

Генетическая инженерия в современной селекции и семеноводстве растений

Содержание лекции:

1. Геномная и хромосомная инженерия
2. Генная инженерия

1. Геномная и хромосомная инженерия

5.1

Под **генетической инженерией** понимают использование комплекса клеточных, генетических, молекулярно-генетических методов при создании растительных организмов с необходимыми человеку свойствами.

*Поэтому понятие генетической инженерии объединяет понятия **геномной, хромосомной и генной инженерии**.*

Поскольку технологии генетической инженерии являются ДНК-технологиями (при которых используются рекомбинантные, т.е. перестроенные ДНК), можно говорить о геномных, хромосомных и генных ДНК-технологиях.

Сущность геномной ДНК-технологии (геномной инженерии) заключается в целенаправленной перестройке генома того или иного вида растений, вплоть до создания нового вида.

Геномная инженерия – перенос большей части либо всего генетического материала из одной клетки в другую.

5.1

Хромосомная инженерия связана с замещением хромосом у растений на внутривидовом, межвидовом и даже межродовом уровнях. В настоящее время она связана, прежде всего, с возможностями замены отдельных хромосом у растений или добавления новых. Её применение оправдано, когда нужно подправить отдельные признаки, а не реконструировать весь организм, комбинируя в процессе гибридизации тысячи генов.

**Методы
хромосомной
инженерии**

Получение полиплоидов

Метод дополненных линий

Метод замещённых линий

Метод гаплоидов

Природная геномная и хромосомная инженерия создала полиплоидные комплексы видов растений.

При этом в ходе видообразования нередко объединялись несколько геномов, в результате чего предком нового вида становилось несколько ранее существовавших видов (виды пшеницы, виды хлопчатника).

5.1

Известно, что в клетках каждого диплоидного организма имеются пары гомологичных хромосом. Такой организм называют **дисомиком**.

Если в какой-либо паре хромосом остается одна гомологичная хромосома, то получается **моносомик**.

При добавлении третьей гомологичной хромосомы возникает **трисомик**, а при отсутствии в геноме одной пары гомологичных хромосом возникает **нуллисомик**.

*В хромосомной инженерии манипуляции с хромосомами дают возможность **заменять (замещать)** одну или обе гомологичные хромосомы, допустим, одного сорта пшеницы на ту же пару хромосом, но из другого сорта.*

Что это дает селекционеру? Тем самым он может один признак, который ему кажется слабым у данного сорта, заменить на этот же, но более сильный признак из другого сорта. Таким образом он приближается к созданию «идеального» сорта, у которого все полезные признаки будут выражены в максимальной степени.

5.1

Эту же цель преследует и методика замены отдельных хромосом одного вида на хромосомы другого вида, близкого по своему происхождению.

- *В литературе принято вместо слов «замена хромосом» употреблять «замещение хромосом». Поэтому полученные таким путем формы называются **замещенными линиями.***

Другой методический прием хромосомной инженерии состоит не в замещении в геноме каких-либо хромосом, а во введении (внедрении) в геном определенного вида или сорта какой-либо **дополнительной** пары хромосом другого вида растений, которые определяют развитие признака, отсутствующего у первого вида. *Если такое введение пары дополнительных хромосом удастся осуществить, то полученные формы называют **дополненными линиями.***

5.1

Примером геномной инженерии является

создание нового рода культурных злаков – **тритикале**.

Получена эта культура путём отдалённой гибридизации

- пшеницы (мягкой или твёрдой) и ржи с последующим удвоением хромосомного набора стерильного по своей природе гибрида первого поколения.

Мягкая пшеница
Triticum aestivum
($2n=42$)

×

Рожь
Secale cereale
($2n=14$)

$F_1(21 + 7 = 28)$
удвоение числа хромосом
путем колхицинирования

↓
Triticale
($2n=56$)

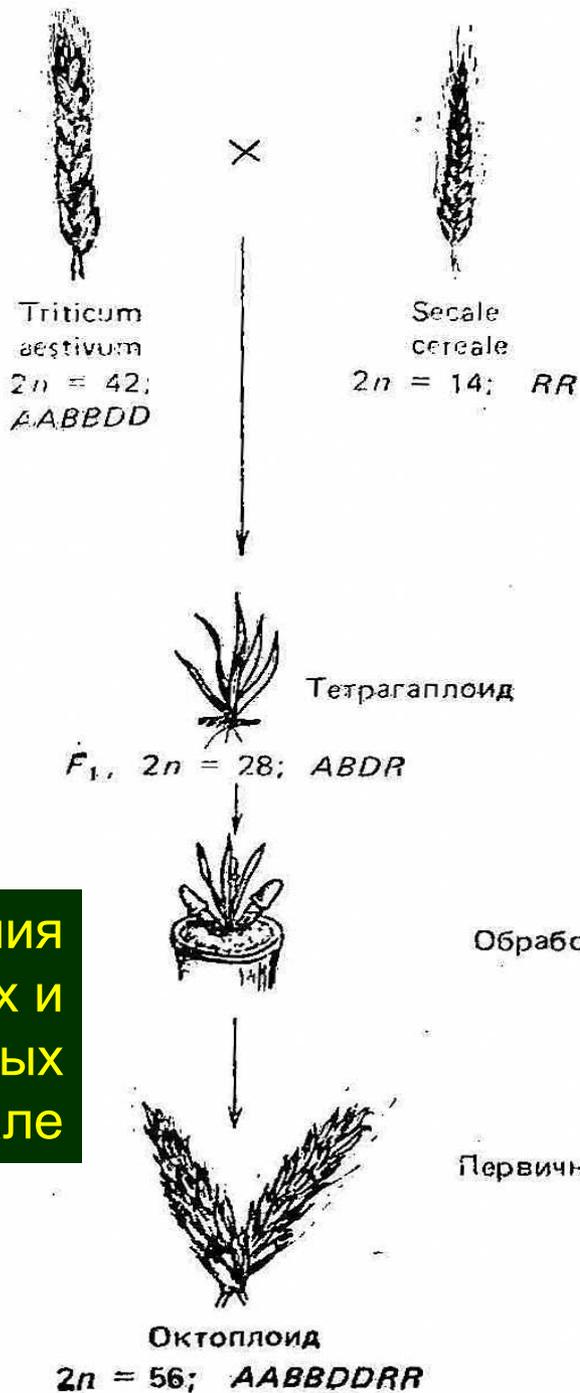


Схема получения октоплоидных и гексаплоидных форм тритикале

5.1

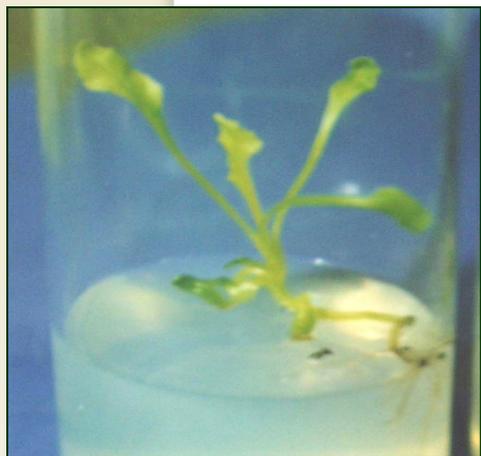
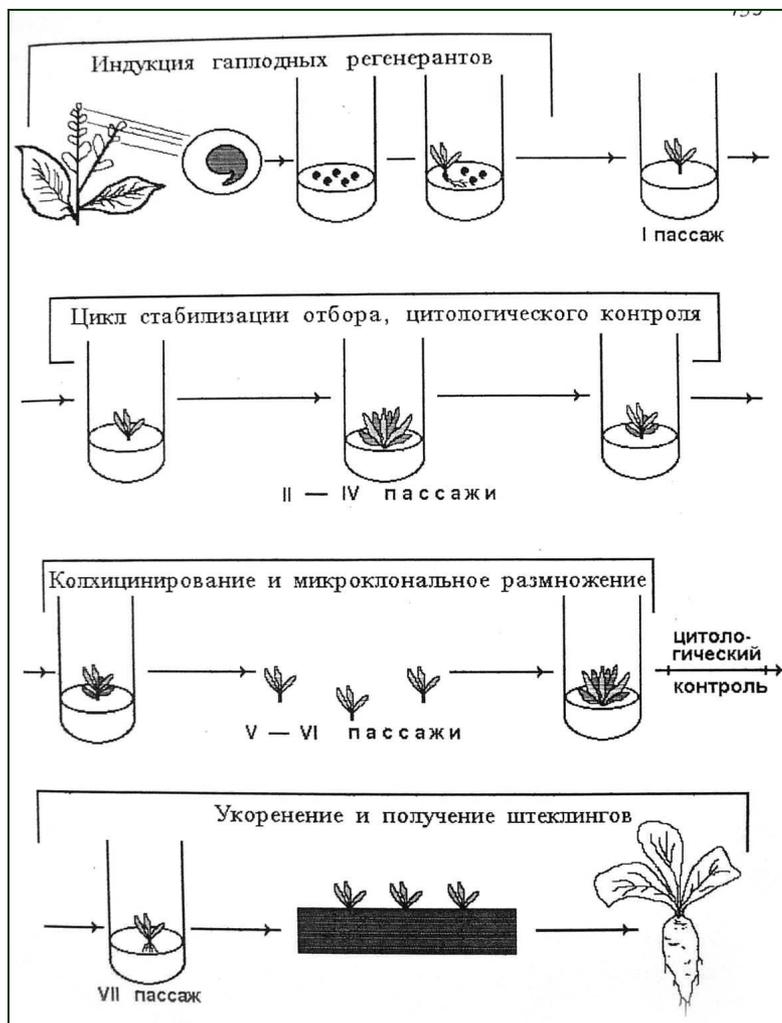
В хромосомной инженерии очень перспективен **метод гаплоидов**, основанный на выращивании гаплоидных растений с последующим удвоением хромосом.

Применение метода культуры клеток позволило осуществить регенерацию растений из генеративных клеток, содержащих гаплоидный набор хромосом.

Стало возможным массовое получение гаплоидов.

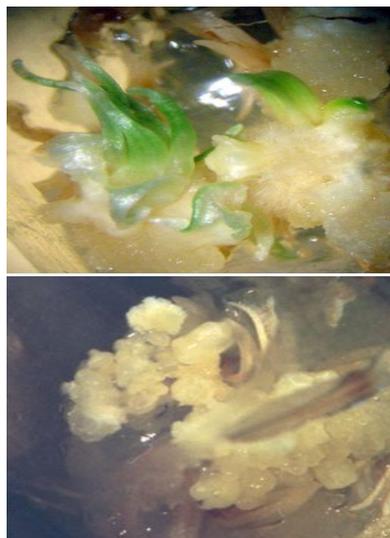
*Практическое значение в селекции в настоящее время получили культура пыльников (**андрогенез**), завязей и семяпочек (**гиногенез**) и метод гаплопродюсера, который является разновидностью гиногенеза.*

Метод культуры клеток позволяет получать гомозиготный материал из обогащенных в генетическом отношении гибридов без многократного самоопыления за 2 - 3 года вместо 8 - 10 лет при традиционной селекции



Метод позволяет получать гомозиготный материал из обогащенных в генетическом отношении гибридов без многократного самоопыления за 2 - 3 года вместо 8 - 10 лет при традиционной селекции

1. Отбор донорных растений и культивирование пыльников на среде с 2,4 - Д



2. Получение гаплоидных новообразований (эмбриоидов и каллусов)



3. Регенерация гаплоидных растений



4. Удвоение числа хромосом колхицином у регенерантов



5. Размножение семян для последующего селекционного изучения

ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ: создано более 15 тысяч гомозиготных линий пшеницы, ячменя, тритикале и проса. Создан допущенный к использованию сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 64. Передан на Государственное сортоиспытание сорт озимой гексаплоидной тритикале Святозар.

2. Генная инженерия

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, или технология рекомбинантных ДНК — это изменение с помощью биохимических и генетических методик хромосомного материала — основного наследственного вещества клеток.

Хромосомный материал состоит из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Биологи изолируют те или иные участки ДНК, соединяют их в новых комбинациях и переносят из одной клетки в другую.

В результате удается осуществить такие изменения генома, которые естественным путем вряд ли могли бы возникнуть.

Генетическая инженерия (генная инженерия) — совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле, но является инструментом биотехнологии, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, цитология, генетика, микробиология, вирусология.



Под генной инженерией обычно понимают **искусственный перенос** нужных генов от одного вида живых организмов (бактерий, животных, растений) в другой вид, часто очень далекий по своему происхождению.

Это технология получения новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства.

*Растения и животные, геном которых изменен в результате таких генно-инженерных операций, получили название **трансгенных растений** или животных.*

5.2

Генная инженерия – это отрасль молекулярной биологии и генетики, целью которой является получение с помощью лабораторных приемов организмов с новыми, не встречающимися в природе, комбинациями генов.

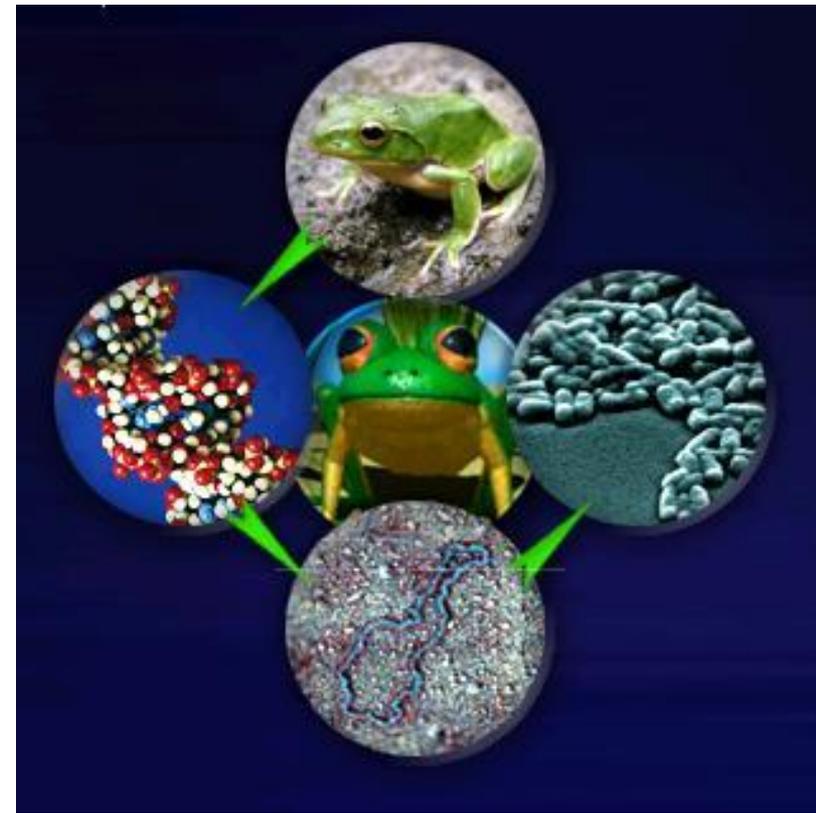
В основе генной инженерии лежит возможность целенаправленного манипулирования с фрагментами нуклеиновых кислот.

Эти эксперименты стали возможными благодаря:

- установлению универсальности генетического кода;
- успехам генетической энзимологии, которая предоставила набор ферментов, позволяющих получать в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот и объединять их информации.

Генная инженерия основана на получении гибридных молекул ДНК и введении этих молекул в клетки других организмов, а также на молекулярно-биологических, иммунохимических и биохимических методах.

Генная инженерия начала развиваться с 1973 года. Тогда американские исследователи Стэнли Коэн и Энли Чанг встроили бактериальную плазмиду в ДНК лягушки, затем эту трансформированную плазмиду вернули в клетку бактерии, которая стала синтезировать белки лягушки, а также передавать лягушачью ДНК своим потомкам. Так был найден метод, позволяющий встраивать чужеродные гены в геном определенного организма.

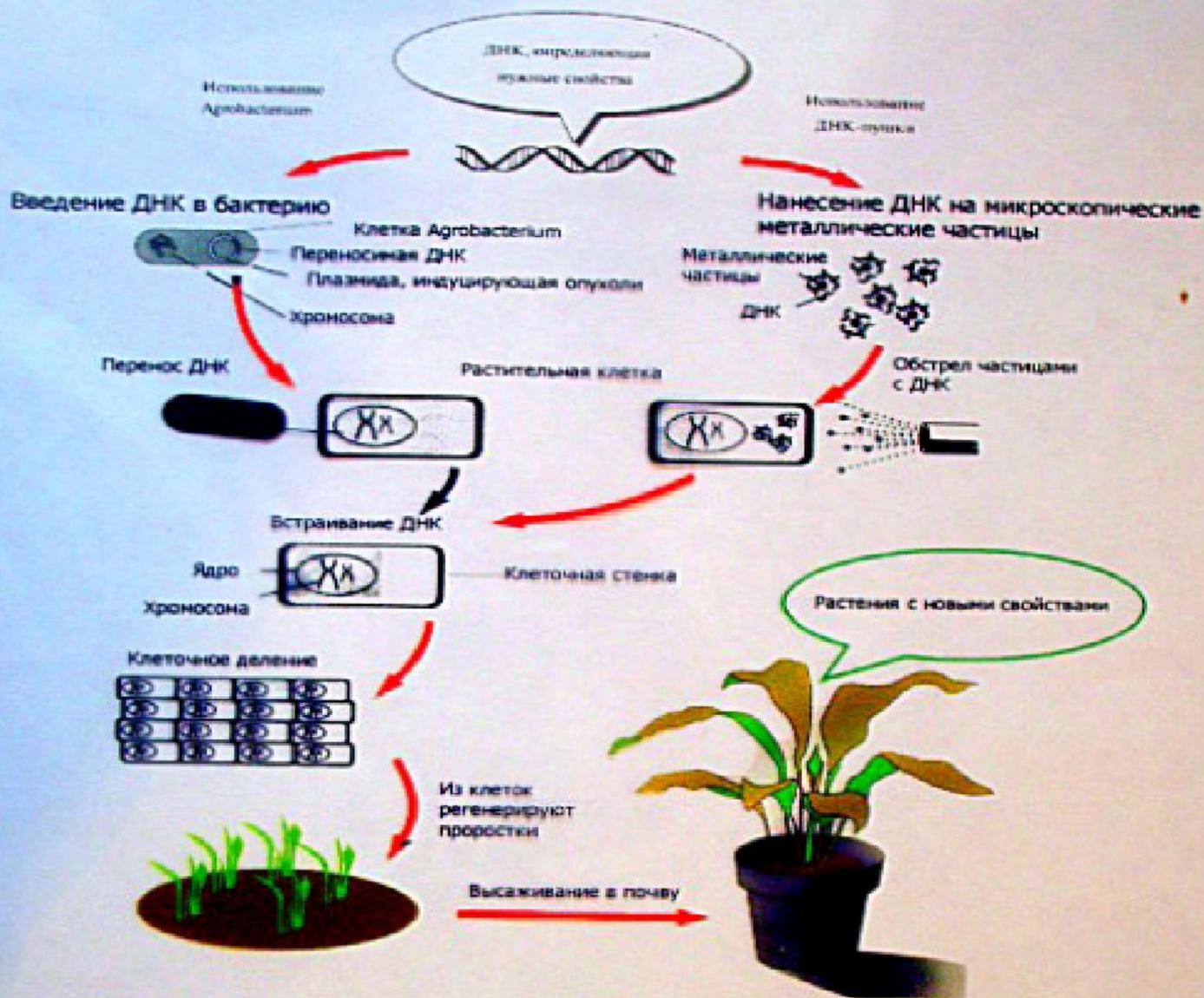


На сегодняшний день почти все трансгенные растения получены с использованием плазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* — на основе схемы так называемого **агробактериального переноса**.

Однако эта схема эффективна лишь для двудольных растений.

Для однодольных, в основном злаковых растений, разработаны другие способы переноса генетических конструкций.

Из них чаще используется **баллистический** с помощью установки под названиями "генная пушка", или "дробовик": на микрочастицы золота или вольфрама помещают ДНК-векторы и под давлением "выстреливают" в растительные клетки.



Два основных метода создания трансгенных растений.

5.2

Чтобы осуществить перенос генов (т.е. **трансгенез**), необходимо выполнить следующие сложные операции:

- выделение из клеток бактерий, животных или растений тех генов, которые намечены для переноса. Иногда эту операцию заменяют искусственным синтезом нужных генов, если таковой оказывается возможным;
- **создание специальных генетических конструкций (векторов), в составе которых намеченные гены будут внедряться в геном другого вида. Такие конструкции кроме самого гена должны содержать всё необходимое для управления его работой (промоторы, терминаторы) и гены-«репортеры», которые будут сообщать, что перенос успешно осуществлен;**
- внедрение генетических векторов сначала в клетку, а затем в геном другого вида и выращивание измененных клеток в целые организмы (регенерация).

Общая схема генно-инженерной программы:



В качестве *донора* или *реципиента* может быть использована любая клетка - клетка растения, животного или микроорганизма.

Вектор – молекула ДНК, способная к автономной репликации, имеющая регуляторные гены, обеспечивающие экспрессию трансгена. Это своеобразное молекулярное такси, способное самостоятельно проникать в клетку-мишень, встраиваться в ДНК и в ней реплицироваться. В качестве вектора используют ДНК фага или бактериальные плазмиды.

Трансген – ген, внедряемый в реципиентный геном.

Векторы ДНК – это небольшие молекулы ДНК, способные проникать в другие клетки и реплицироваться в них.

В состав вектора ДНК входит не менее трех групп генов:

1. Целевые гены, которые интересуют экспериментатора.
2. Гены, отвечающие за репликацию вектора, его интеграцию в ДНК клетки-хозяина и экспрессию требуемых генов.
3. Гены-маркеры (селективные, репортерные гены), по деятельности которых можно судить об успешности трансформации (например, гены устойчивости к антибиотикам или гены, отвечающие за синтез белков, светящихся в ультрафиолетовом свете).

5.2

В качестве вектора обычно используют бактериальную плазмиду, бактериофаг (вирус бактерий), вирус растений или животных.

Вектор должен содержать все необходимое для управления работой этого гена:

- ✓ *промотор* - участок ДНК, предназначенный для присоединения РНК-полимеразы, без которой не проходит транскрипция ДНК;
- ✓ *терминатор* - участок ДНК, ограничивающий ген;
- ✓ *ген-оператор* - ген, включающий работу трансгена;
- ✓ *ген-регулятор* - ген, ограничивающий избыточный синтез белка трансгена.

Кроме того, вектор должен содержать маркерные гены, которые придают клетке-реципиенту новые свойства, позволяющие отличить эту клетку от исходных клеток. Интеграция ДНК из разных источников в единой молекуле приводит к появлению нового источника информации - **рекомбинантной ДНК**.

Основные этапы решения генноинженерной задачи следующие:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в **вектор** для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.



Эти этапы могут быть представлены несколько иначе:

- ✓ Выделение и идентификация отдельных генов (соответствующих фрагментов ДНК или РНК)
- ✓ Получение генетических конструкций путем манипуляций с нуклеиновыми кислотами *in vitro*
- ✓ Создание векторных систем для переноса трансгенов в клетки
- ✓ Перенос трансгенов в отдельные живые клетки, где они могут реплицироваться и передаваться дочерним клеткам
- ✓ Получение из трансформированных клеток ГМО

Процесс синтеза генов в настоящее время разработан очень хорошо и даже в значительной степени автоматизирован. Существуют специальные аппараты, снабжённые ЭВМ, в памяти которых закладывают программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей. Такой аппарат синтезирует отрезки ДНК длиной до 100—120 азотистых оснований (олигонуклеотиды).

Новые гены могут быть получены:

- *выделением из ДНК*
- *химико-ферментным синтезом*
- *ферментным синтезом*

5.2

Получила распространение техника, позволяющая использовать для синтеза ДНК, в том числе мутантной, **полимеразную цепную реакцию (ПЦР)**.

Термостабильный фермент, ДНК-полимераза, используется в ней для матричного синтеза ДНК, в качестве затравки которого применяют искусственно синтезированные кусочки нуклеиновой кислоты — олигонуклеотиды. Фермент обратная транскриптаза позволяет с использованием таких затравок (праймеров) синтезировать ДНК на матрице выделенной из клеток РНК. Синтезированная таким способом ДНК называется комплементарной (РНК) или кДНК.

Изолированный, «химически чистый» ген может быть также получен из фаговой библиотеки. Так называется препарат бактериофага, в геном которого встроены случайные фрагменты из генома или кДНК, воспроизводимые фагом вместе со всей своей ДНК.

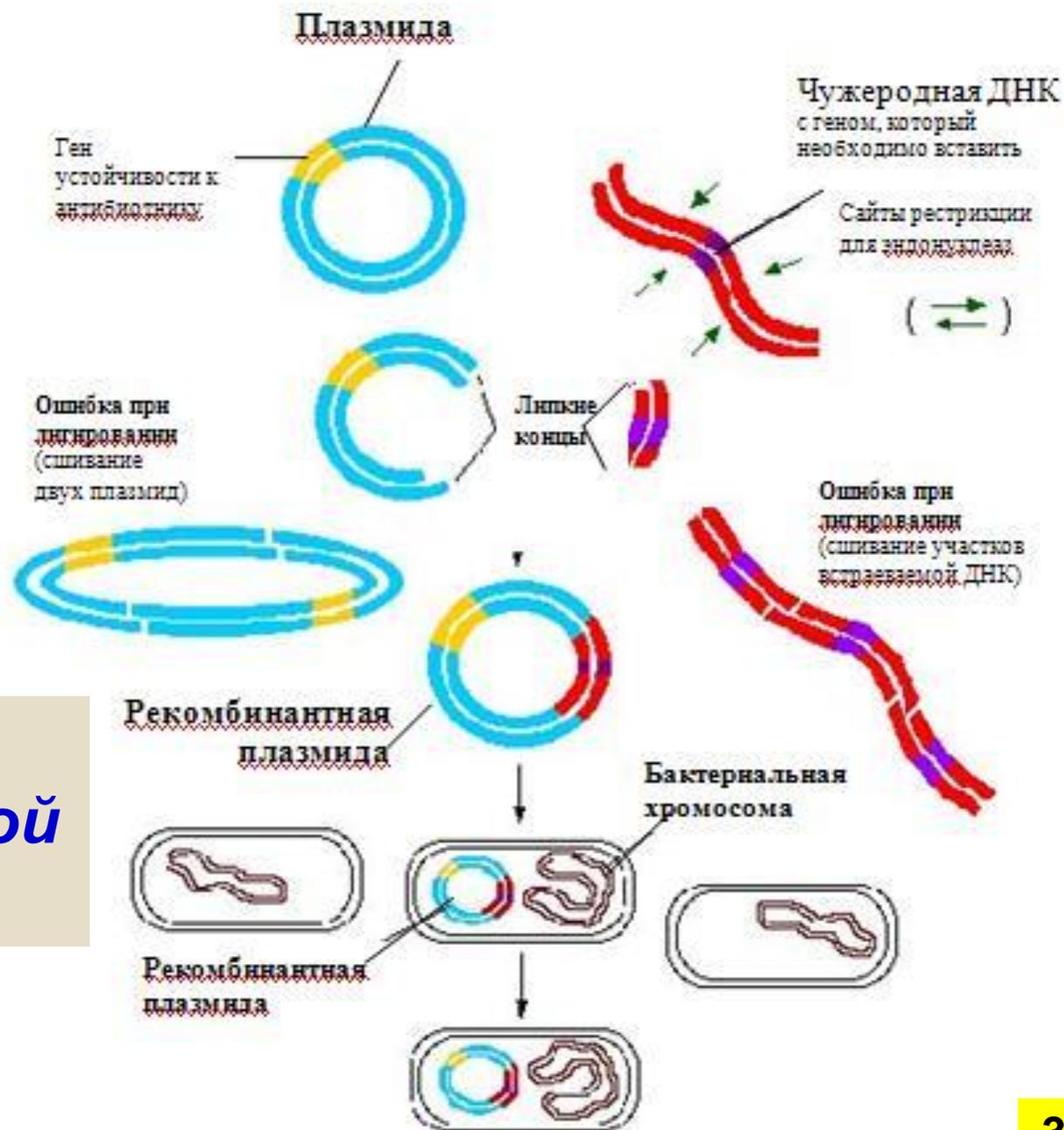
Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты — рестриктазы и лигазы, также являющиеся полезным инструментом генной инженерии.

С помощью **рестриктаз** ген и вектор можно разрезать на кусочки.

С помощью **лигаз** такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор.

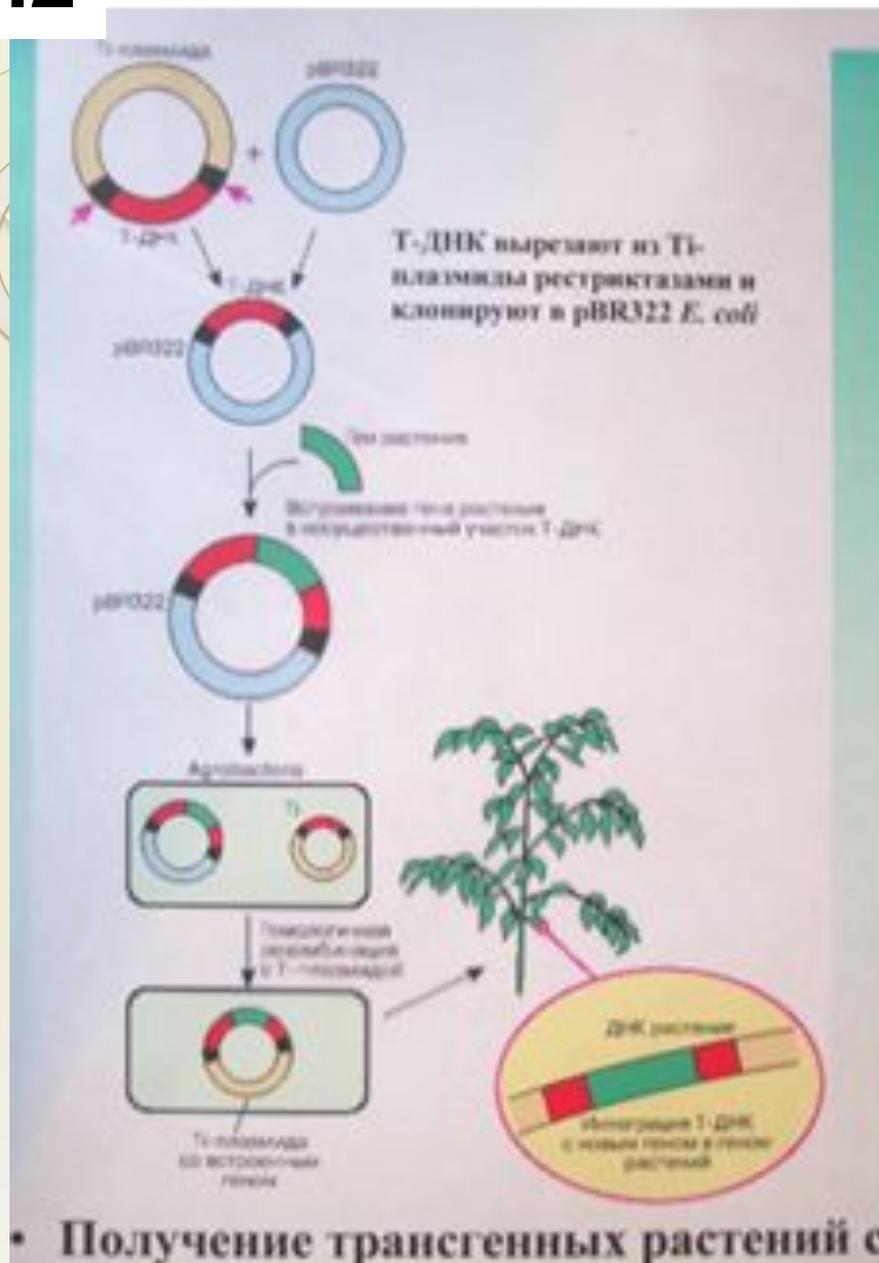
Техника введения генов в бактерии была разработана после того, как было открыто явление *бактериальной трансформации*. В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК — **плазмидами**. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки.

5.2



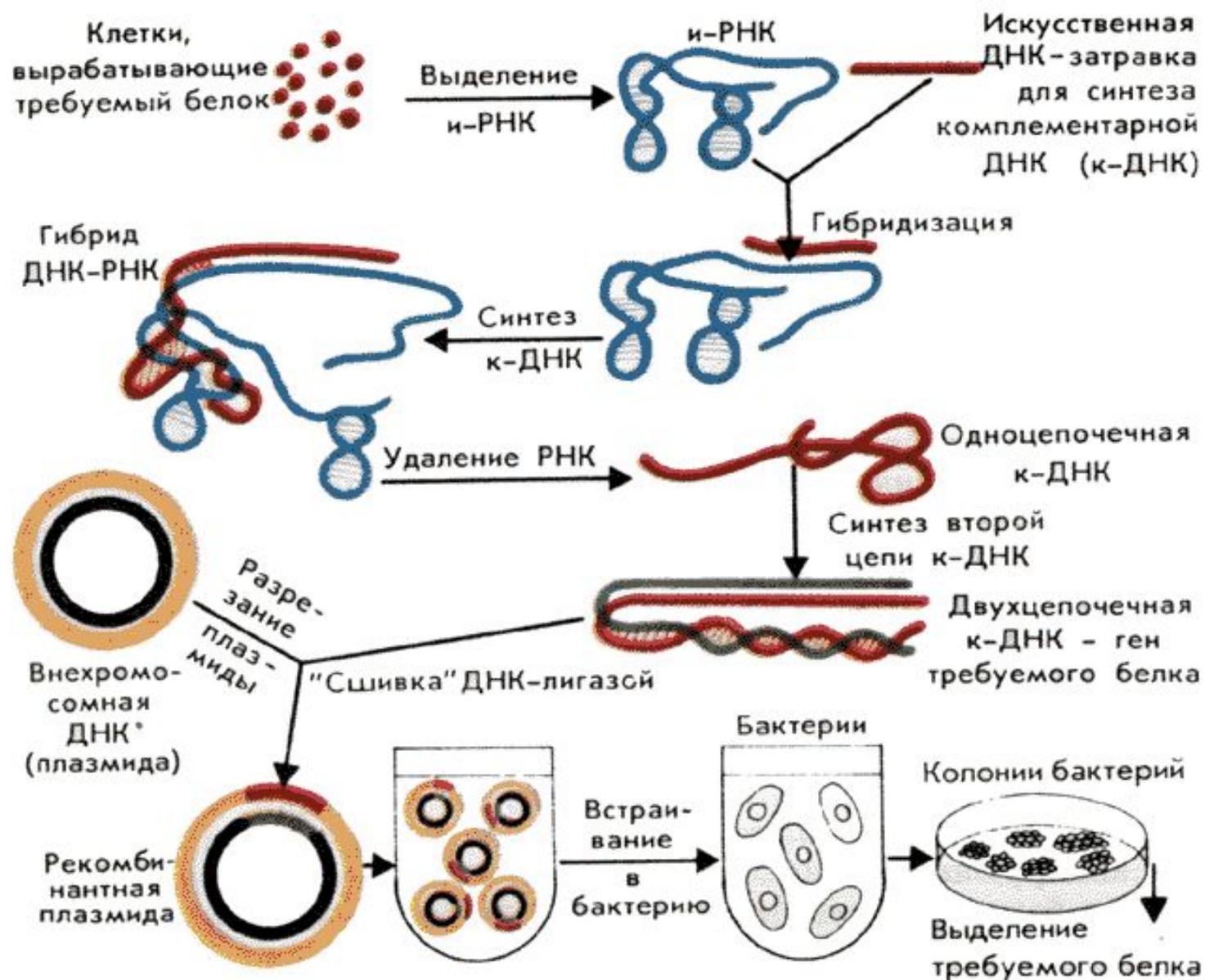
Создание рекомбинантной плазмиды

5.2

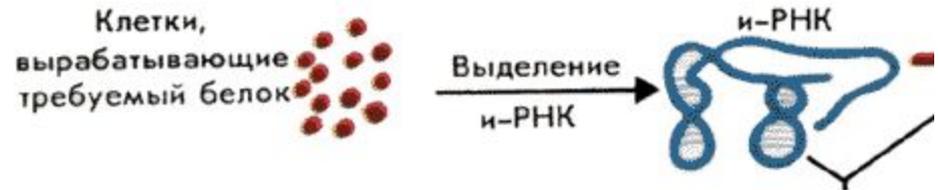


- Выделение генов (отдельных фрагментов ДНК) из клеток бактерий, растений или животных.
- Соединение (сшивание) отдельных фрагментов ДНК любого происхождения в единую молекулу в составе плазмиды;
- Введение гибридной плазмидной ДНК, содержащей нужный ген, в клетки хозяина;
- Копирование (клонирование) этого гена в новом хозяине с обеспечением его работы.

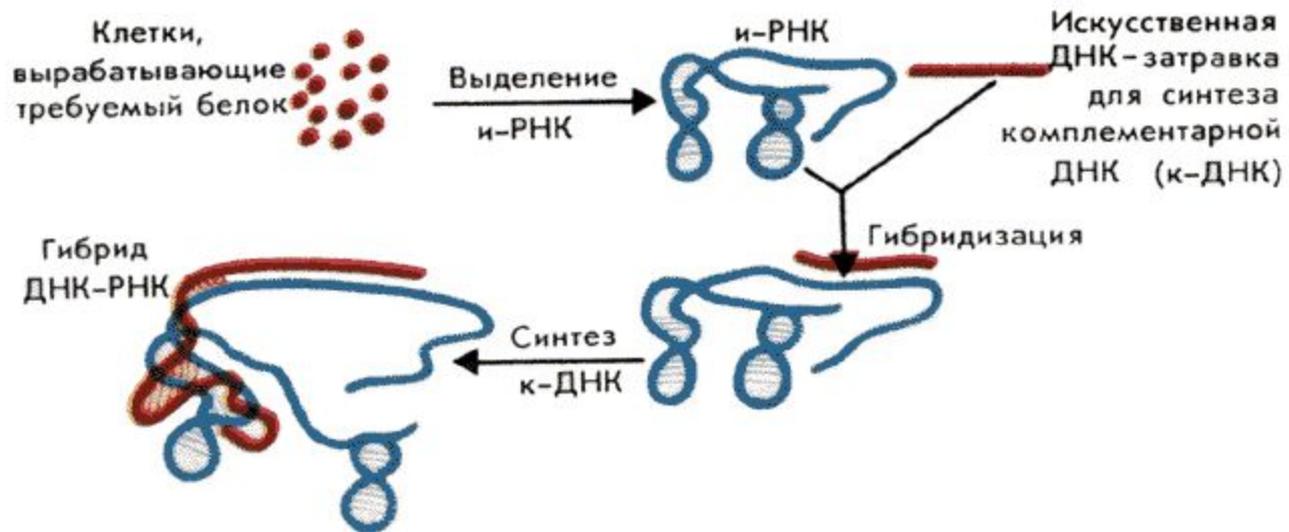
Схема получения гена, кодирующего нужный в производстве белок



На первом этапе из клеток выделяют и-РНК.



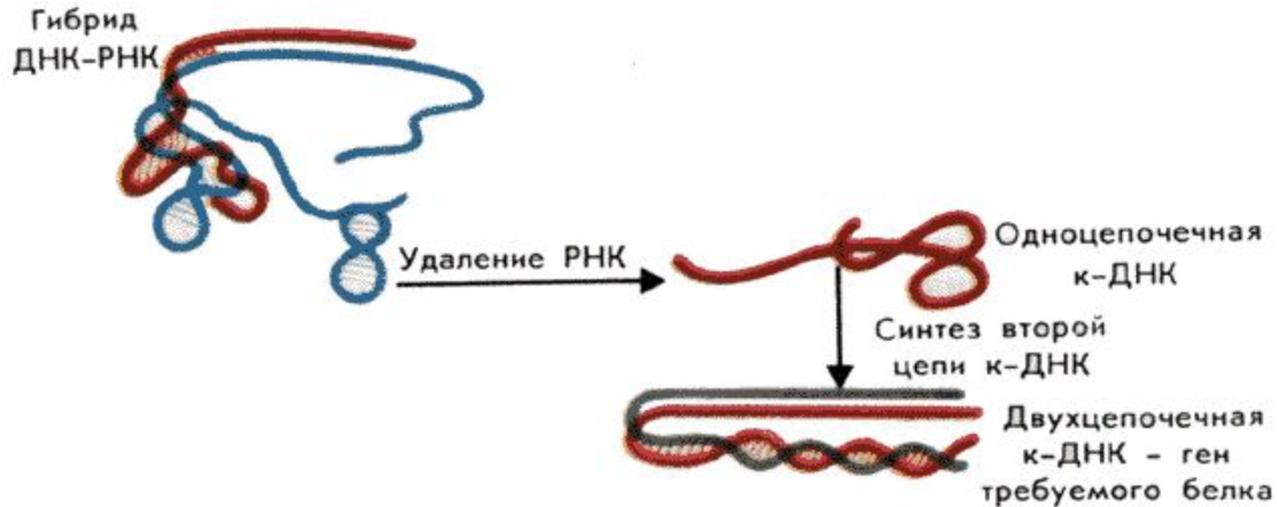
Затем на ней, как на матрице, синтезируют нить комплементарной ей ДНК (к-ДНК). Благодаря этому получается гибридная ДНК-РНК-молекула.



5.2

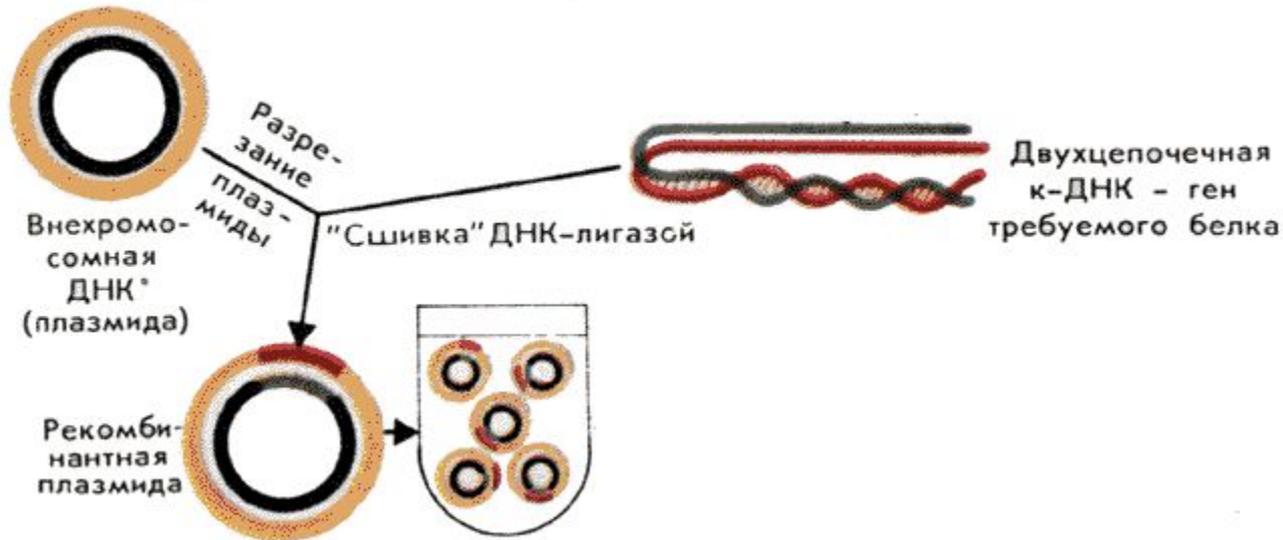
После удаления РНК из этой молекулы на оставшейся одноцепочечной ДНК осуществляют синтез второй нити.

В результате возникает полноценная молекула ДНК.



5.2

Используя специальные ферменты, ее встраивают в кольцевую ДНК плазмид (внехромосомных молекул ДНК), которые выполняют роль переносчика нужного гена.



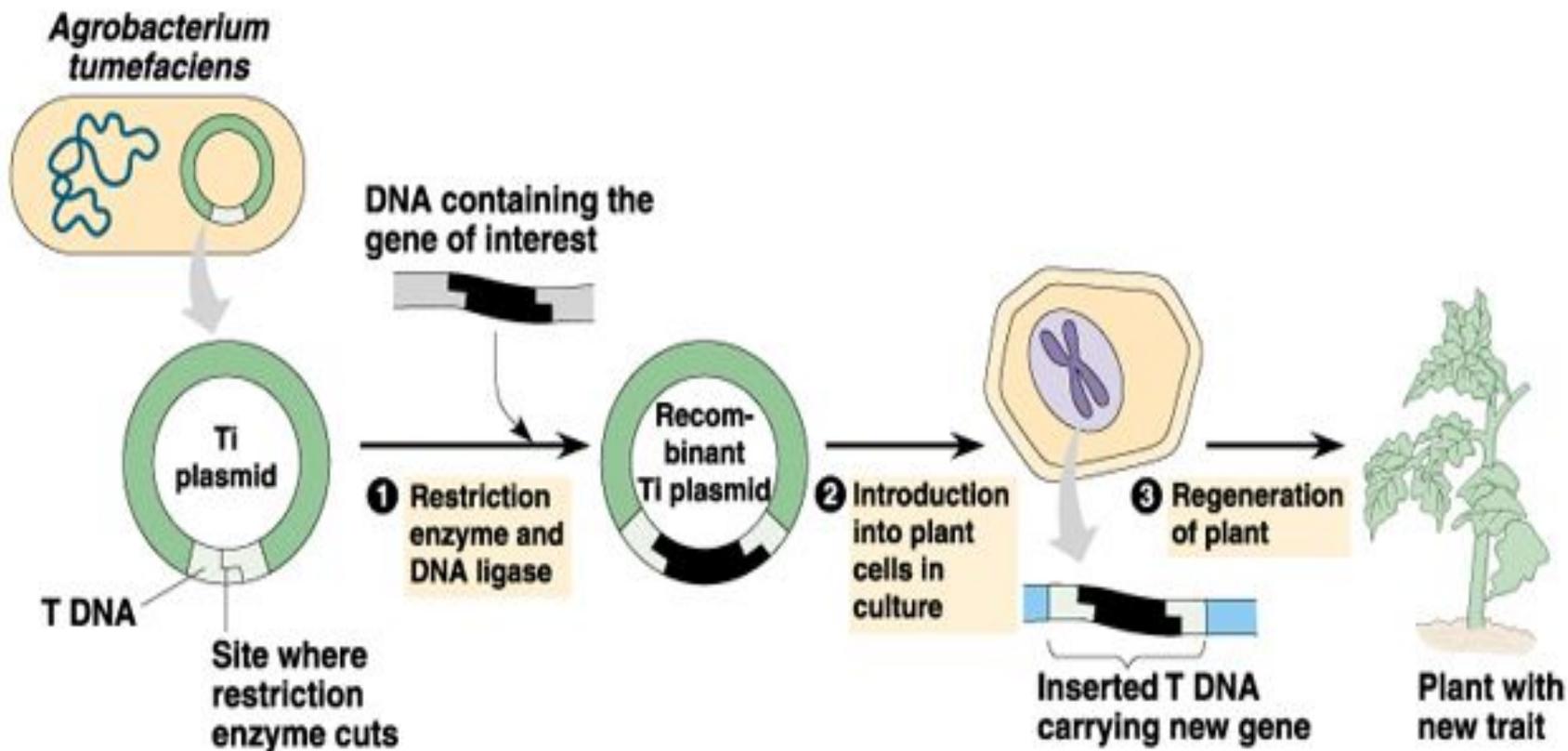
На последнем этапе плазмиды со вставкой встраиваются в бактериальную хромосому.

- В ней перенесенный ген человека, животного, растения или другого микроорганизма начинает работать, и в бактериальной клетке накапливается необходимый белок, остается лишь выделить его из бактериальной массы. Такие бактерии размножают в промышленных масштабах и получают необходимый белок в больших количествах.



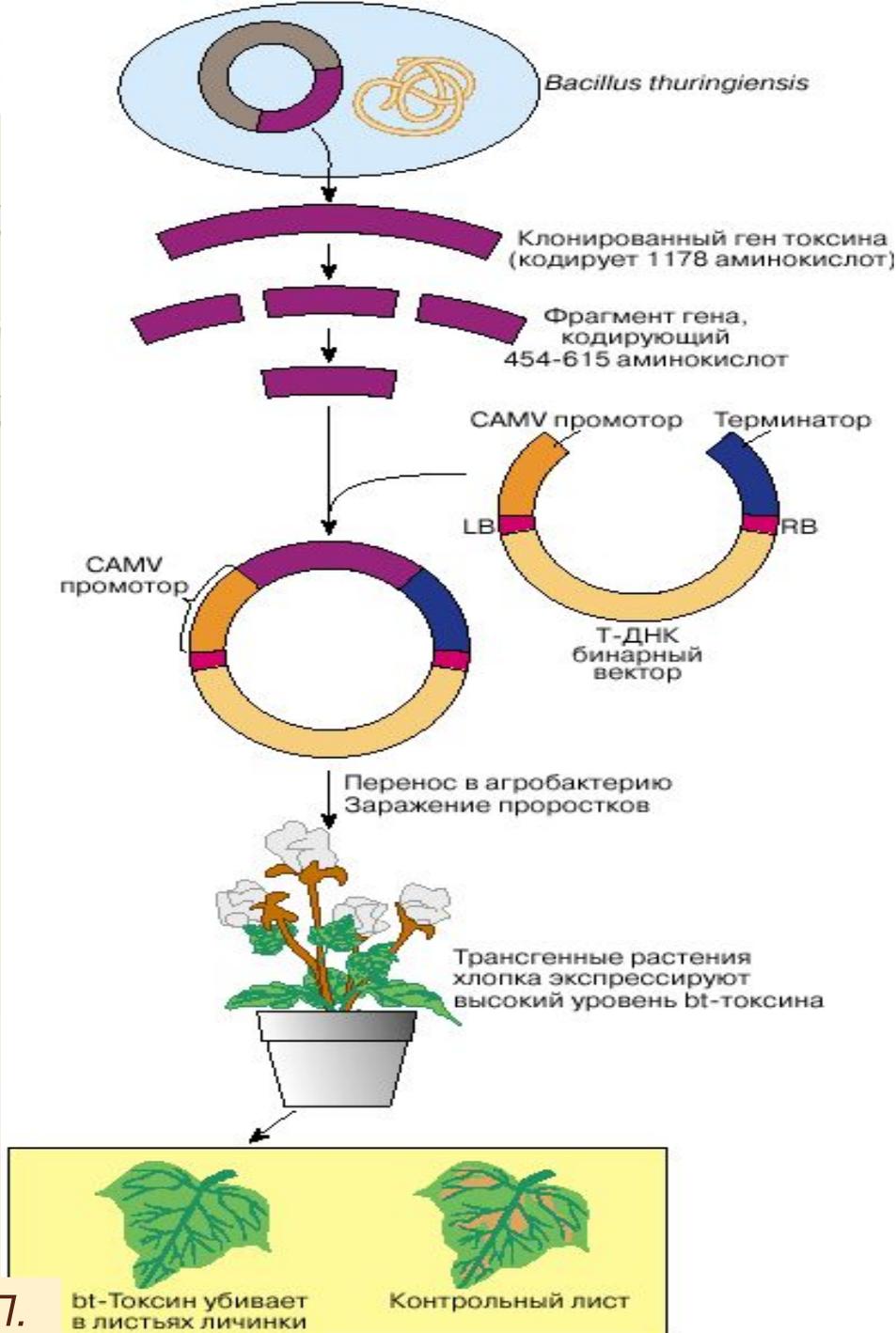
5.2

Из бактерии *Bacillus thuringiensis* выделили ген эндотоксина, разрушающего пищеварительную систему насекомых. Ввели этот ген в плазмиду почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Далее методами культивирования растений *in vitro* получили трансгенные растения, устойчивые к повреждающему действию личинок насекомых-вредителей – формы картофеля, томатов, табака, рапса, устойчивые к разнообразным вредителям.



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

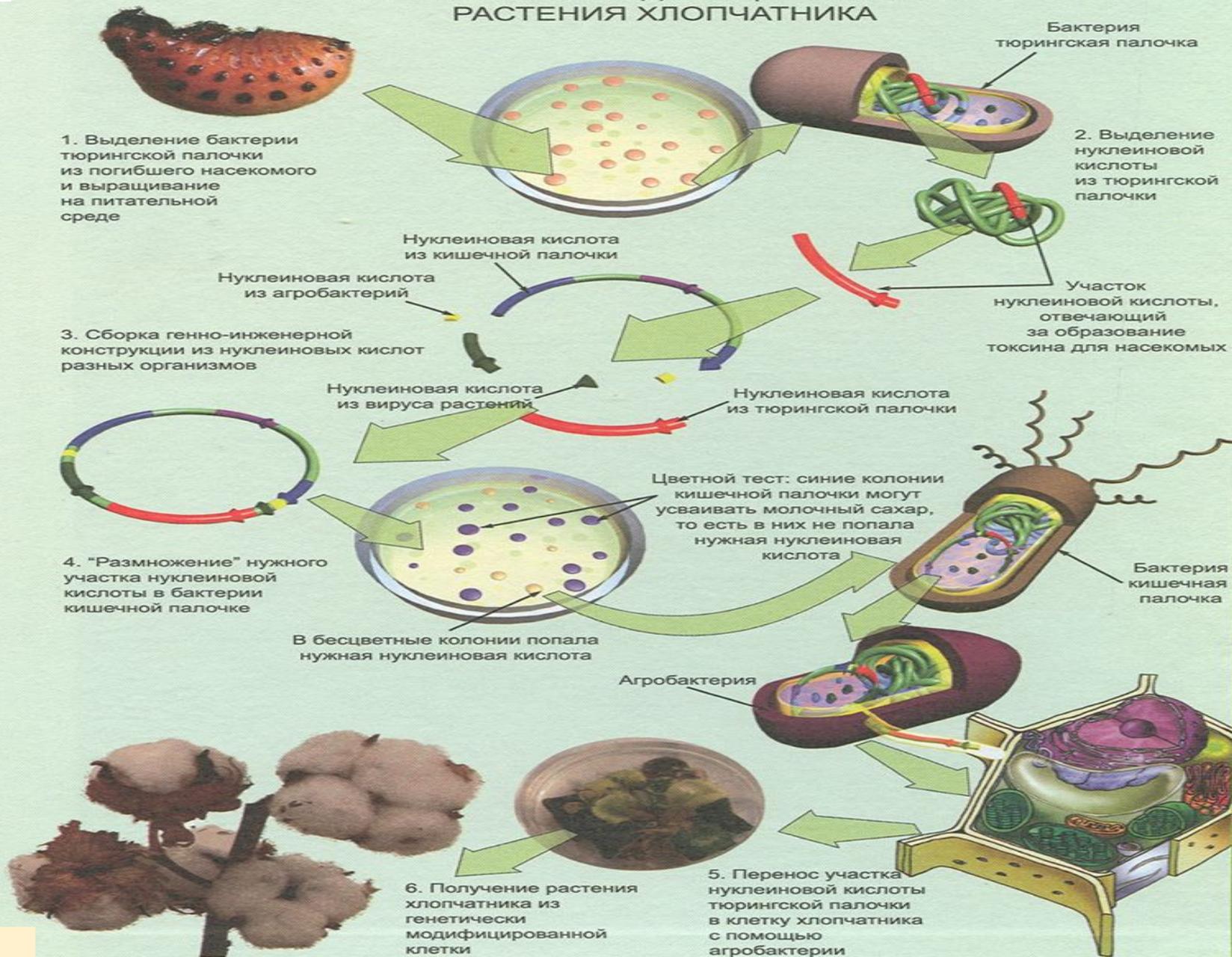
5.2



Получение трансгенных растений хлопка с геном *bt*, несущим устойчивость к насекомым.

Ген *bt* (*Bacillus thuringiensis*) кодирует 1178 аминокислот и локализован в бактерии на плазмиде. Показано получение фрагмента гена *bt*, достаточного для устойчивости растений к насекомым. Дана схема встраивания этого фрагмента в Т-ДНК вектор между LB (левой) и RB (правой) его границами. В векторе был использован также удвоенный промотор CAMV, который увеличивал экспрессию *bt*-гена в пять раз. Растения хлопка были трансформированы этим вектором через агробактериальную инфекцию. Трансгенные растения оказались устойчивыми к личинкам большого числа видов насекомых.

СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО РАСТЕНИЯ ХЛОПЧАТНИКА



Во всех рассмотренных примерах
хорошо видны основные этапы получения
геномодифицированных растений

1. Получение стерильной культуры растений *in vitro*.
2. Доставка трансгена в клетку-мишень, встраивание чужеродного гена в геном растения.
3. Клеточная селекция трансформированных клеток и их визуальная идентификация с использованием люминесцирующих маркеров.
4. Индукция регенерации трансгенных растений.
5. Адаптация пробирочных растений к условиям теплицы.
6. ПЦР-идентификация трансгенов с целью определения числа копий чужеродного гена в геноме реципиента.
7. Отбор трансформантов с высокой экспрессией трансгена и с наименьшими отклонениями от типичного фенотипа.
8. Полевые испытания и испытания на безопасность.

Использование генной инженерии создаёт определённые проблемы. Ниже перечислены основные из них:

1. Генная инженерия в корне отличается от выведения новых сортов и пород. Искусственное добавление чужеродных генов сильно нарушает точно отрегулированный генетический контроль нормальной клетки. Манипулирование генами коренным образом отличается от комбинирования материнских и отцовских хромосом, которое происходит при естественном скрещивании.
2. В настоящее время генная инженерия технически несовершенна, так как она не в состоянии управлять процессом встраивания нового гена. Поэтому невозможно предвидеть место встраивания и эффекты добавленного гена. Даже в том случае, если местоположение гена окажется возможным установить после его встраивания в геном, имеющиеся сведения о ДНК очень неполны для того, чтобы предсказать результаты.

5.2

3. В результате искусственного добавления чужеродного гена непредвиденно могут образоваться опасные вещества. В худшем случае это могут быть токсические вещества, аллергены или другие вредные для здоровья вещества. Сведения о подобного рода возможностях ещё очень неполны.
4. Не существует совершенно надёжных методов проверки на безвредность. Более 10% серьёзных побочных эффектов новых лекарств не возможно выявить несмотря на тщательно проводимые исследования на безвредность. Степень риска того, что опасные свойства новых, модифицированных с помощью генной инженерии продуктов питания, останутся незамеченными, вероятно, значительно больше, чем в случае лекарств.
5. Существующие в настоящее время требования по проверке на безвредность крайне недостаточны. Они совершенно явно составлены таким образом, чтобы упростить процедуру утверждения. Они позволяют использовать крайне нечувствительные методы проверки на безвредность. Поэтому существует значительный риск того, что опасные для здоровья продукты питания смогут пройти проверку незамеченными.

6. Созданные до настоящего времени с помощью генной инженерии продукты питания не имеют сколько-нибудь значительной ценности для человечества. Эти продукты удовлетворяют, главным образом, лишь коммерческие интересы.
7. Знания о действии на окружающую среду модифицированных с помощью генной инженерии организмов, привнесённых туда, совершенно недостаточны. Не доказано ещё, что модифицированные с помощью генной инженерии организмы не окажут вредного воздействия на окружающую среду. Экологами высказаны предположения о различных потенциальных экологических осложнениях. Например, имеется много возможностей для неконтролируемого распространения потенциально опасных генов, используемых генной инженерией, в том числе передача генов бактериями и вирусами. Осложнения, вызванные в окружающей среде, вероятно, невозможно будет исправить, так как выпущенные гены невозможно взять обратно.

8. Могут возникнуть новые и опасные вирусы. Экспериментально показано, что встроенные в геном гены вирусов могут соединяться с генами инфекционных вирусов (так называемая рекомбинация). Такие новые вирусы могут быть более агрессивными, чем исходные. Вирусы могут стать также менее видоспецифичными. Например, вирусы растений могут стать вредными для полезных насекомых, животных, а также людей.

9. Знания о наследственном веществе, ДНК, очень неполны. Известно о функции лишь трёх процентов ДНК. рискованно манипулировать сложными системами, знания о которых неполны. Обширный опыт в области биологии, экологии и медицины показывает, что это может вызвать серьёзные непредсказуемые проблемы и расстройства.

10. Генная инженерия не поможет решить проблему голода в мире. Утверждение, что генная инженерия может внести существенный вклад в разрешение проблемы голода в мире, является научно необоснованным мифом.

11. Геномодифицированные растения могут аккумулировать гербициды и пестициды, к которым они устойчивы, что опасно не только для потребителей ГМ-растений, но и для агроценоза.

Риски от использования генетически модифицированных сельскохозяйственных культур и продуктов питания из этих растений можно разделить на три группы:

- 1. риски для здоровья людей,**
- 2. риски для окружающей среды,**
- 3. социально-экономический риски (например, агротехнические).**

К пищевым рискам относят:

- 1) Непосредственное действие токсичных и аллергенных трансгенных белков ГМО.
- 2) Риски, опосредованные плейотропным действием трансгенных белков на метаболизм растений.
- 3) Риски, опосредованные накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах и видах сельскохозяйственных растений.
- 4) Риски горизонтального переноса трансгенных конструкций, в первую очередь в геном симбионтных для человека и животных бактерий.

- 1) Снижение генетического разнообразия возделываемых культур вследствие массового применения ГМО, полученных из ограниченного набора родительских сортов.
- 2) Неконтролируемый перенос генетических конструкций вследствие переопыления с дикорастущими родственными и предковыми видами культурных растений и в связи с этим снижение биоразнообразия дикорастущих предков и формирование «суперсорняков».
- 3) Неконтролируемый горизонтальный перенос конструкций в ризосферную микрофлору.
- 4) Негативное влияние на биоразнообразие через поражение токсичными трансгенными белками нецелевых насекомых и почвенной микрофлоры и нарушении трофических цепей.
- 5) Быстрое появление устойчивости к используемым трансгенным токсинам у насекомых-фитофагов, бактерий, грибов и других вредителей под действием их отбора на устойчивость.
- 6) Появление новых, более патогенных штаммов фитовирусов при взаимодействии фитовирусов с трансгенными конструкциями, проявляющими локальную нестабильность в геноме растения-хозяина.

Агротехнические риски:

- 1) Риски непредсказуемых изменений нецелевых свойств и признаков модифицированных сортов, связанные с плейотропным действием введенного гена. Например, снижение устойчивости к патогенам при хранении и устойчивости к критическим температурам при вегетации у сортов, устойчивых к насекомым-вредителям.
- 2) Риски отсроченного изменения свойств, через несколько поколений, связанные с адаптацией нового гена генома и с проявлением как новых плейотропных свойств, так и изменением уже декларированных.
- 3) Неэффективность трансгенной устойчивости к вредителям через несколько лет массового использования данного сорта.
- 4) Возможность использования производителями терминальных технологий для монополизации производства семенного материала.

Возможные пути решения проблемы безопасности
ГМОи продуктов из них:

1. Исключить прямое поступление трансгенных белков в пищу (например, использовать ферментную обработку протеазами перед включением в продукт)
2. Ограничить поступление генномодифицированного белка с продуктами питания для исключения нарушения обменных процессов в организме (особенно, для детей и пожилых людей).
3. Обеспечить контроль за содержанием пестицидов и гербицидов в растениях, в почвах, в водоемах.
4. Разработать тесты на устойчивость ГМ-систем.
5. Законодательно закрепить ответственность за распространение ГМО без оценки на биобезопасность.