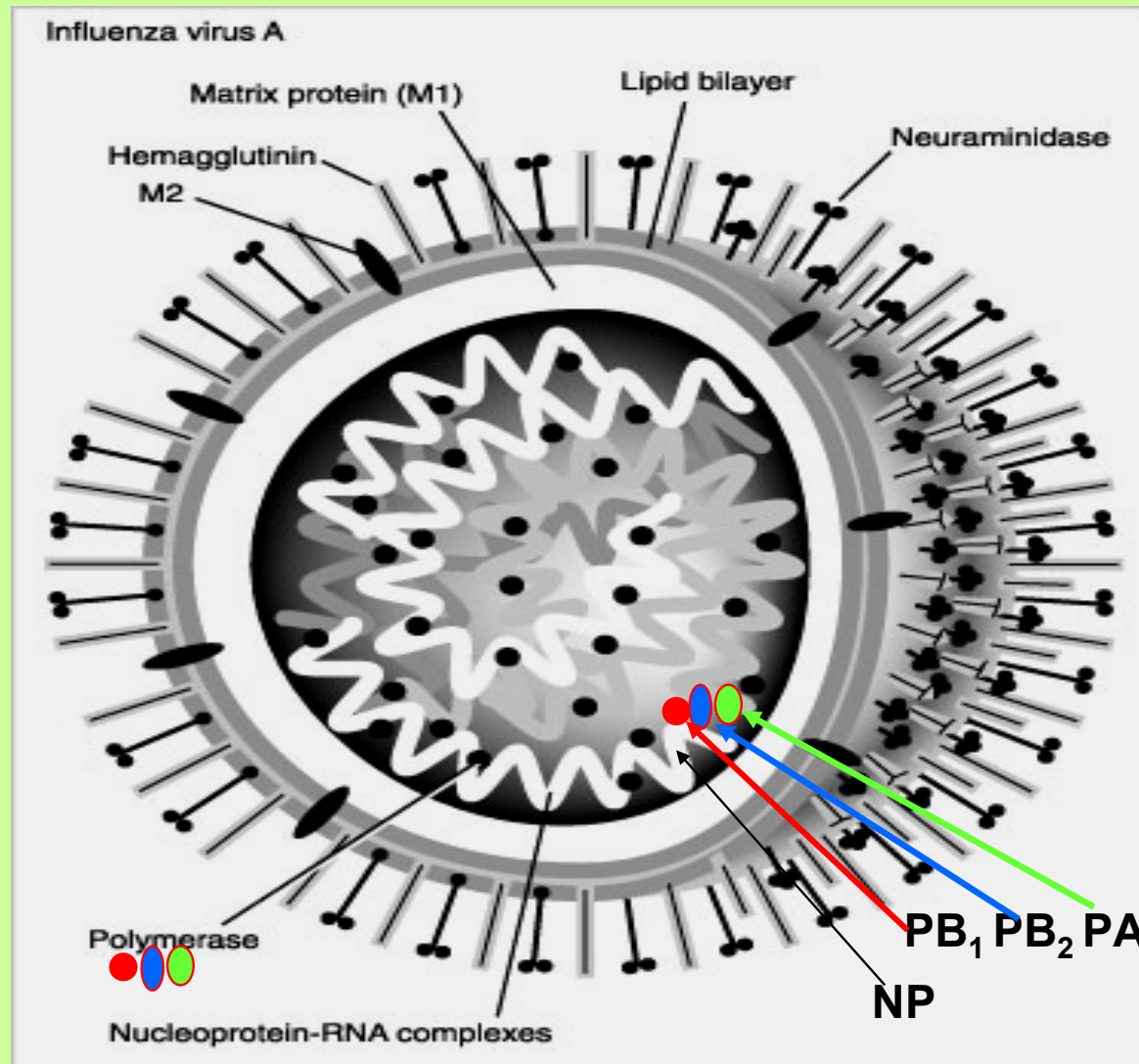
Преимущества использования растений как биофабрик:

- -дешевизна культивирования
- -безопасность фитопрепаратов (растения свободны от вирусов и др. патогенов человека и животных)
- -более эффективная экспрессия эукариотических белков в растительных
- системах по сравнению с бактериальными и грибными системами в силу отсутствия у последних всех необходимых стадий метаболизма и образования правильной третичной и четвертичной структуры белков

Требования к растениям-продуцентам рекомбинантных белков:

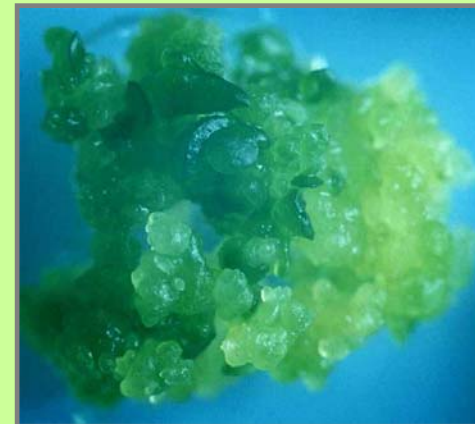
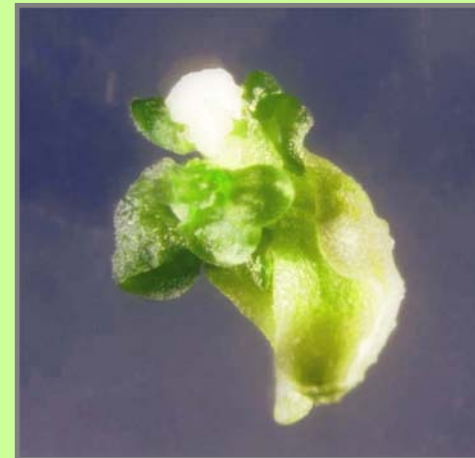
- Высокое содержание белка в биомассе:
- соя – 36-40% белка от сухого вещества в семядолях
- ряска – 35-45% белка от сухого вещества
- Достаточно высокий уровень экспрессии
- Возможность употребления в пищу (банан) или эффективная система очистки синтезированного белка
- Высокая урожайность
- Эффективная система регенерации и генетической трансформации

СТРУКТУРА ВИРИОНА ГРИППА А, сем. *ORTHOMYXOVIRIDAE*



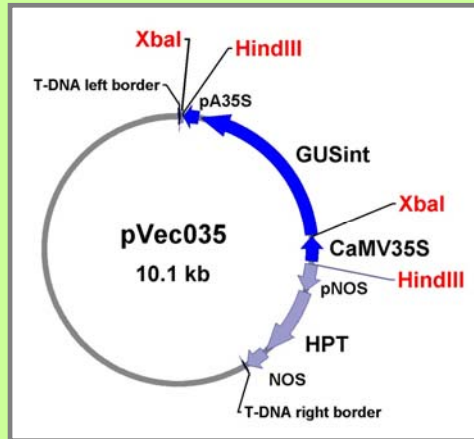
Regeneration of *L. minor* from callus culture

- Callus induction in meristematic zone
- Frond regeneration from embryogenic callus

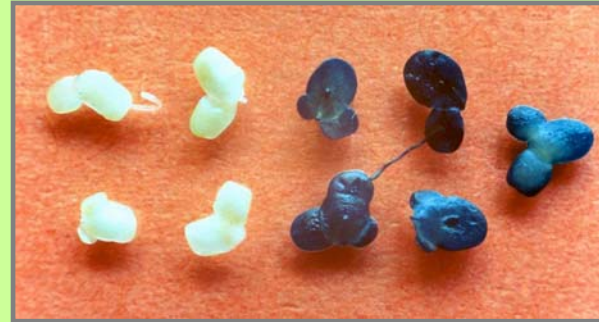


Transformation of *L. minor*

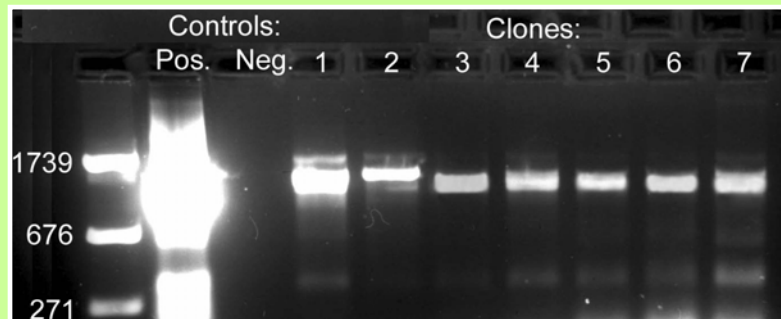
- *gus* gene encoding plasmid used for the transformation



- GUS-histochemical staining



- PCR-analysis of some transformed clones



- GUS-activity in two transgenic clones

