



Лекция 14 Тема: “Практическое применение молекулярных исследований”.

Вопросы:

1. Методы получения трансгенных растений.
2. Гены-маркеры для отбора трансформантов.
3. Векторы на основе генома вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК).
4. Создание трансгенных растений, устойчивых к вирусным болезням: перекрестная защита, трансгеноз белка оболочки вирусов.

- Трансгенные и мутантные растения
позволяет снять ряд проблем:
- межвидовую несовместимость;
 - стерильность гибридов;
 - проблем, возникающих из-за сцепленности генов растений.

Культура изолированных протопластов
(растительная клетка, лишенная клеточной стенки)
может быть реципиентом для:

- ядерного, митохондриального или хлоропластного геномов других, в том числе и таксономически удаленных растений (соматическая гибридизация и цибридизация);

- отдельных генов или фрагментов чужеродной ДНК (плазмиды, синтетические генные векторы);

- изолированных клеточных органелл.

Например, соматический гибрид картофеля между *Solanum tuberosum* (сорт «Приекульский» ранний) и *S. chacoense*, получен в 1979г. Р. Бутенко и А. Кучко, имел ряд хозяйственно важных признаков.

Для встраивания в геном растительной клетки необходимой последовательности существуют различные методы: барбардамент, электропорация и электрофорез, а также методы бактериального и вирусного векторов.



Методы получения трансгенных растений

Методы трансформации - это включение чужеродного гена в геном растения-реципиента. Метод разработан для многих одно- и двудольных растений: пшеница, рис, кукуруза, горох и др.

При трансформации используют механизмы обмена генетическим материалом при взаимодействии бактерий рода *Agrobacterium* с растением, или при прямом введении рекомбинантных ДНК в клетки растений.

Применение новых технологий в растениеводстве связано с загрязнением является использование биопселхозпродукции и среды ксенобиотиками.

В настоящее время альтернативой отенциала культурных растений. Применение подходов и методов генной инженерией позволяет внести изменения в геном растений для изменения их генетических свойств. Технологии генетической инженерии дают возможности конструировать генетические структуры рекомбинантных, точнее гибридных молекул РНК или ДНК. Используя специфические ферменты - **рестриктазы** определенный участок ДНК “вырезается” и присоединяется ферментом **лигазой** к другой молекуле ДНК (вектору), которая сохраняет способность к репликации при введении в клетки растения-реципиента.

Технология **позволяет выделять ген из любого организма**, а при наличии подходящего вектора, переносить чужеродный ген в растение. Технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот способствуют получению новых форм растений и расширяет возможности манипуляции с геномом растений, сокращают время на получение новых сортов культурных растений.

Плазмиды

Бактерия *Agrobacterium tumefaciens* имеет плазмиду: внехромосомный самореплицирующийся генетический элемент, который способен проникать в клетки хозяина и встраивать определенный участок ДНК (Т-ДНК) в растительный геном. В результате интеграции в геном растения и экспрессии бактериальных плазмидных генов, изменяется метаболизм клетки в сторону образования опухоли. Плазмида *A. tumefaciens*, вызывает опухоли, названа **pTi-плазмидой** (tumor inducing – индуцирующая опухоль). Плазмида pTi является уникальной. Предполагают, что pTi является природной химерой, поскольку несет два набора генов: один экспрессируется в растения, другой – в бактериальной клетке.

Регуляторные элементы генов, расположенные на сегменте Т-ДНК, предназначены для функционирования в растительной клетке, остальные гены pTi-плазмиды находятся под контролем бактериальных промоторов. Процесс переноса и интеграции Т-ДНК в растение контролируется генами вирулентности (vir-генами) расположенными на pTi-плазмиде за пределами сегмента Т-ДНК, имеет структурную особенность: наличие прямых повторов по 25 пар нуклеотидов на обоих концах сегмента. Включение любого фрагмента ДНК между этими двумя последовательностями приводит к его физическому переносу в хромосому растения.

Плазмиды

Для экспрессии интегрированного в геном растения чужеродного гена разработаны векторные системы с использованием модифицированных штаммов агробактерий, которые позволяют вводить в геном практически любые гены, добиваться их экспрессии и регенерации из трансформированных клеток целые растения.

pRi-плазмиды обнаружены у *A. rhizogenes*, они названы **pRi-плазмидами** (root inducing) и вызывают у растений разрастание корешков. При заражении растений эти плазмиды включают несколько копий T-ДНК в состав растительного генома и способствуют синтезу опинов. Наличие T-ДНК не оказывает вредного действия на растение, поэтому pRi-плазмиды чаще используют при конструировании трансгенных растений.

Agrobacterium имеют ограниченный спектр растений-хозяев, это только семейство двудольных.

В настоящее время разработаны разные методы введения чужеродной генетической информации в растительные клетки: метод биологической баллистики, использование промежуточных векторов, бинарных векторов; электропорация; трансформация растительных протопластов; микроинъекции; челночные векторы на основе ДНК

Метод биологической баллистики

Клетки растений-реципиентов «обстреливают» при помощи вакуумной пушки металлическими микрочастицами с напыленными на их поверхность ДНК вектора, который несет конструкцию с целевым геном. Частицы металла имеют диаметр 0.6-1.2 мкм, наносят на пленку-подложку из целлофана и помещают в пушку. Суспензия клеток, каллус или незрелые зародыши однодольных помещаются под выходным отверстием пушки на расстоянии 10-15 см.

После «выстрела» поток микрочастиц пронизывает клетки, часть из которых остается способной к регенерации. С помощью баллистического метода получены стабильные трансформанты кукурузы, риса, пшеницы, ячменя и др. культур. Помимо решения проблемы трансформации однодольных, этот метод позволяет осуществлять прямой перенос ДНК в эмбриогенную пыльцу с последующим быстрым получением трансгенных дигаплоидных растений для использования в селекции.

Электропорация. Микроинъекция

Электропорация использует физическое воздействие на растительные клетки для внедрения в них чужеродной ДНК. Электропорация основана на повышении проницаемости биологических мембран под действием электрических высоковольтных импульсов. В результате кратковременного воздействия на смесь растительных протопластов с трансформирующей ДНК (напряжение 250- 300 В, доли секунды) молекулы ДНК проникают в клетки через поры клеточной мембраны. Суспензию протопластов затем разбавляют и высевают на среду для регенерации.

Микроинъекции

После фиксирования протопластов на стекле с помощью полилизина стало возможным введение препаратов чужеродных ДНК в клетки через микроиглы с внешним диаметром около 2 мкм.

Эффективность трансформации при этом колеблется в пределах 10-20 %. Поскольку видовые ограничения для этого метода пока не известны, его считают универсальным.

Гены-маркеры для отбора трансформантов

Частота трансформации обычно не высокая, поэтому в гибридные плазмиды вводят гены-маркеры на селективных средах (для удобства отбора трансформантов). Маркерами являются гены устойчивости к антибиотикам из *Escherichia coli*, к которым растительные клетки чувствительны (хлорамфеникол, канамицин, метатрексат и др.). В качестве маркерных генов могут использовать гены, которые кодируют биосинтез фермента **люциферазы**, выделенного из бактерий рода *Vibrio*: трансформанты на общем фоне идентифицируют по способности к свечению.

В качестве маркера применяют и ген бактериальной **β -глюкуронидазы**, позволяющий идентифицировать трансформанты по окрашиванию селективных сред.

Для экспрессии бактериальных генов-маркеров в клетки растений вводят соответствующие сигнальные последовательности для начала и окончания процесса транскрипции этих генов. Регуляторными элементами являются:

- промоторы опиновых генов рТi-плазмиды;
- 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК);
- промотор гена белка, связывающего хлорофилл и др.
- промотор гена малой субъединицы фермента рибулозодифосфаткарбоксилазы.

Регенерация трансформантов

В технологии трансгеноза регенерация целых растений из трансформантов является сложной. Широко применяют метод листовых дисков: из листьев пробойником высекают круги и инкубируют в суспензии клеток агробактерий. Плазида агробактерий имеет вставку с целевым геном. Кусочки переносят на селективную среду регенерации с антибиотиками, блокирующими рост агробактерии, и антибиотиками, ингибирующими рост нетрансформированных тканей.

Селективная среда позволяет отобрать только те ткани листа, которые содержат маркерные гены, т.е. трансформированные ДНК ткани. Затем проверяется присутствие целевого гена с помощью генетического и молекулярного анализа.

В технологии получения трансгенных растений, кроме pRi - и pTi -плазмид используют другие трансформационные и векторные системы. Регенерация лучше происходит из многоклеточных структур.

Создание трансгенных растений, устойчивых к вирусным болезням

Устойчивость к вирусным болезням связана с экспрессией в растении гена структурного белка оболочки вируса.

Методы:

- перекрестная защита растений от вирусных инфекций;
- трансгенез белка оболочки вирусов.

Перекрестная защита от вирусов у растений представляет собой неспособность вирусов заражать растения, предварительно инокулированные другим вирусом. Механизм перекрестной устойчивости изучали на мутантах, дефектных по разным генам. Изучена роль продуктов этих генов. Так, при использовании для первичной инокуляции мутантов ВТМ, неспособных синтезировать полноценный структурный белок оболочки (СБО), показано, что эти мутанты способны индуцировать защитные механизмы растений табака. Однако, обработка растений штаммами вируса с нормальным геном СБО (геном «дикого» типа) приводила к значительно большему эффекту защиты.

Перекрестная защита растений от вирусных инфекций

Мутант ВТМ по СБО, в отличие от штаммов данного типа, индуцирует неспецифическую устойчивость растений вплоть до устойчивости к вирусу мозаики турнепса (ВМТ), относящегося к другой таксономической группе – потивирусов. Обработка растений штаммом ВТМ «дикого» типа, индуцирует устойчивость к другим штаммам ВТМ больше, чем к вирусу мозаики турнепса. Это предполагает существование, по крайней мере, нескольких механизмов перекрестной устойчивости.

Этот подход к изучению механизмов перекрестной устойчивости имеет ограничения, связанные с тем, что мутации ряда вирусных генов не могут выражаться фенотипически. Так, например, дефекты по гену репликазы приводят к «летальному» для вирусов исходу. Возможность этого метод увеличилось после разработки переноса отдельных фрагментов вирусного генома в клетки растений с последующей экспрессией перенесенных вирусных генов. Этот процесс называется трансгенозом, а полученные растения трансгенными.

Трансгенез белка оболочки вирусов

Ген структурного белка оболочки (СБО) ВТМ был перенесен в растения табака, экспрессия этого гена в клетках растений табака осуществлена при помощи гетерологичных промоторов.

Трансгенные растения табака, с высоким уровнем экспрессии СБО ВТМ, оказались более устойчивы к заражению суспензией ВТМ, чем к инокуляции препаратами РНК-ВТМ.

Возможным механизмом устойчивости в данном случае может быть блокирование процесса диссоциации белка оболочки вирионов ВТМ, который необходим для высвобождения вирусной РНК и запуска первых этапов инфекционного процесса.

Успешное заражение трансгенных растений препаратами РНК ВТМ объясняют:

- отсутствием стадии диссоциации;
- межклеточный транспорт вирусной РНК, в этой системе, не нуждается в наличии белка оболочки.

Блокирование первичных стадий инфекционного процесса подтверждено при заражении протопластов, полученных из различных типов клеток табака. Экспрессия СБО-гена ВТМ в протопластах эпидермальных клеток приводит к возникновению устойчивости этих протопластов к заражению ВТМ.

Трансгеноз белка оболочки вирусов

Изучение механизмов защиты, реализующихся в трансгенных растениях, экспрессирующих ген белка оболочки вируса позволило, сделать выводы:

1. В СБО(+)-растениях блокирование инфекции происходит на стадии, предшествующей синтезу минус цепи вирусной РНК.
2. Уровень защиты СБО(+)-растений табака значительно выше по отношению к ВТМ, чем к РНК ВТМ. Эта защита обусловлена синтезом белка оболочки ВТМ в клетках трансгенных растений и не связана с синтезом m-РНК-транскриптов СБО. Аналогичная ситуация имеет место и в случае с трансгенными растениями, несущими ген белка оболочки вируса мозаики люцерны.
3. На уровень защиты СБО(+)-трансгенных растений влияет не только экспрессия гена белка оболочки, но и способность этого белка образовывать внутриклеточные вирусоподобные агрегаты.
4. Прививка стеблей СБО(+) растений на проростки СБО(-) растений табака приводит к индукции устойчивости к системной инфекции ВТМ, при этом не предотвращается возможность развития первичных стадий инфицирования.

Механизмы защиты растений

Известны различные механизмы защиты растений от грибных патогенов:

- морфологические барьеры;
- локальная гибель инфицированных клеток;
- биосинтез фитоалексинов;
- синтез ферментов, разрушающих клеточные стенки патогена;
- синтез рибосоминактивирующих белков, и др.

Возможности использования различных генов хозяина или патогена, продукты экспрессии которых влияют на взаимодействие партнеров, в создании трансгенных растений, устойчивых к грибным болезням разнообразны.

Создание трансгенных растений, устойчивых к грибным болезням

1. Устойчивость растений к грибам, как следствие экспрессии генов чужеродных фитоалексинов.
2. Индукция синтеза пероксидазы растения-хозяина.
3. Индукция синтеза элиситинов (белки, продуцируемые видами *Phytophthora*).
4. Применение хитиназ и глюканаз.

Создание трансгенных растений, устойчивых к бактериальным болезням

Бактериальные болезни приносят большой экономический ущерб для многих сельскохозяйственных растений, огромные потери урожаям зерновых, овощных и фруктовых культур. В большинстве случаев применение защитных агрохимических и химических технологий не эффективны.

В настоящее время в мире развивается технологии биологической защиты сельхоз культур:

1. Использование антибактериальных белков нерастительного происхождения.
2. Литические пептиды насекомых.
3. Лизоцимы.
4. Другие антибактериальные пептиды.
5. Ингибирование бактериальных факторов патогенности.
6. Ингибирование бактериальных токсинов.
7. Повышенная продукция элиситоров.
8. Экспрессия клонированных генов устойчивости.
9. Повышенная продукция форм активированного кислорода.
10. Экспрессия защитных генов растений.