



Биотехнология растений



Handwritten signature



Трансгенные растения-2

- 1. Трансгенные растения и агропромышленный комплекс.**
 - а. Трансгенные растения, устойчивые к гербицидам**
 - б. Трансгенные растения, устойчивые к биотическим и абиотическим факторам среды**
 - с. Трансгенные растения с измененными свойствами плодов и семян**

Генетически трансформированные растения

<i>Arabidopsis</i>	<i>Земляника</i>	<i>Морковь</i>	<i>Рожь</i>
<i>Баклажан</i>	<i>Земляной орех</i>	<i>Овес</i>	<i>Сахарная свекла</i>
<i>Банан</i>	<i>Канола</i>	<i>Овсяница красная</i>	<i>Сахарный тростник</i>
<i>Батат</i>	<i>Капуста</i>	<i>Овсяница высокая</i>	<i>Солодка</i>
<i>Бобы</i>	<i>Картофель</i>	<i>Огурец</i>	<i>Сорго</i>
<i>Виноград</i>	<i>Киви</i>	<i>Орхидея</i>	<i>Соевые бобы</i>
<i>Гвоздика</i>	<i>Клюква</i>	<i>Папайя</i>	<i>Спаржа</i>
<i>Горох</i>	<i>Кукуруза</i>	<i>Петуния</i>	<i>Табак</i>
<i>Груша</i>	<i>Латук</i>	<i>Пион</i>	<i>Томат</i>
<i>Ежа сборная</i>	<i>Лен</i>	<i>Подорожник</i>	<i>Тополь</i>
<i>Ель европейская</i>	<i>Лилия</i>	<i>Подсолнечник</i>	<i>Хлопок</i>
<i>Ель канадская</i>	<i>Лотос</i>	<i>Пшеница</i>	<i>Яблоня</i>
<i>Жемчужное просо</i>	<i>Люцерна</i>	<i>Рис</i>	<i>Ячмень</i>

Семейства:

 <i>Актинидиевые</i>	 <i>Вьюнковые</i>	 <i>Лotosовые</i>	 <i>Пионовые</i>
 <i>Астровые</i>	 <i>Гвоздичные</i>	 <i>Льновые</i>	 <i>Подорожниковые</i>
 <i>Банановые</i>	 <i>Зонтичные</i>	 <i>Мальвовые</i>	 <i>Розоцветные</i>
 <i>Бобовые</i>	 <i>Ивовые</i>	 <i>Маревые</i>	 <i>Сосновые</i>
 <i>Вересковые</i>	 <i>Кариковые</i>	 <i>Мятликовые</i>	 <i>Спаржевые</i>
 <i>Виноградовые</i>	 <i>Крестоцветные</i>	 <i>Орхидные</i>	 <i>Тыквенные</i>
	 <i>Лилейные</i>	 <i>Пасленовые</i>	



Основные культуры
трансгенных растений
(посевы 2006 г.).



Основные признаки
трансгенных растений
(посевы 2006 г.)

Устойчивость к гербицидам

- модификация растительного фермента-мишени с потерей его чувствительности к гербициду
- индуцированное повышение синтеза фермента – использование сильного промотора
- введение в геном гена, продукт которого деградирует гербицид в растении. Например, ген *tfdA* кодирует 2,4Д-монооксигеназу, которая разрушает 2,4Д на дихлорфенол и глиоксилат.



Уолтер Гилберт

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

Трансгенные, растения устойчивые к гербицидам



*Минимально допустимая
норма в растениях 0,3 мг/кг,
в воде – 0,02 мг/л*

*Гербицид РАУНДАП, разработанный на
фирме «Монсанто» в 1970 году.*

*Действующее вещество – глифосат
(N-фосфометилглицин)*



Раундап, животные и человек

<i>Вид</i>	<i>Показатель токсичности</i>
<i>Токсичность для животных</i>	
<i>Кролики</i>	<i>LD₅₀ более 5000 мг/кг</i>
<i>Утка-кряква</i>	<i>LD₅₀ 5700 мг/кг</i>
<i>Козы</i>	<i>LD₅₀ более 4640 ррт в корме (при скармливании в течение 8 суток)</i>
<i>Токсичность для насекомых</i>	
<i>Медоносная пчела</i>	<i>LD₅₀ - 100 мкг/особь</i>

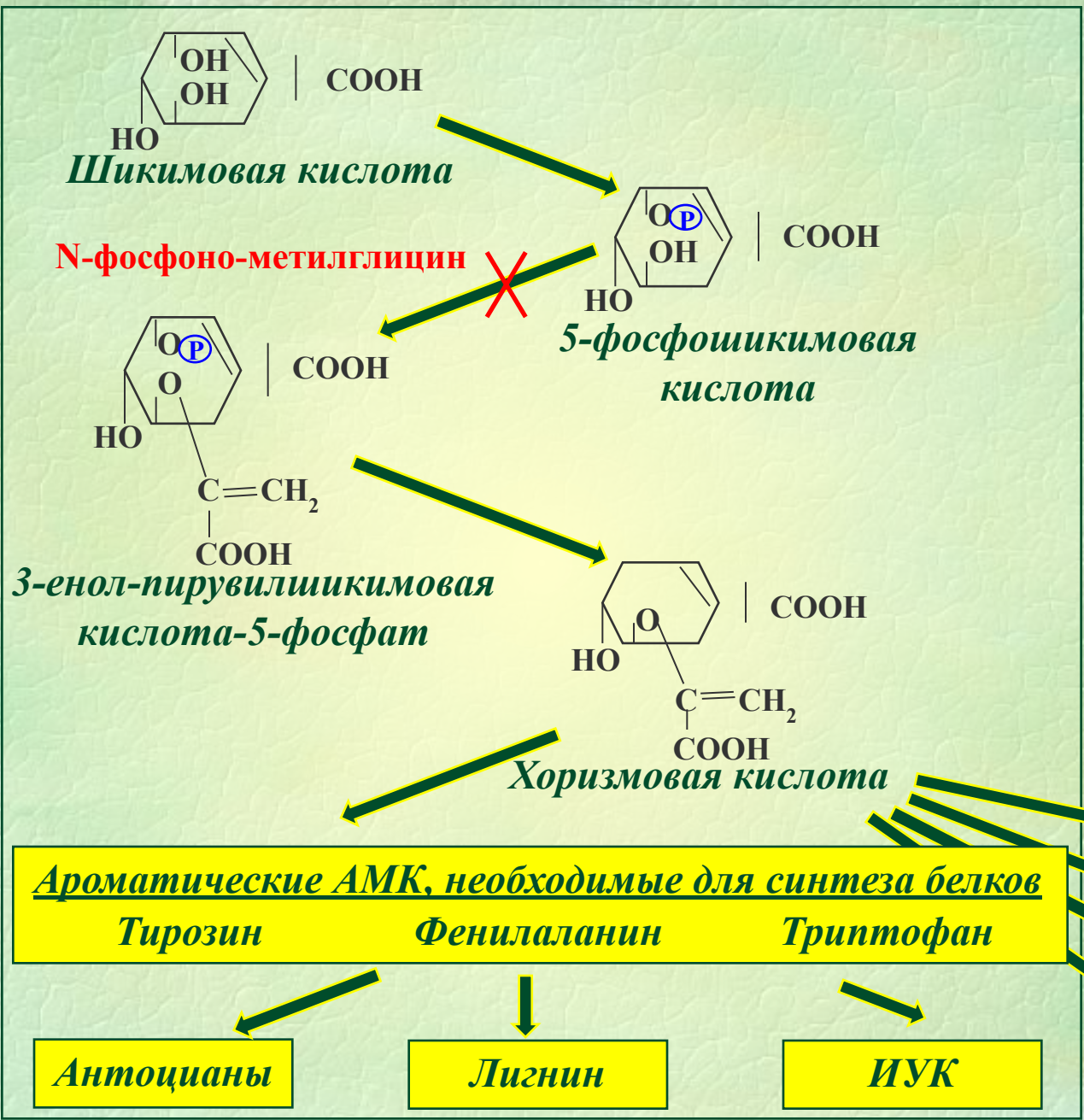


Действие раундапа на водную биоту



<i>Вид</i>	<i>Показатель токсичности</i>
<i>Токсичность для водных организмов</i>	
<i>Радужная форель</i>	<i>LC₅₀ 11 мг/л</i>
<i>Зеркальный карп</i>	<i>LC₅₀ 19,7 мг/л</i>
<i>Дафния магнум</i>	<i>LC₅₀ 5,3 мг/л (в стоячей воде)</i>
<i>Дафния магнум</i>	<i>LC₅₀ 37,0 мг/л (с аэрацией)</i>
<i>Одноклеточные водоросли Selenastrum capricornutum</i>	<i>LC₅₀ - 100 мкг/особь</i>

Действие раундапа на растение



Скорость воздействия раундапа на растение зависит от:

- ✓ Вида растения;
- ✓ Особенности его жизненного цикла и морфологии;
- ✓ Интенсивности обмена веществ и роста;
- ✓ Запаса ароматических АМК;
- ✓ Запаса финилпропаноидов

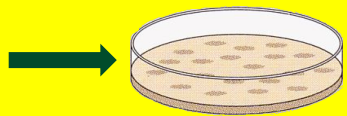
- Убихинон
- Пластохинон
- Витамины К и Е
- Фоливая кислота

I. Создание генетически модифицированных растений, устойчивых к раундапу

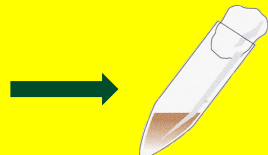
1. Скрининг бактерий на устойчивость к раундапу



Коллекция штаммов *A. tumefaciens*



Питательная среда с раундапом



Штамм CP4, устойчивый к раундапу

2. Поиск и клонирование гена CP4 EPSPS из штамма CP4 *A. tumefaciens*

3. Создание генно-инженерной конструкции – вектора, несущего ген CP4 EPSPS

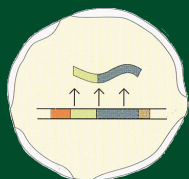


4. Трансформация растительных клеток

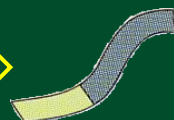
5. Регенерация растений из трансформированных клеток

II. Работа введенных генов в клетке растения

ядро



мРНК



CP4 EPSPS + СТР

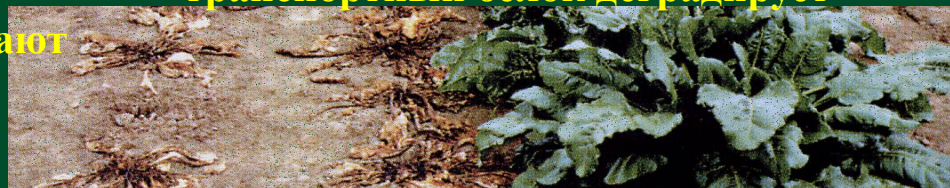


хлоропласт



CP4 EPSPS мигрирует в пластиды, где транспортный белок деградирует

При обработке поля раундапом погибают все растения, кроме генетически модифицированных





Fields trials for herbicide resistance of transgenic wheat lines upon treatment with 1.0% Basta



before the treatment



7 days after the treatment

Glyphosate-resistant weeds (1)



Glyphosate-resistant Johnsongrass in a soybean field

Больше дохода... Меньше пестицидов...

Чище окружающая среда

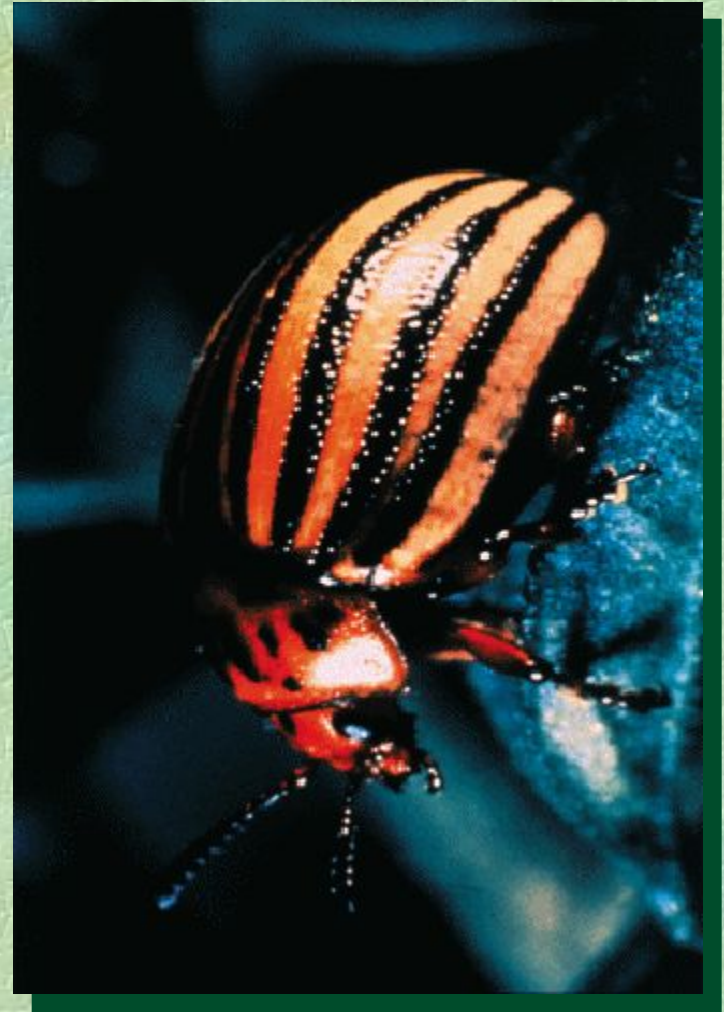
Недавняя статья Brookes and Barfoot (2005) суммирует общее воздействие, оказываемое «трансгенными» технологиями. Анализ показывает существенные экономические выгоды для фермеров (27 млрд.\$). Технология привела к уменьшению опрыскиванию пестицидами (на 378 млн фунтов) и уменьшению вреда, наносимого пестицидами, на 14%. «Трансгенная» технология также привела к значительному уменьшению количества парникового газа, производимого сельским хозяйством, что эквивалентно исчезновению с дорог почти 5 миллионов машин.

Brookes, G. and P. Barfoot. 2005. GM crops: The global economic and environmental impact—The first nine years 1996– 2004, *AgBioForum* 8:187–196.

Chassy, B, W. Parrott, R. Roush. 2005. CAST Commentary: *Crop Biotechnology and the Future of Food: A Scientific Assessment*

Трансгенные растения, устойчивые к насекомым

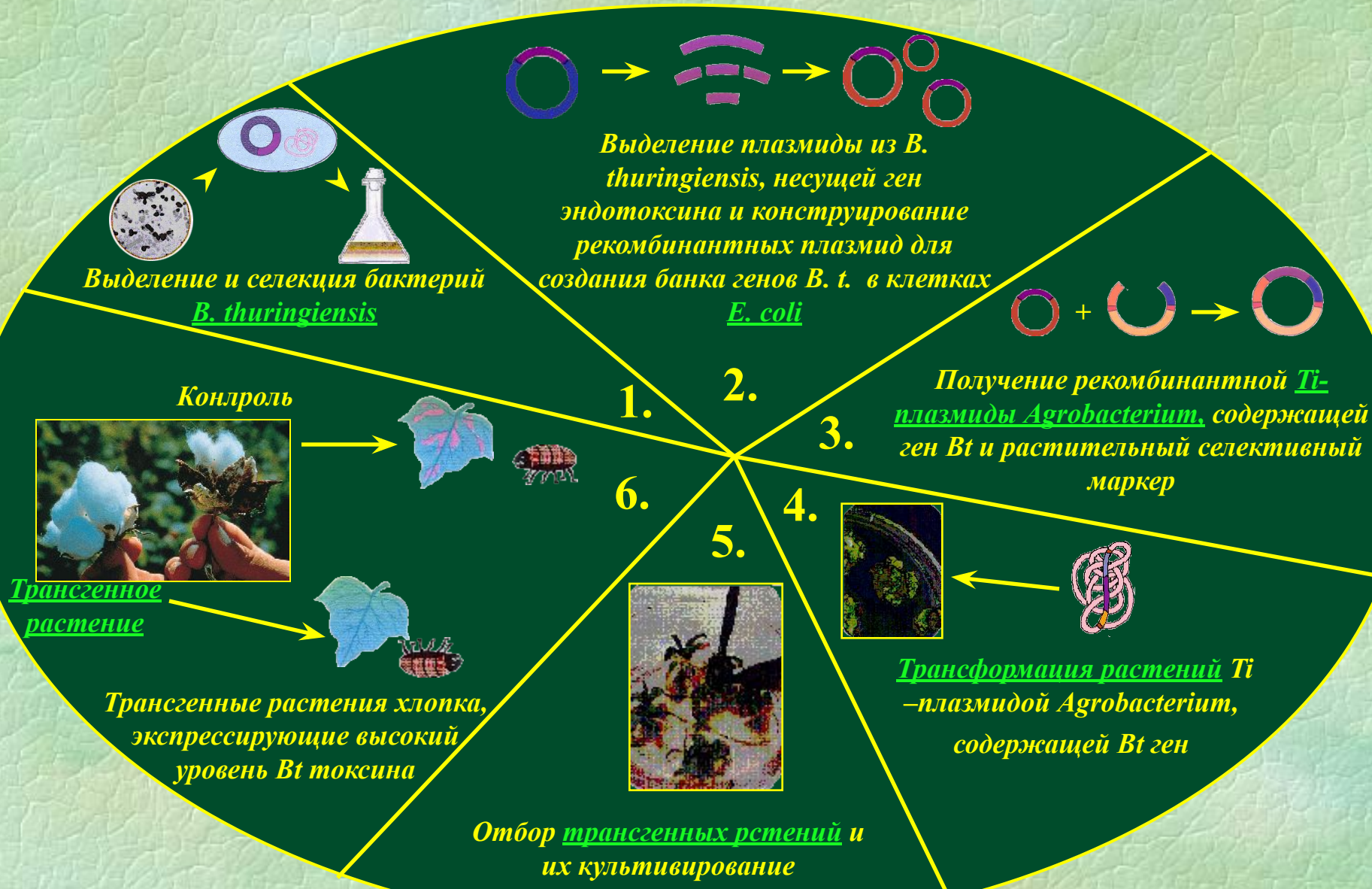
Структура Vt-токсина



*Гены, контролирующие синтез
Bt-токсина*

Обозначения Cry генов	Группа насекомых, на которых оказывается токсическое действие
CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c)	Чешуекрылые
CryIB, CryIC, CryID	Чешуекрылые
CryII	Чешуекрылые, двукрылые
CryIII	Жесткокрылые
CryIV	Двукрылые
CryV	Чешуекрылые, жесткокрылые

Схема трансформации растений геном Vt токсина Bacillus thuringiensis



Трансгенный картофель разрешен для выращивания и применения в пищу в США, Канаде, Мексике, Японии и Румынии. Два сорта картофеля New Leaf Plus («Ньюлиф») проходят испытания в России в соответствии с требованиями российских законов.



Трансгенный картофель, наблюдения за которым ведутся уже три года, стабильно дает урожаем на 50-90% выше контроля.



*Гибрид кукурузы с Vt
геном и гибрид,
восприимчивый к
кукурузному мотыльку
(Ostrinia nubilalis)*

*Кукурузный мотылек
(Ostrinia nubilalis)*







Трансформация хлоропластной ДНК – способ увеличения синтеза протоксина в растениях

Ген протоксина вводится непосредственно в хлоропластную ДНК растения-хозяина. Это дает следующие преимущества:

Во-первых, вводимый ген не нужно модифицировать, поскольку транскрипционный и трансляционный аппараты хлоропластов относятся *к прокариотическому типу*.

Во-вторых, на одну клетку приходится много хлоропластов, а на один хлоропласт - *много копий* хлоропластной ДНК, поэтому ген протоксина присутствует в большом числе копий, и *эффективность его экспрессии повышается*.

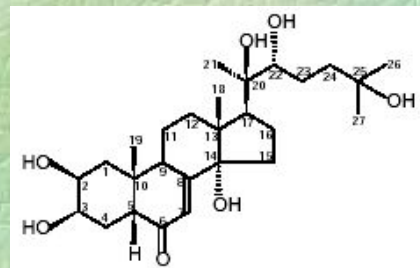
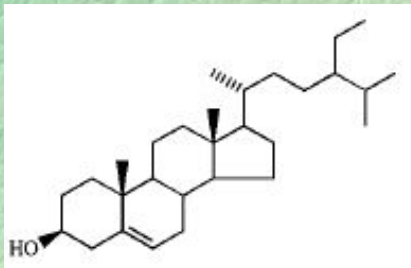
В-третьих, хлоропласты передаются только через яйцеклетку, а не через пыльцу, так что растения наследуют хлоропластную ДНК *по материнской линии* и нет никакого риска нежелательного переноса гена протоксина с пыльцой на другие растения).

Насекомые зависят от стероидов растений



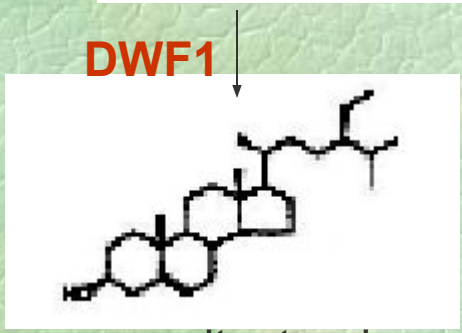
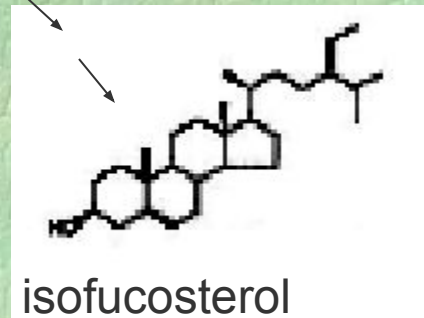
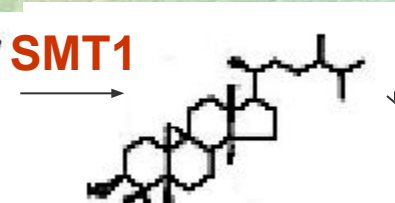
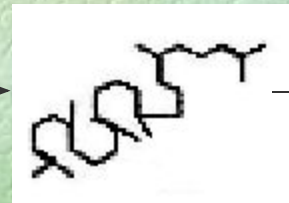
phytosterols

insect hormones



Трансгенные растения с генами биосинтеза стероидов

mevalonic acid



plant marker gene

anti-sense sterol gene

vector

transformation procedure

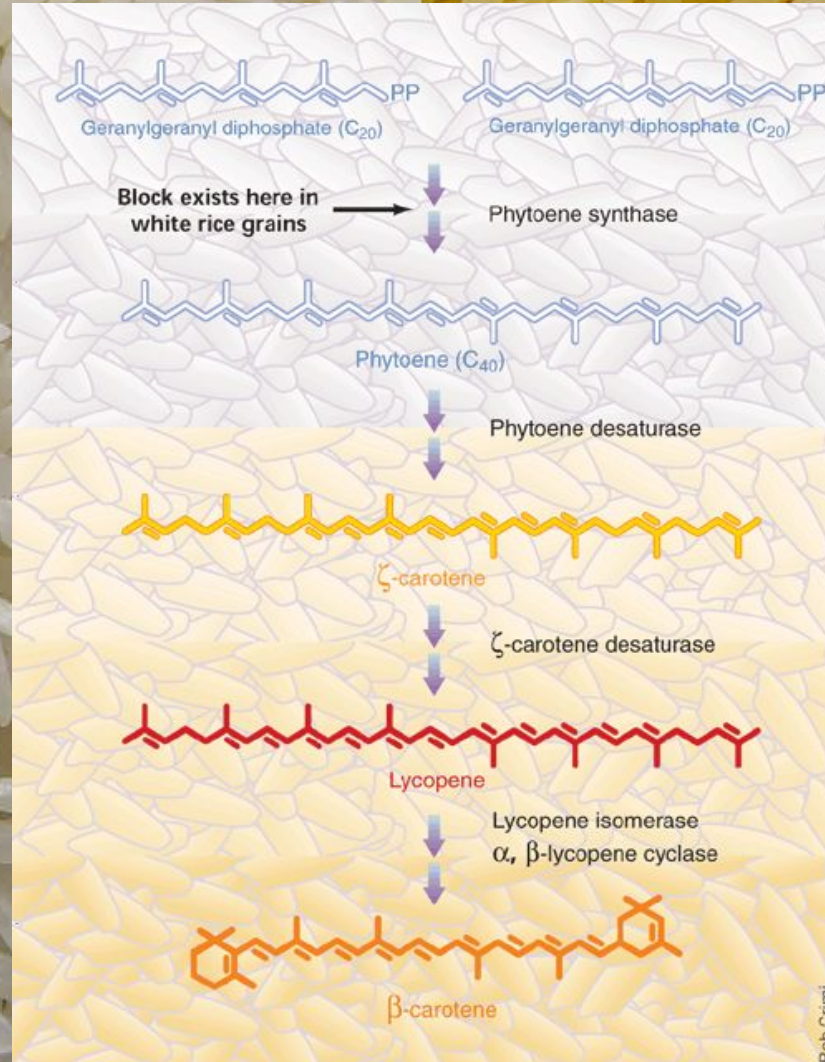


transgenic plants selection

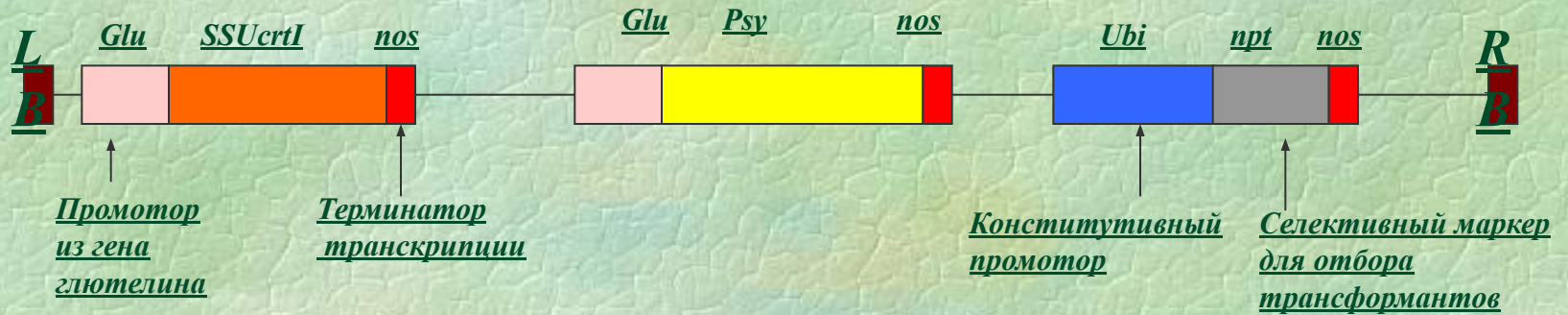
Трансгенные растения с измененными свойствами плодов и семян

1. *Изменение срока созревания плодов*
2. *Изменение состава жирных кислот в семенах масличных культур (безэруковые сорта рапса, ген из калифорнийского лавра – лауриновая к-та).*
3. *Улучшение вкуса плодов (димер монеллин слаще сахара, использован синтетический ген для трансформации).*
4. *Изменение цвета плодов (0-хиноны)*

Золотой рис – ГМ-рис, содержащий провитамин А



1. Использование тканеспецифичных промоторов.



Golden rice

геранилгераниолпироф
осфат

Фитоенсинтаза (Psy) из маиса

фито
ен

Фитоендесатураза (crtI) из Erwinia uredovora

ликоп
ен

Ликопен-β-циклаза из нарцисса

β-
кароти
н

Улучшение состава незаменимых аминокислот (лизин-триптофан-метионин-цистеин)

- Подходы – изменение регуляции биосинтеза аминокислот;
- введение новых генов запасных белков сбалансированных по аминокислотам
- (ген из амарантуса –AmA1; ген 2S – из бразильского ореха с высоким % метионина)

Биосинтез аминокислот, производных аспартата



AK - аспараткиназа;

DHDPS - синтаза дигидропиколиновой кислоты

Получение растений с измененным составом незаменимых аминокислот

Ti-плазмидный вектор



Обозначения:

Pv5' – промотор гена β -фазеолина бобов;

Pv3' – сигнал терминации транскрипции гена β -фазеолина бобов;

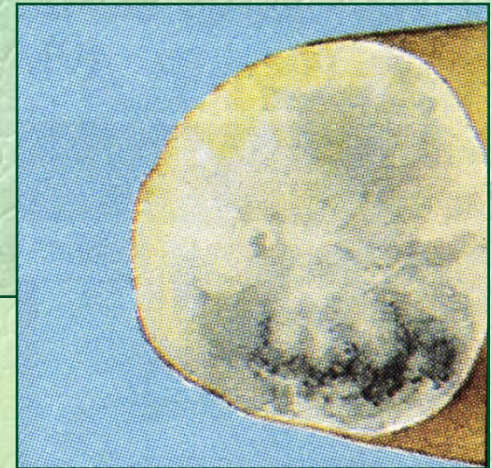
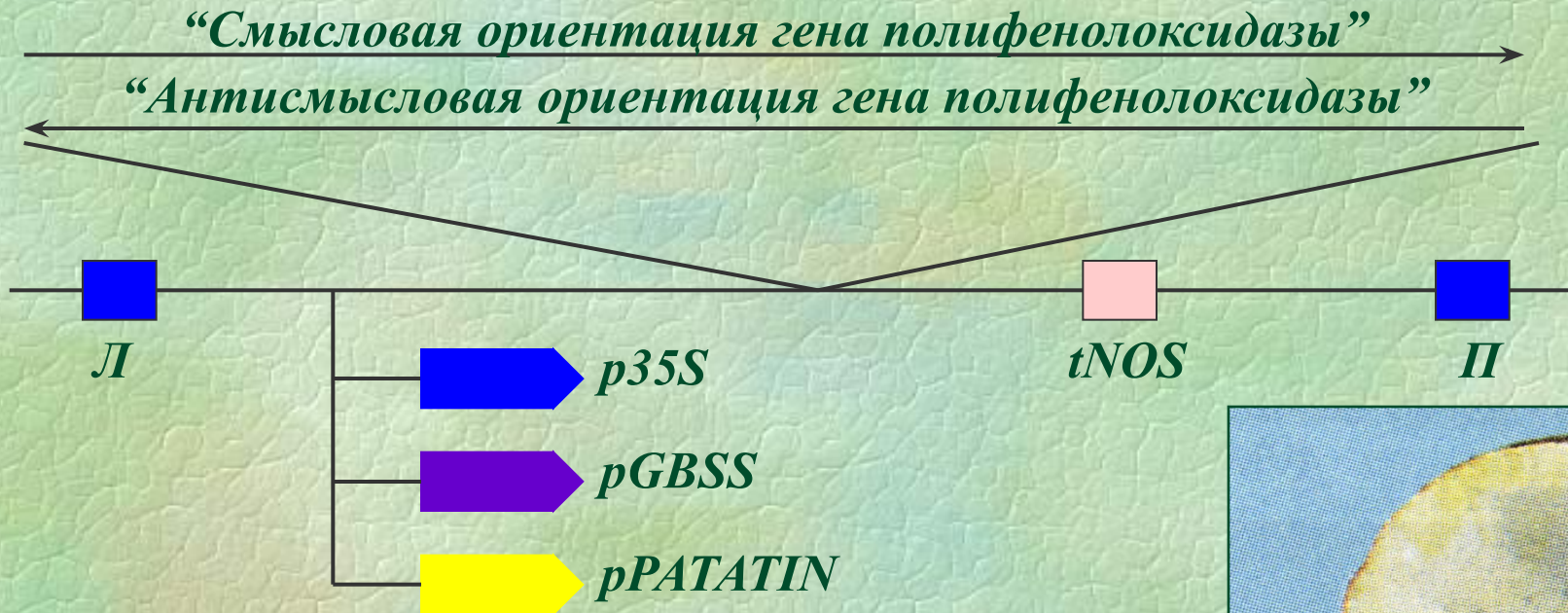
cts – последовательность, кодирующая сигнальный хлоропластный пептид малой субъединицы рибулозобифосфат-карбоксилазы;

dapA – ген *Corynebacterium*, кодирующий синтетазу дигидродипиколиновой кислоты, не чувствительной к лизину;

lysCM4 – мутантный ген *lysC* *E. coli*, кодирующий не чувствительную к лизину аспараткиназу;

Л и *П* – левая и правая фланкирующие последовательности T-ДНК

Трансгенные растения с измененным цветом плодов



Обозначения:

p35S – промотор вируса мозаики цветной капусты;

pGBSS – промотор гена синтетазы грануло связанного крахмала;

pPATATIN – промотор гена пататина I;

tNOS – сигнал терминации транскрипции гена нопалинсинтазы;

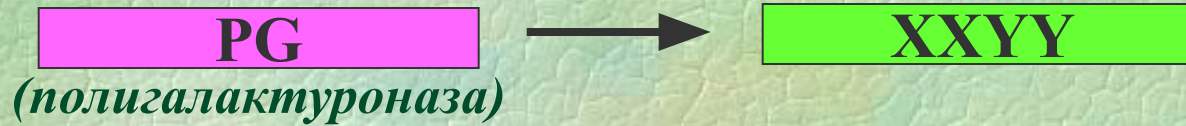
Л и П – левая и правая фланкирующие последовательности T-ДНК



Трансгенные растения с измененными
сроками созревания плодов

Конструирование векторных плазмид с генами в обратной (antisense) ориентации

1. Выделение генов

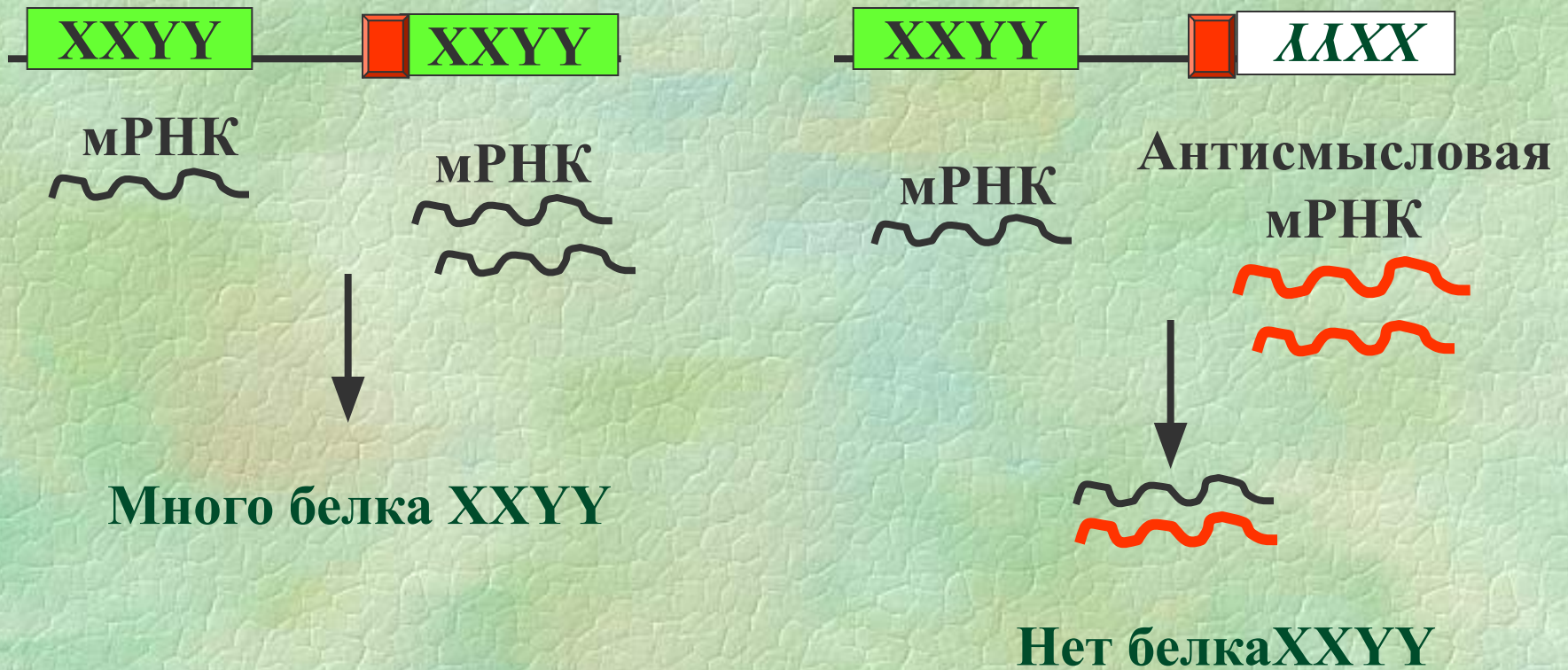


2. Ген в нормальной и/или антисмысловой ориентации включается под контролем 35S-промотора в состав вектора для трансформации

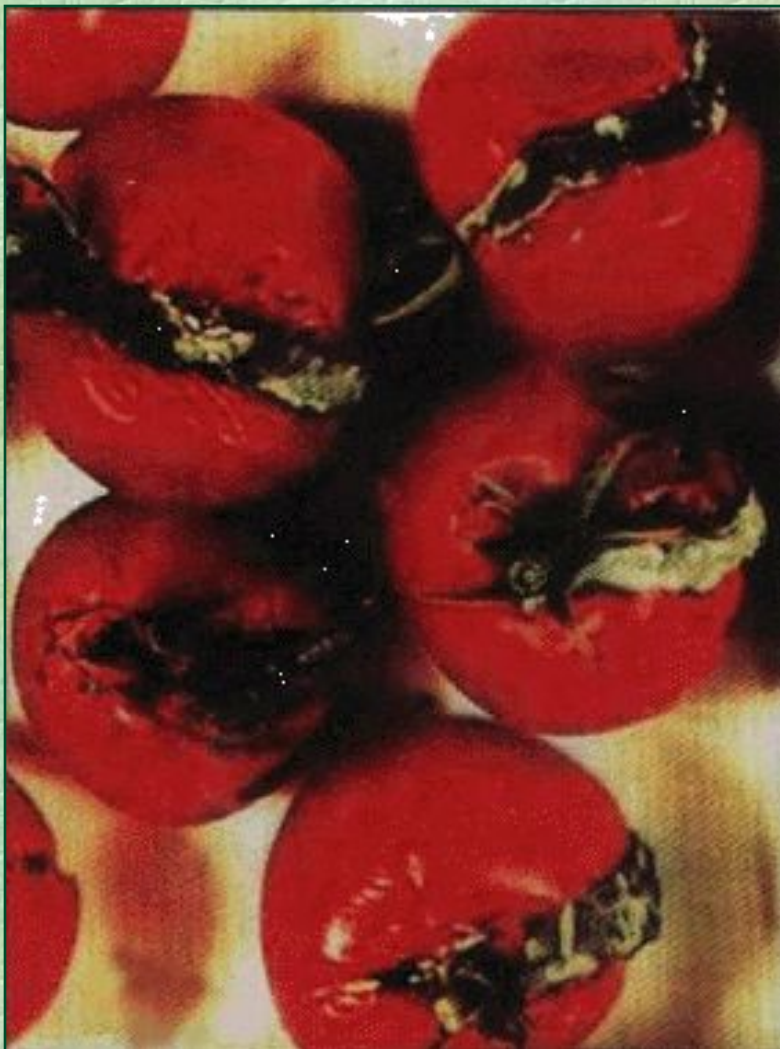


3. Передача генов растениям с помощью *Agrobacterium tumefaciens*

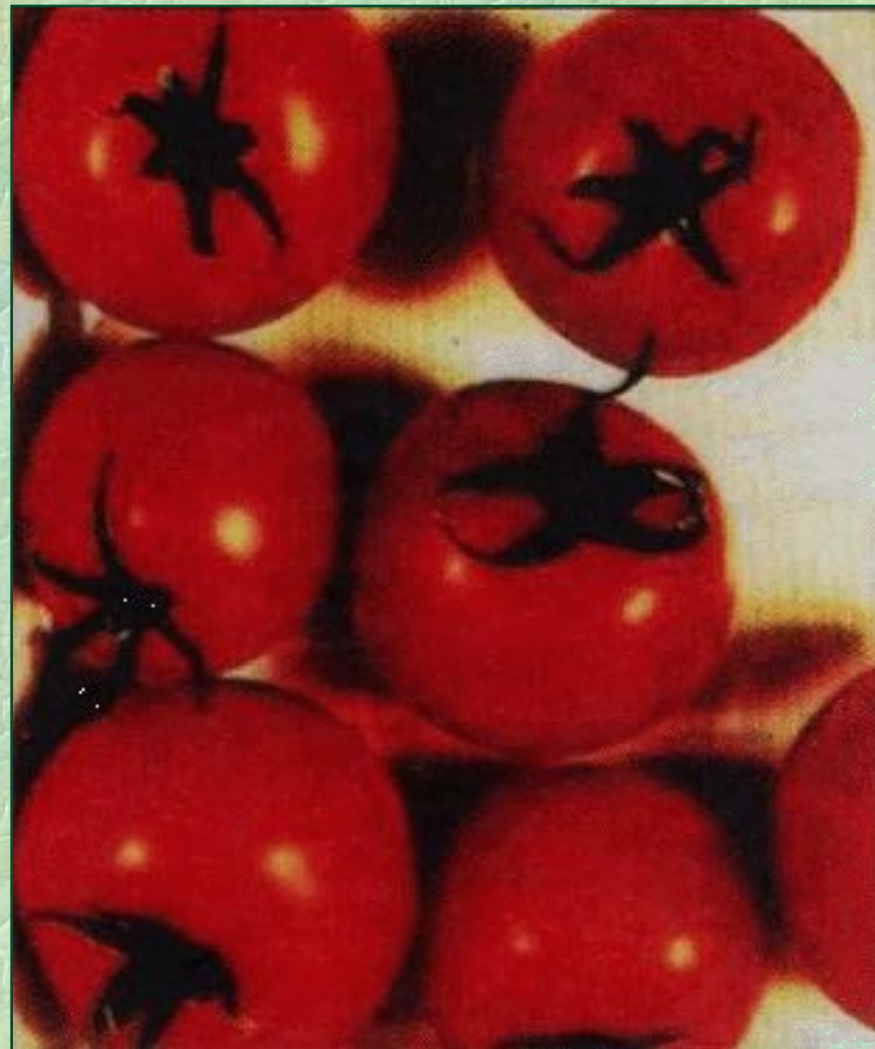
4. Отбор трансформантов с активной экспрессией трансгенов. Анализ фенотипа



Генетически модифицированные томаты “Флавр-Савр” (FLAVR SAVR)



Ген PG в нормальной ориентации



Ген PG в антисмысловой ориентации

Биосинтез этилена

