ВВЕДЕНИЕ ГЕНОВ В КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ - ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ

- 18-16группа
- Беген Камиля
- Турлыбекова Шынар

.ГЛАВА: ВВЕДЕНИЕ ГЕНОВ В КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ - ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ
ВВЕСТИ ЧУЖЕРОДНУЮ ДНК В РАСТЕНИЯ МОЖНО РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ.ДЛЯ ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ СУЩЕСТВУЕТ ЕСТЕСТВЕННЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ: ПЛАЗМИДЫ АГРОБАКТЕРИЙ. ЧТО КАСАЕТСЯ ОДНОДОЛЬНЫХ, ТО, ХОТЯ В ПОСЛЕДНИЕ ГОДЫ ДОСТИГНУТЫ ОПРЕДЕЛЕННЫЕ УСПЕХИ В ИХ ТРАНСФОРМАЦИИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ВЕКТОРАМИ, ВСЕ ЖЕ ПОДОБНЫЙ ПУТЬ ТРАНСФОРМАЦИИ ВСТРЕЧАЕТ СУЩЕСТВЕННЫЕ ЗАТРУДНЕНИЯ.

ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ УСТОЙЧИВЫХ ("РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ") К АГРОБАКТЕРИЯМ РАСТЕНИЙ РАЗРАБОТАНЫ ПРИЕМЫ ПРЯМОГО ФИЗИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ДНК В КЛЕТКУ, МНОГИЕ ИЗ КОТОРЫХ ВЗЯТЫ ИЗ ПРАКТИКИ РАБОТЫ С КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ ИЛИ ЖИВОТНЫХ. ЭТИ МЕТОДЫ ДОСТАТОЧНО РАЗНООБРАЗНЫ, ОНИ ВКЛЮЧАЮТ: БОМБАРДИРОВКУ МИКРОЧАСТИЦАМИ ИЛИ БАЛЛИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД; ЭЛЕКТРОПОРАЦИЮ; ОБРАБОТКУ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ; ПЕРЕНОС ДНК В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ И ДР. НАИБОЛЕЕ ПРОДУКТИВНЫМ И ЧАЩЕ ВСЕГО ИСПОЛЬЗУЕМЫМ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТОД БОМБАРДИРОВКИ МИКРОЧАСТИЦАМИ. ПРИ ДОСТАТОЧНОЙ СКОРОСТИ ЭТИ ЧАСТИЦЫ МОГУТ НЕПОСРЕДСТВЕННО ПРОНИКАТЬ В ЯДРО, ЧТО СИЛЬНО ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСФОРМАЦИИ. ЭТИМ ЖЕ МЕТОДОМ МОЖНО, ВПРОЧЕМ, ТРАНСФОРМИРОВАТЬ И ДРУГИЕ ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ - ХЛОРОПЛАСТЫ И МИТОХОНДРИИ.

В ПОСЛЕДНЕЕ ВРЕМЯ БЫЛ РАЗРАБОТАН И УСПЕШНО ПРИМЕНЕН ТАКЖЕ КОМБИНИРОВАННЫЙ МЕТОД ТРАНСФОРМАЦИИ, НАЗВАННЫЙ АГРОЛИСТИЧЕСКИМ. ПРИ ЭТОМ ЧУЖЕРОДНАЯ ДНК ВВОДИТСЯ В ТКАНИ КАКИМ-ЛИБО ФИЗИЧЕСКИМ МЕТОДОМ, НАПРИМЕР, БАЛЛИСТИЧЕСКИМ. ВВОДИМАЯ ДНК ВКЛЮЧАЕТ КАК Т-ДНК ВЕКТОР С ЦЕЛЕВЫМ И МАРКЕРНЫМ ГЕНОМ, ТАК И АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ, ПОСТАВЛЕННЫЕ ПОД ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ПРОМОТОР. ВРЕМЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ ПРИВОДИТ К СИНТЕЗУ БЕЛКОВ, КОТОРЫЕ ПРАВИЛЬНО ВЫРЕЗАЮТ Т-ДНК ИЗ ПЛАЗМИДЫ И ВСТРАИВАЮТ ЕЕ В ХОЗЯЙСКИЙ ГЕНОМ, КАК И ПРИ ОБЫЧНОЙ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ.

- После проведения тем или иным способом трансформации растительной ткани ее помещают in vitro на специальную среду с фитогормонами, способствующую размножению клеток. Среда обычно содержит селективный агент, в отношении которого трансгенные, но не контрольные клетки приобретают устойчивость. Регенерация чаще всего проходит через стадию каллуса, после чего при правильном подборе сред начинается органогенез (побегообразование). Сформированные побеги переносят на среду укоренения, часто также содержащую селективный агент для более строгого отбора трансгенных особей.

- МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ При изучении экспрессии чужеродных генов в растительных клетках исследователи столкнулись с рядом новых явлений. Выяснилось, что трансформированные идентичной конструкцией ДНК трансгенные клоны, полученные параллельно в одном и том же опыте, значительно различаются по уровню экспрессии введенного гена. Показано, что уровень экспрессии зависит от многих факторов и в значительной мере от того в какую область ядерного хроматина попал введенный ген.

  Экспрессия трансгена, как правило высока при его попадании в область активного хроматина. Кроме того, оказалось, что при встраивании в ядерный геном конструкция ДНК нередко претерпевает существенные изменения (перестройки, дупликации, инверсии и т.д.), что также приводит в основном к снижению экспрессии.

- Было установлено также, что обычно применяемые процедуры трансформации вовсе не безразличны и для хозяйского генома.

  Во-первых, встраивание трансгена может нарушить первичную структуру какого-либо хозяйского гена и тем самым вызвать его инактивацию. Это событие, по-видимому, не так редко, особенно с учетом того, что трансгены чаще встраиваются в транскрибируемые области хроматина (эухроматин). В последующих поколениях такой инактивированный ген может перейти в гомозиготное состояние, выражаясь в непредусмотренной и обычно нежелательной фенотипической мутации.

  Во-вторых, при агробактериальном или физическом переносе генов в растительный геном в последнем нередко отмечаются разного рода перестройки, вплоть до транслокации фрагментов хромосом. Все это также может менять нормальное функционирование генома растения.

- Еще одна важная проблема, которая открылась благодаря генетической инженерии растений - это проблема замолкания генов (gene silencing). Было обнаружено, что у достаточно заметной доли трансгенных растений интродуцированный ген через какое-то время теряет свою активность, хотя физически сохраняется в геноме. Таким образом, было установлено, что растение обладает способностью активно противостоять экспрессии чужеродной ДНК.

- Проблема замолкания генов имеет большое практическое значение, так как у генетически трансформированных сельскохозяйственных культур трансгены должны функционировать стабильно. За последние годы удалось выяснить механизмы и некоторые условия, способствующие замолканию генов. Одним из основных факторов является число идентичных копий гена, встроенных в геном: чем больше таких копий и чем они протяженнее, тем больше вероятность замолкания генов. Откуда следуют практические рекомендации генным инженерам: трансгенные культуры должны содержать не более одного встроенного гена на гаплоидный геном; сигнальные части трансгена (промоторы, терминаторы и др.) не должны иметь длинных гомологий (более 100-300 п.о. ДНК) с участками хозяйского генома; фрагменты векторной плазмидной или вирусной ДНК должны быть по возможности полностью удалены из конструкции перед трансформацией. Уровень и стабильность экспрессии трансгенов в растении можно повысить при специальном конструировании концов вводимой ДНК. Так, добавление терминаторов транскрипции предотвращает нежелательное прохождение через трансген РНК-полимеразы, если промотор хозяйского генома случайно оказывается поблизости от места встраивания. При концевом добавлении сравнительно коротких (>300 п. о.) участков связывания ядерного матрикса (МАР) трансген имеет больше шансов образовать независимую петлю хроматина или включиться в состав транскрибируемого эухроматина. В обоих случаях это приводит к повышению и стабилизации уровня экспрессии трансгена. В ряде случаев, особенно у злаков, введение интрона в район 5'-конца мРНК целевого гена резко усиливает его транскрипцию. Помимо этого, в составе мРНК обнаружены цис-элементы, определяющие степень ее стабильности в растительной клетке. Правильный генно-инженерный дизайн таких элементов может также способствовать оптимальному накоплению мРНК в трансгенных растениях, предназначенных для биотехнологического применения.

- Стабильно введенный ген должен передаваться потомству при семенном размножении, поэтому важно определить этот параметр на практике. Уровень транскрипции введенного гена оценивается обычно с помощью традиционного Northern-блотинга или недавно предложенных количественных версий RT PCR (на мРНК с помощью обратной транскриптазы синтезируется комплементарная цепь ДНК, которая и размножается в полимеразной цепной реакции). В ряде случаев экспрессию гена проще и надежнее контролировать по конечному белковому продукту или тому эффекту, который этот белок вызывает.

  Однако необходимо использование разных методов для доказательства истинной трансгенности данного растения, чтобы исключить "псевдотрансгенные" черты, вызванные сомаклональной (эпигенетической) изменчивостью или неполной элиминацией агробактерий

- Для изучения молекулярной конституции генома трансгенных организмов можно использовать полиморфизм длины рестрикционных фрагментов. Метод основан на том, что гомологичные последовательности ДНК гибридов и их родителей при разрезании рестриктазами могут попасть во фрагменты разной длины. В качестве маркеров родительских геномов можно использовать и часто повторяющиеся последовательности ДНК. Повторяющиеся последовательности составляют значительную часть генома типичного растения. Большая часть последовательностей повторяется до 1000 раз на геном. У многих растений выявлены еще более частые повторы (100000 - 1000000 копий на геном), которые составляют до 20% генома. Они имеют отличный от остальной клеточной ДНК "Г - Ц" состав и в градиенте хлористого цезия выявляются в виде сателлитного компонента. В геномах даже очень близких видов амплифицируются разные типы повторов, поэтому они становятся своеобразными "отпечатками пальцев" близкородственных геномов. Высокотандемные последовательности ДНК относительно легко клонируются, так как после расщепления рестриктазой, имеющей сайт узнавания в повторе, эти последовательности легко выявляются в виде полос при электрофоретическом разделении фрагментов и могут быть элюированы из геля в чистом виде. Их можно использовать в качестве зондов. Использование высокоповторяющихся последовательностей в качестве молекулярных зондов позволяет вести одновременный скрининг большого количества образцов грубоочищенной ДНК регенерировавших после слияния протопластов растений или каллусов методом дот-гибридизации.

- Как другой биохимический маркер при анализе соматических гибридов может использоваться рибулозо - 1, 5 - бифосфат карбоксилаза/оксигеназа. Причины: необычайно высокое содержание его в листьях (до 50% растворимого белка), хорошо разработанные методы выделения и анализа, а также то, что составляющие этот белок субъединицы кодируются как ядерным (мол. масса 14 кД), так и хлоропластным (большая субъединица, мол. масса 55 кД) геномами.
-
- Введение ДНК в клетки растений с помощью Ti- и Ri-плазмид
  A. tumefaciens вызывает образование опухолей стебля двудольных растений - так называемых корончатых галлов. Бактерии прикрепляются к клетками растения в местах повреждений. Сайтами связывания на поверхности бактерий, видимо, являются молекулы β-глюкана и О-антигенной цепи липополисахарида внешней мембраны.
- Бактерии связываются с рецепторами высшего растения, состоящими из белка и пектина; лектины в данном случае не имеют значения. Бактериальные сайты связывания и рецепторы растений являются констуитивными, т.е. оба партнера обладают ими еще до момента взаимодействия. Первый шаг взаимодействия с растением - узнавание - следует рассматривать как специфическую адгезию растений. Как только бактерии прикрепились к поверхности клеток растения, они начинают образовывать целлюлозные фибриллы. Эти фибриллы можно увидеть в сканирующем электронном микроскопе уже через 90 минут после добавления бактерий к суспензии культуры клеток ткани моркови. К 10 часам инкубации фибриллы формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий. Фиксируя их у поверхности растения, фибриллы увеличивают множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения

- Клеточная стенка растения повреждается вследствие выделения бактериями пектолитических ферментов, что обеспечивает плотный контакт бактерий с плазмалеммой растительной клетки. Этот контакт необходим для передачи ДНК от бактерий в растительную клетку. Передача ДНК происходит без нарушения целостности мембраны растительной клетки, но требует определенного её состояния - компетентности.

  Способность A. tumefaciens индуцировать у растений образование опухолей типа "корончатого галла" коррелирует с наличием у них Ti-плазмиды. Опухолевая трансформация проявляется в гипертрофии возникающей после проникновения агробактерий в пораненные участки (сайты) растений (рис. 47). Трансформация является результатом стабильного ковалентного включения (инсерции или интеграции) сегмента («transferred» или Т-ДНК) большой плазмиды (pTi - tumor inducing или pRi — root inducing) бактерий в ядерную ДНК растительной клетки.

- Другой вид агробактерий – A. rhizogenes, - вызывает заболевание, именуемое "бородатый корень", при котором в зоне повреждения корня образуется масса новых корешков. A. rubi обычно индуцируют неорганизованные опухоли (тератомы), штаммы A. radiobacter авирулентны.

  В отличие от большинства тканей взятых из нормальных растений, трансформированные ткани в культуре in vitro в асептических (стерильных) условиях способны неограниченно расти в отсутствие экзогенно добавленных ауксинов и цитокининов. Кроме того, трансформированные ткани часто синтезируют одну или более групп соединений, названных опинами, которые обычно не обнаруживаются в нетрансформированных растительных тканях.

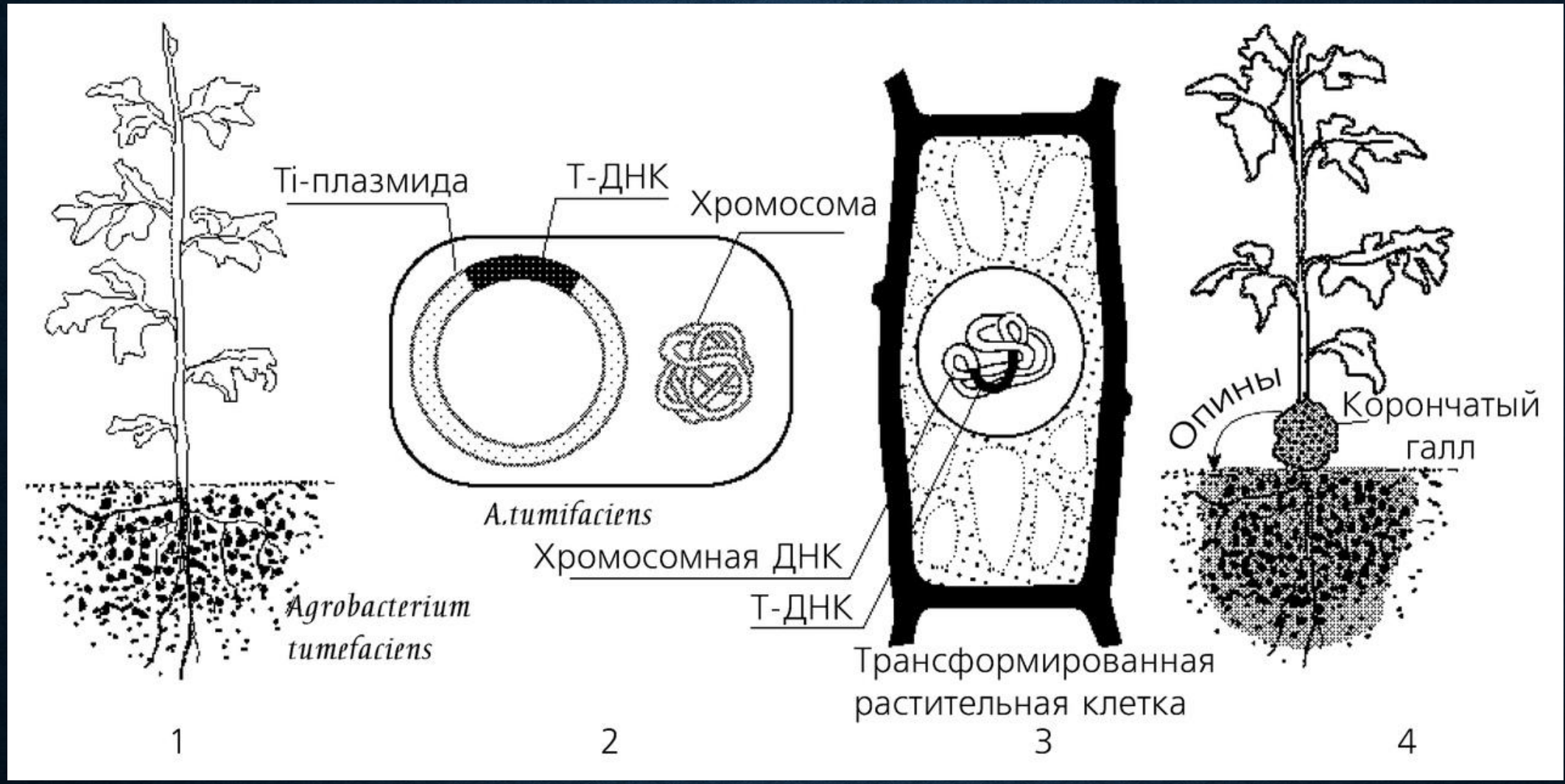

РИСУНОК: Генетическая колонизация растения A. tumefaciens: 1- агробактерии существуют в ризосфере; 2 - строение A. tumefaciens; 3 – встраивание Т-ДНК в геном; 4 – образование опухоли

- Наиболее подробно изучены опухоли — корончатые галлы, индуцируемые Agrobacterium tumefaciens. Они представляют собой истинно злокачественные опухоли, которые могут расти в культуральной среде в отсутствие стимуляторов роста — фитогормонов, необходимых для роста нормальных тканей.

  Опухоли можно поддерживать в течение многих лет in vitro, и при их использовании они способны вызывать опухоли у здоровых растений. В природных условиях корончатые галлы образуются в месте соединения корня со стеблем (у корневой шейки), откуда и произошло их название корончатый галл. Однако корончатые галлы могут развиваться и на подземных частях растения, например на корнях плодовых деревьев, и на надземных, например на стебле винограда.

  В лаборатории эти заболевания можно вызвать у здоровых растений экспериментально, путем инфицирования их

- бактериями. Растения перед инокуляцией должны быть поранены, при этом опухоли возникают в поврежденных сайтах растения, обычно на стебле или листьях растения. Кроме целых растений в качестве тест-объектов используются экспланты, например ломтики моркови и кусочки других органов растений.

- Ткани корончатых галлов содержат более высокие уровни ауксина и цитокининов. Выявлено еще одно наследуемое изменение в клетках корончатых галлов — это синтез опинов. Необычное для растений соединение, производное аргинина, обнаруженное лишь в определенных опухолевых линиях, было названо октопином. Затем было показано, что другими опухолевыми линиями синтезируется еще одно соединение — нопалин, также производное аргинина. В зависимости от типа индуцируемого в опухоли опина штаммы A. tumefaciens и находящиеся в них Ti-плазмиды получили соответствующее обозначение — октопиновые или нопалиновые.

  Агробактерии, индуцирующие опухоли, в которых не обнаруживается ни нопалин, ни октопин, ранее обозначались как штаммы нулевого типа. Позднее было показано, что в опухолях нулевого типа синтезируются опины третьего класса — агропины. Обнаружены также и другие типы опинов. Поскольку все опины обнаруживаются только в опухолевых клетках и отсутствуют в клетках нормальных растений или клетках растительных опухолей других типов, то опины могут рассматриваться как специфические биохимические маркеры для клеток корончатых галлов.

- Опухоли, развивающиеся из одной или нескольких клеток, быстро разрастаются в крупные образования, диаметр которых на определенных видах деревьев может достигать одного метра. Типичная неорганизованная опухоль представляет собой более или менее округлую дедифференцированную массу клеток (каллус), которая может иметь гладкую или шероховатую поверхность, быть паренхиматозной или одревесневшей. Иногда на периферии таких опухолей формируются листовидные структуры (тератомы), иногда — придаточные корни. Нередко на зараженных растениях наблюдаются вторичные опухоли, значительно удаленные от первичных. Обычно они обнаруживаются выше первичной опухоли, что предполагает движение бактерий или трансформирующего агента в направлении транспирации.

- Распространение Agrobacterium и других фитопатогенных бактерий по межклетникам и ксилеме является хорошо доказанным фактом. Агробактерии могут передвигаться на большие дистанции со значительной скоростью. Очевидно, это не является единственной причиной индукции вторичных опухолей. Организацию опухолей, а именно форму, величину и характер развития, определяют три фактора:

  штамм агробактерий,
  генотип растения-хозяина,
  физиологическое состояние инфицируемых растительных клеток.
  Agrobacterium имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать практически все двудольные растения. Долгое время считалось, что однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. В настоящее время показано, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать однодольные растения, в частности представителей таких семейств, как Amaryllidaceae, Liliaceae, Gramineae, Iridaceae и некоторых других. Однако существуют определенные вариации круга хозяев для различных штаммов Agrobacterium: некоторые штаммы способны вызывать галлообразование на отдельных видах растений, но не инфицируют другие. Различные сорта одного и того же растения также могут иметь различную чувствительность к данному бактериальному штамму.

- Невозможность заражения в природе обуславливается отсутствием соответствующих рецепторов, необходимых для взаимодействия с бактериями. Другим фактором, препятствующим инфицированию однодольных агробактериями, возможно, является отсутствие в клетках растений низкомолекулярных индукторов вирулентности Agrobacterium, например ацетосирингона, которые обычно присутствуют в клеточном соке при поранении двудольных растений.

  Подробная информация о структуре плазмид Agrobacterium получена путем их рестрикционного или физического картирования. В результате исследований обнаружено четыре основных области гомологии между октопиновой и нопалиновой плазмидами. Две

- Введение ДНК в клетки растений с помощью Ti- и Ri-плазмид
  A. tumefaciens вызывает образование опухолей стебля двудольных растений - так называемых корончатых галлов. Бактерии прикрепляются к клетками растения в местах повреждений. Сайтами связывания на поверхности бактерий, видимо, являются молекулы β-глюкана и О-антигенной цепи липополисахарида внешней мембраны. Бактерии связываются с рецепторами высшего растения, состоящими из белка и пектина; лектины в данном случае не имеют значения. Бактериальные сайты связывания и рецепторы растений являются констуитивными, т.е. оба партнера обладают ими еще до момента взаимодействия. Первый шаг взаимодействия с растением - узнавание - следует рассматривать как специфическую адгезию растений. Как только бактерии прикрепились к поверхности клеток растения, они начинают образовывать целлюлозные фибриллы. Эти фибриллы можно увидеть в сканирующем электронном микроскопе уже через 90 минут после добавления бактерий к суспензии культуры клеток ткани моркови. К 10 часам инкубации фибриллы формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий. Фиксируя их у поверхности растения, фибриллы увеличивают множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения.

- Клеточная стенка растения повреждается вследствие выделения бактериями пектолитических ферментов, что обеспечивает плотный контакт бактерий с плазмалеммой растительной клетки. Этот контакт необходим для передачи ДНК от бактерий в растительную клетку. Передача ДНК происходит без нарушения целостности мембраны растительной клетки, но требует определенного её состояния - компетентности.

  Способность A. tumefaciens индуцировать у растений образование опухолей типа "корончатого галла" коррелирует с наличием у них Ti-плазмиды. Опухолевая трансформация проявляется в гипертрофии возникающей после проникновения агробактерий в пораненные участки (сайты) растений (рис. 47). Трансформация является результатом стабильного ковалентного включения (инсерции или интеграции) сегмента («transferred» или Т-ДНК) большой плазмиды (pTi - tumor inducing или pRi — root inducing) бактерий в ядерную ДНК растительной клетки.

- ВОЗМОЖНОСТИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ:
  Первые трансгенные растения (растения табака со встроенными генами из микроорганизмов) были получены в 1983 г. Первые успешные полевые испытания трансгенных растений (устойчивые к вирусной инфекции растения табака) были проведены в США уже в 1986 г.

- После прохождения всех необходимых тестов на токсичность, аллергенность, мутагенность и т.д. первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г. Это были томаты Flavr Savr с замедленным созреванием, созданные фирмой "Calgen", а также гербицид-устойчивая соя компании "Monsanto". Уже через 1-2 года биотехнологические фирмы поставили на рынок целый ряд генетически измененных растений: томатов, кукурузы, картофеля, табака, сои, рапса, кабачков, редиса, хлопчатника.
- В настоящее время получением и испытанием генетически модифицированных растений занимаются сотни коммерческих фирм во всем мире с совокупным капиталом более ста миллиардов долларов. В 1999 г. трансгенные растения были высажены на общей площади порядка 40 млн. га, что превышает размеры такой страны, как Великобритания. В США генетически модифицированные растения (GM Crops) составляют сейчас около 50% посевов кукурузы и сои и более 30-40% посевов хлопчатника. Это говорит о том, что генно-инженерная биотехнология растений уже стала важной отраслью производства продовольствия и других полезных продуктов, привлекающей значительные людские ресурсы и финансовые потоки. В ближайшие годы ожидается дальнейшее быстрое увеличение площадей, занятых трансгенными формами культурных растений.

Первая волна трансгенных растений, допущенных для практического применения, содержала дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам).

- Нынешний этап развития генетической инженерии растений получил название "метаболическая инженерия". При этом ставится задача не столько улучшить те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционной селекции, сколько научить растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях. Этими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны и другие "лекарственные" белки, новые полимеры, не засоряющие окружающую среду и многое, многое другое. Использование трансгенных растений позволяет наладить масштабное и дешевое производство таких веществ и тем самым сделать их более доступными для широкого потребления. Улучшение качества запасных белков

  Запасные белки основных культурных видов кодируются семейством близкородственных генов. Накопление запасных белков семян – сложный биосинтетический процесс. Первая генноинженерная попытка улучшения свойства одного растения путем введения гена запасного белка от другого была, проведена Д. Кемпом и Т. Холлом в 1983 г. в США. Ген фазеолина бобов с помощью Ti-плазмиды был перенесен в геном подсолнечника. Результатом этого опыта было лишь химерное растение, получившее название санбин. В клетках подсолнечника были обнаружены иммунологически родственные фазеолиновые полипептиды, что подтверждало факт переноса гена между растениями, относящимися к различным семействам

- Позднее ген фазеолина был передан клеткам табака: в растениях-регенерантах ген экспрессировался во всех тканях, хотя и в малых количествах. Неспецифическая экспрессия фазеолинового гена, так же как и в случае переноса его в клетки подсолнечника, сильно отличается от экспрессии этого гена в зрелых семядолях бобов где фазеолин составлял 25—50% от общего белка. Этот факт указывает на необходимость сохранения и других регуляторных сигналов этого гена при конструировании химерных растений и на важность контроля экспрессии генов в процессе онтогенеза растений.

  Ген, кодирующий запасной белок кукурузы – зеин, после интеграции его в Т-ДНК был перенесен в геном подсолнечника следующим образом. Штаммы агробактерий, содержащие Ti-плазмиды с геном зеина, использовали для индукции опухолей в стеблях подсолнечника.
- Некоторые из полученных опухолей содержали мРНК, синтезируемые с генов кукурузы, что дает основание рассматривать эти результаты как первое доказательство транскрипции гена однодольного растения в двудольном. Однако присутствие зеинового белка в тканях подсолнечника не обнаружилось.
-
- Сферы применения культур растительных клеток:
  Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

- 1.Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливает ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений. Популяциям растительных клеток присущи специфические особенности: генетические, эпигенетические (зависящие от дифференцированной активности генов) и физиологические. При длительном культивировании гетерогенной по этим признакам популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которых соответствуют данным условиям выращивания, следовательно, популяция эволюционирует. Все это позволяет считать, что культуры клеток являются новой экспериментально созданной биологической системой, особенности которой пока мало изучены. Культуры клеток и тканей могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.
- 2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению.

  Можно назвать несколько направлений создания новых технологий на основе культивируемых тканей и клеток растений:

- 1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения:

  традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение);
  синтез новых необычных соединений, что возможно благодаря исходной неоднородности клеточной популяции, генетической изменчивости культивируемых клеток и селективному отбору клеточных линий со стойкими модификациями, а в некоторых случаях и направленному мутагенезу;
  культивируемые в суспензии клетки могут применятся как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксилирования, метилирования, деметилирования, гликолизирования, изомеризации). В результате биотрансформации получают уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений других видов.

- 2. Ускоренное клональное микроразмно жение растений, позволяющее из одного экпланта получать от 10000 до 1000000 растений в год, причем все они будут генетически идентичны.

  3. Получение безвирусных растений.

  4. Эмбриокультура и оплодотворение in vitro часто применяются для преодоления постгамной несовместимости или щуплости зародыша, для получения растений после отдаленной гибридизации. При этом оплодотворенная яйцеклетка вырезается из завязи с небольшой частью ткани перикарпа и помещается на питательную среду. В таких культурах можно также наблюдать стадии развития зародыша.

- 5. Антерные культуры – культуры пыльников и пыльцы используются для получения гаплоидов и дигаплоидов.

  6. Клеточный мутагенез и селекция. Тканевые культуры могут производить регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала в результате сомаклонального варьирования. При этом в некоторых случаях можно обойтись без мутагенной обработки.

  7. Криоконсервация и другие методы сохранения генофонда.

  8. Иммобилизация растительных клеток.

  9. Соматическая гибридизация на основе слияния растительных протопластов.

  10.Конструирование клеток путем введения различных клеточных оганелл.

  11.Генетическая трансформация на хромосомном и генном уровнях.

- 12. Изучение системы «хозяин – паразит» с использованием вирусов, бактерий, грибов и насекомых).