



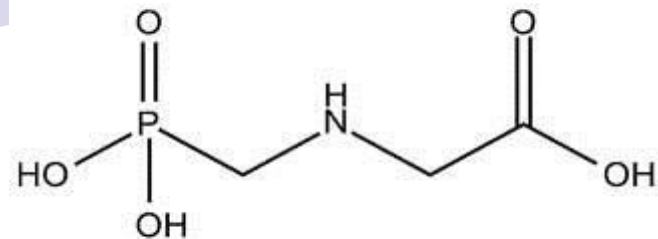
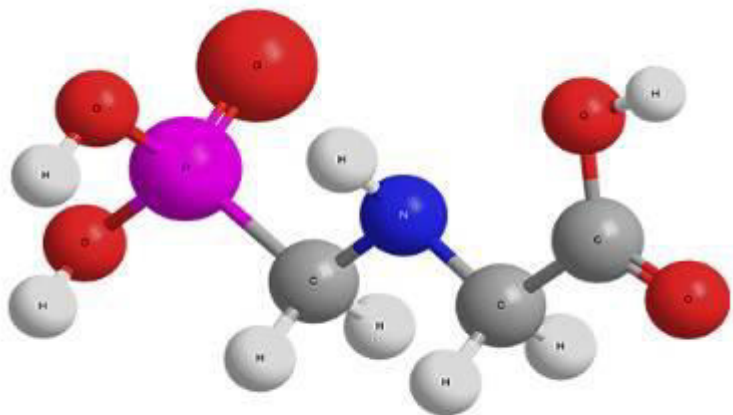
Создание трансгенных растений, устойчивых к глифосату

докладчик
н.с. Присяженко Ольга



*Кафедра молекулярной биологии
Биологического факультета
Белгосуниверситета*

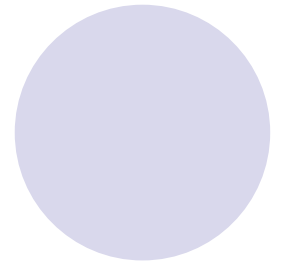
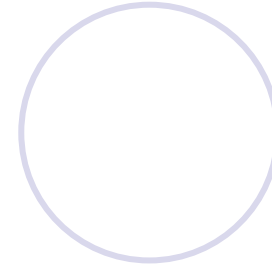
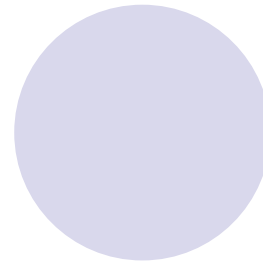
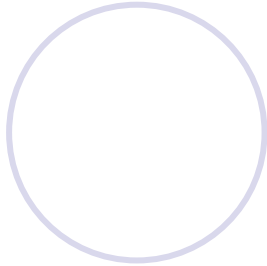
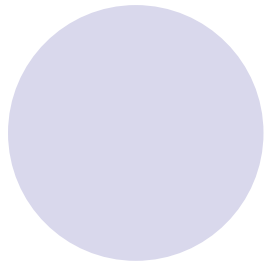
Глифосат [N-(фосфонометил)-глицин]



Препараты гербицидов на основе **глифосата**:

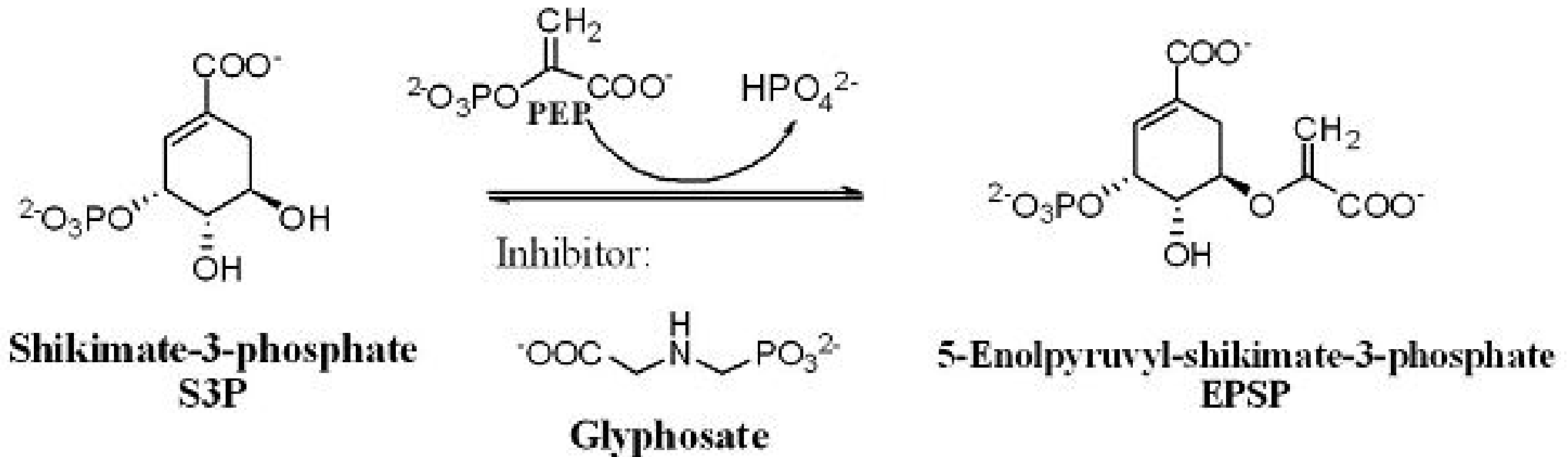


.. И многое другое...



● **Глифосат** ингибирует 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу (**EPSPS**)

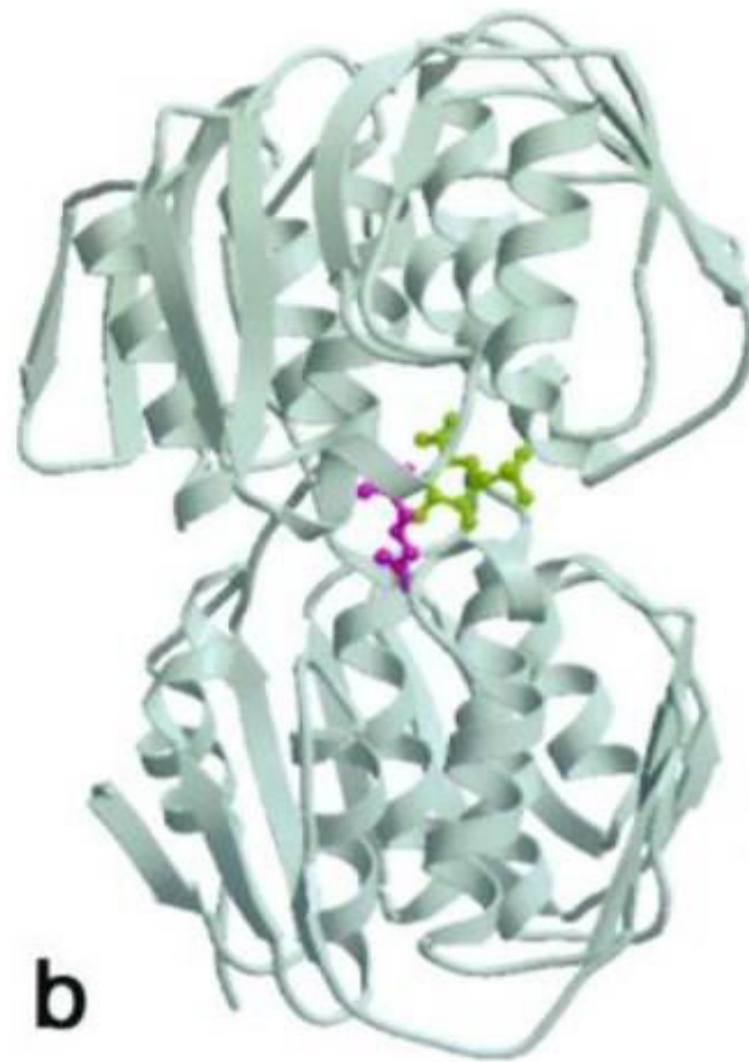
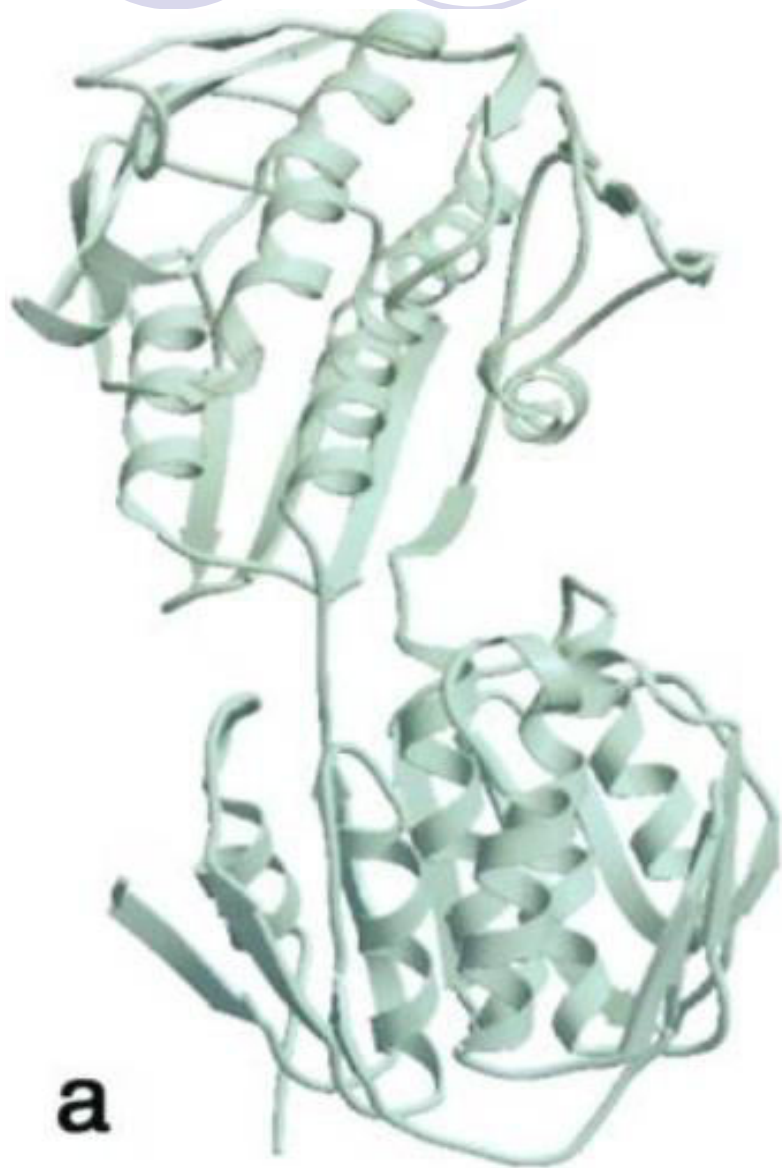
● **EPSPS** катализирует перенос енолпирувильного остатка с фосфоенолпирувата (PEP) на 5-гидроксильный остаток шикимат-3-фосфата (S3P)



3D модель фермента EPSPS

a - свободный белок;

b – белок с лигандами в активном центре (зеленым выделен **S3P**, малиновым – **глифосат**)



- ☉ Были клонированы гены EPSPS (*aroA*) из *E. coli* JM109 и *D. dadantii* ENA 49
- ☉ Экспрессия этих «диких» генов в клетках *E. coli* увеличила их устойчивость к глифосату в среде, причем ген из *D. dadantii* ENA 49 позволял бактериям выдерживать более высокую концентрацию гербицида (1 мМ), чем ген из *E. coli* JM109 (0,5 мМ). Без дополнительного гена концентрация в 0,5 мМ уже была летальной.

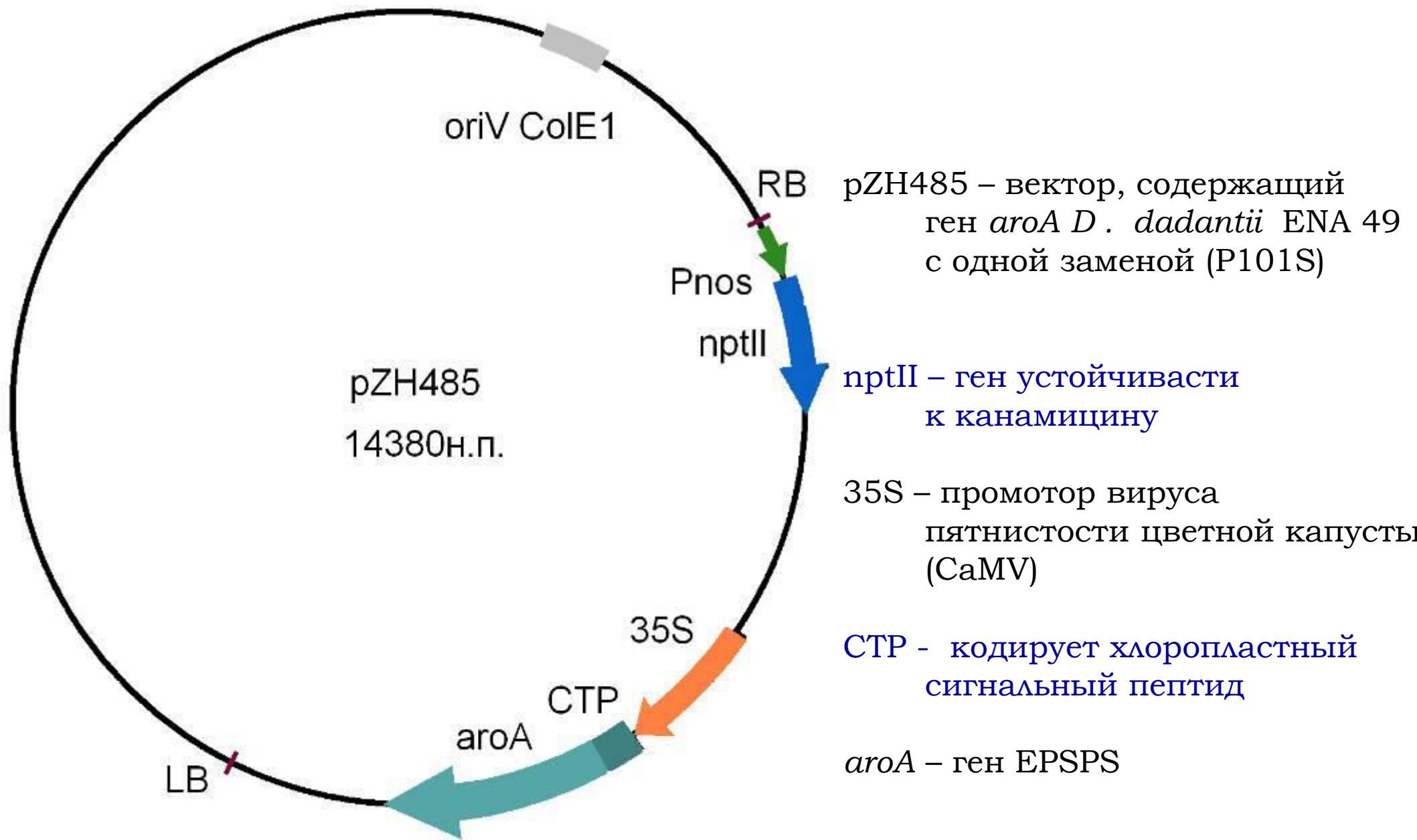
☉ но для обеспечения устойчивости растениям этого будет мало.

Анализ литературных данных показал, что повысить устойчивость EPSPS к глифосату могут одиночные замены пролина на серин в 101 положении (Pro101Ser) и треонина на метионин в 42 позиции (Tre42Met), глицина на аланин в 96 положении (Gly96Ala) и треонина на изолейцин в 97 положении (Tre97Ile)

☉ при помощи сайтнаправленного мутагенеза были созданы различные измененные варианты генов *aroA* как из *E. coli*, так и из *D. dadantii*

☉ эффективность полученных конструкций проверялась при экспрессии их в клетках *E. coli*. Наиболее эффективными оказались варианты гена из *D. dadantii* ENA 49 с одной (Pro101Ser) и двумя заменами - (Pro101Ser и Thr97Ile)

Для переноса генов в растительный геном были сконструированы плазмидные конструкции на основе бинарного вектора pBI121



**Для проверки работы конструкций в растениях
были созданы трансгенные растения табака**



Контроль –
нетрансгенные растения



Трансгены с
геном *aroA* с
двумя заменами



Трансгены с
геном *aroA* с
одной заменой

**Растения табака после обработки
глифосатом**

Растения рапса, трансгенные по гену ***aroA D.dadantii***
с одной заменой - **Pro101Ser**



A



B

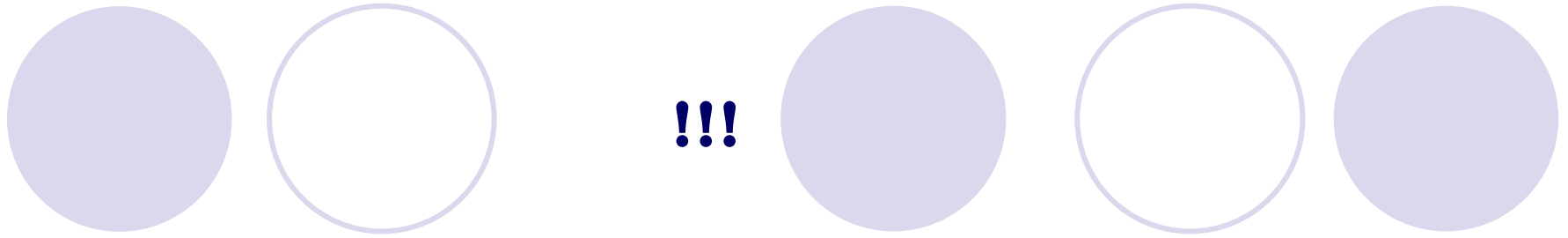


C

A – нетрансгенные растения до обработки глифосатом

B - нетрансгенные растения через 7 дней после обработки

C – трансгены после обработки глифосатом



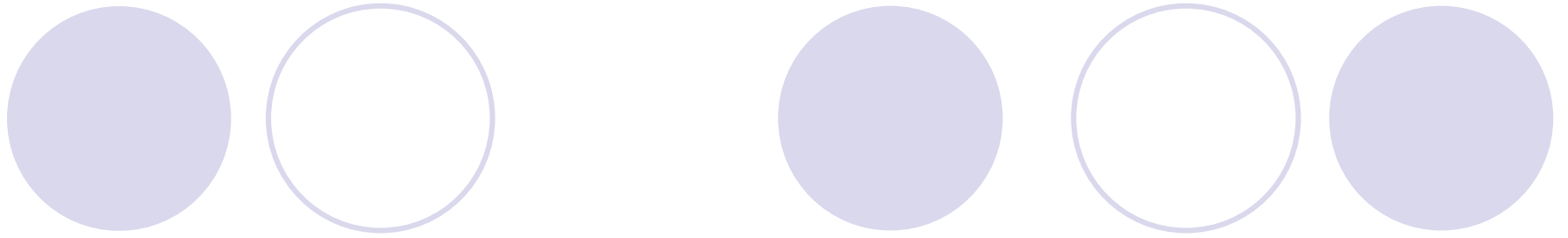
У устойчивых к глифосату растений, которые получены за счет модификаций гена EPSPS, глифосат все равно **накапливается в меристемах**, что приводит к **снижению фертильности и потерям урожая**

Описано несколько типов ферментов, способных инактивировать глифосат. Из них лучше всего охарактеризованы:

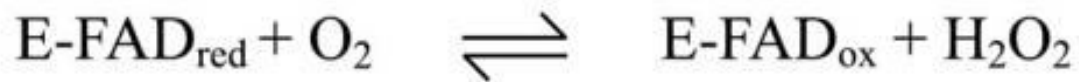
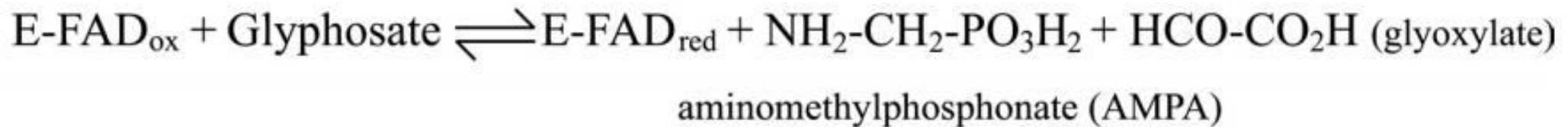
- *ацетилтрансферазы*
- *оксидоредуктазы*
- *оксидазы*

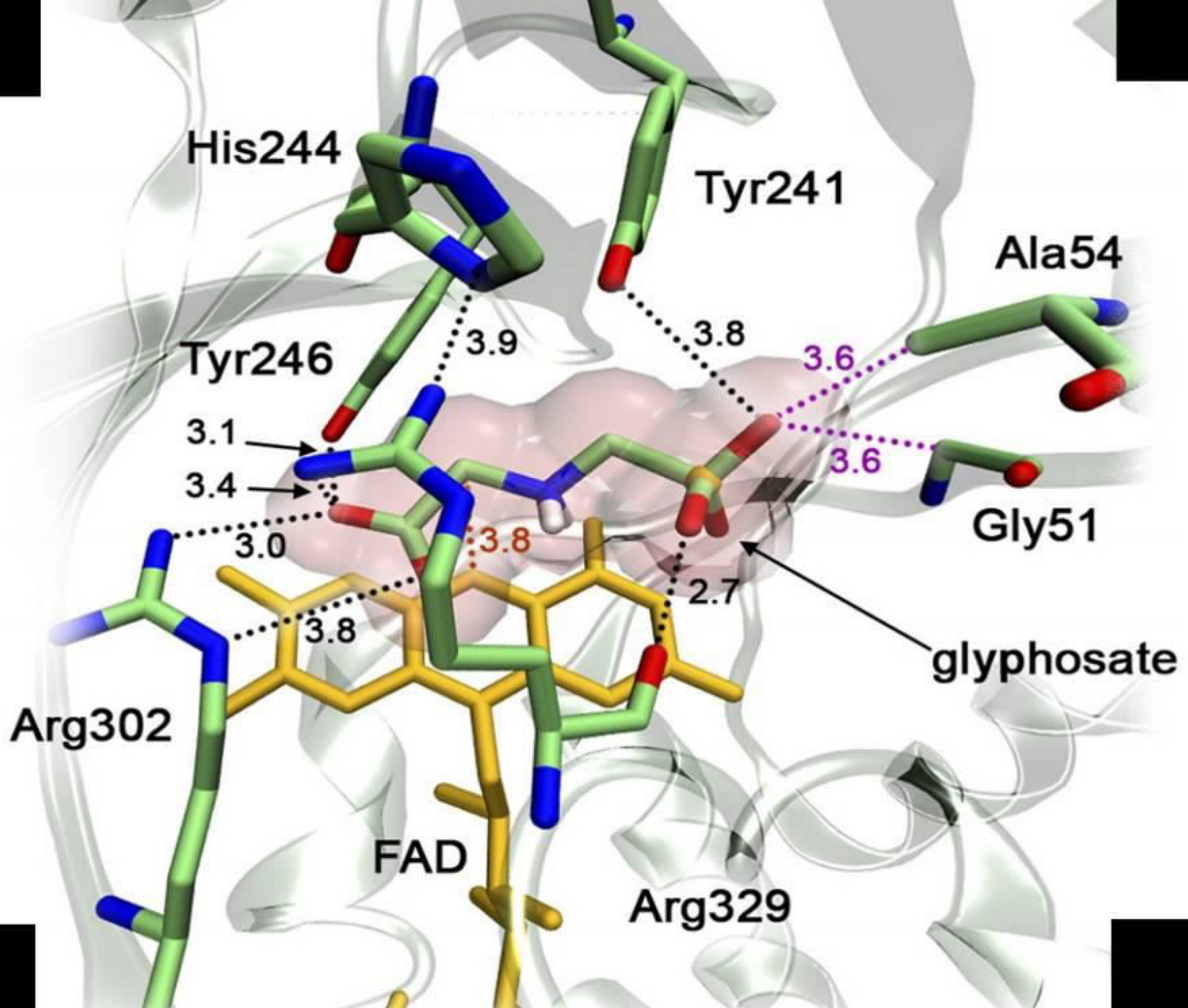
Еще одним из ферментов, способных расщеплять глифосат, является

Глицинооксидаза (GO) из бактерий *Bacillus subtilis*, продукт гена *thiO*, которую ранее не использовали для получения трансгенных растений



С небольшой эффективностью глициноксидаза катализирует окислительное дезаминирование глифосата с образованием АМРА и глиоксилата:







Нами были получены мутантные варианты природных генов глициноксидазы, выделенных из двух штаммов *Bacillus subtilis* (1,5 и 4К34) со следующими заменами:

- Gly51Ser
- Ala54Arg
- His244Ala

При экспрессии измененных вариантов генов в клетках *E. coli* наибольшей устойчивостью обладали клетки с генами, несущими все три замены.

Для проверки работы конструкций в растениях
были созданы трансгенные растения табака



А



В

контроль –
нетрансгенные растения



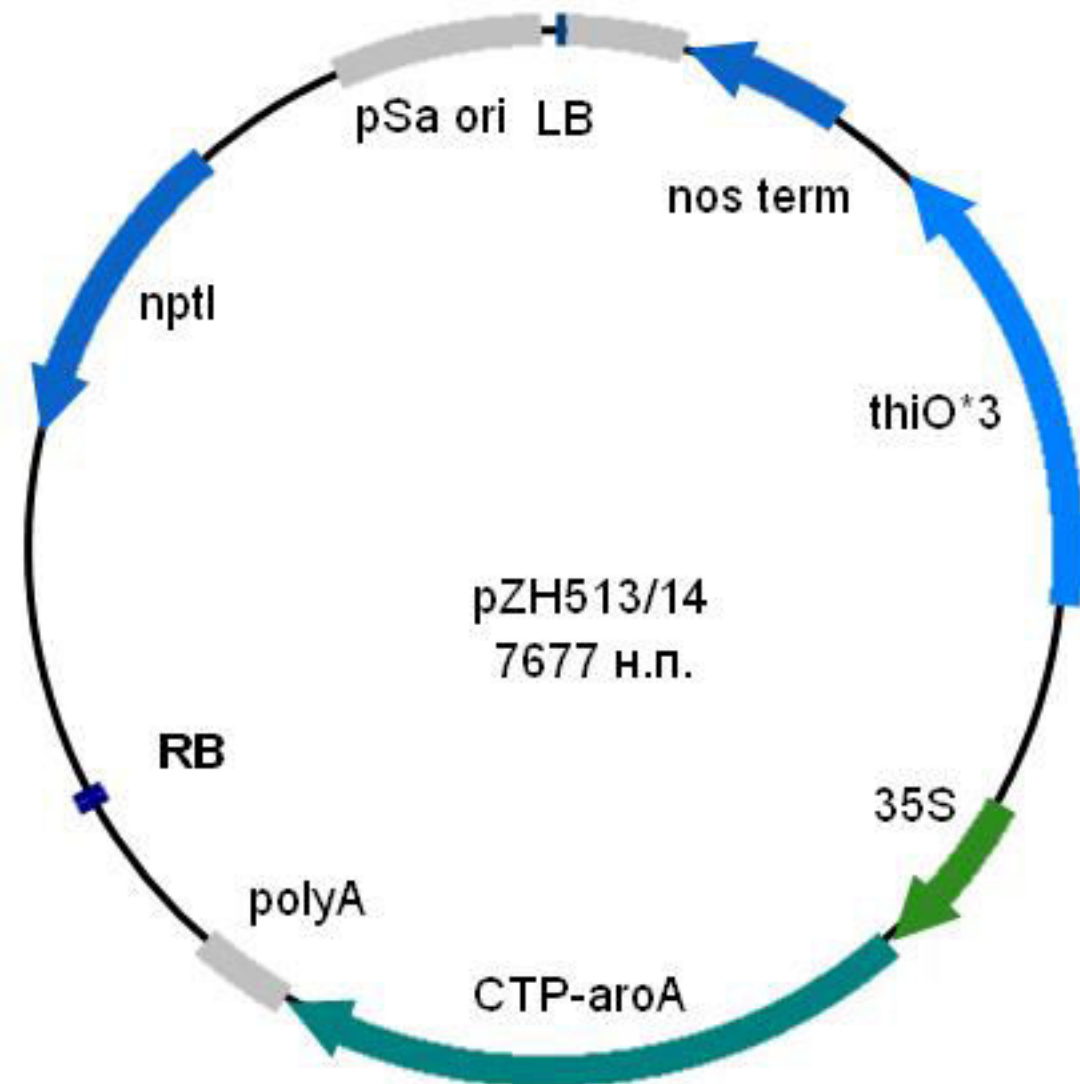
Трансгены по гену из
Bacillus subtilis 1,5



Трансгены по гену из
Bacillus subtilis 4K34

Растения табака после обработки
глифосатом

Бинарный вектор, содержащий 2 гена: измененные *aroA* и *thiO* (сконструирован на основе pGreen0229-35Sb)



thiO*3 – ген глифосатоксидазы с 3мя
заменами аминокислот под
регуляцией промотора вируса
пятнистости георгина

CTP-aroA – ген EPSPS с 2мя заменами
и хлоропластным сигнальным
пептидом

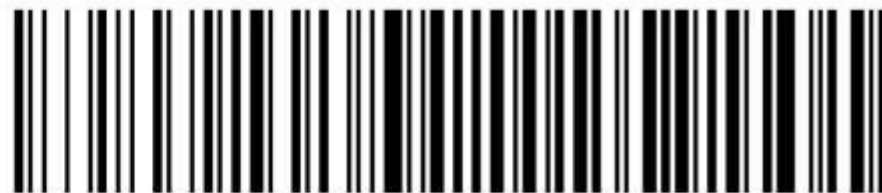
35S – промотор вируса
пятнистости цветной
капусты (CaMV)

Трансгенные линии рапса были зарегистрированы в базе “Biosafety Clearing-House”

Добавлен ген *aroA* из *D. dadantii* ENA 49 с одной заменой (Pro101Ser) :



Canola modified for herbicide tolerance



<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=106260>

Read barcode or type above URL into internet browser to access information on this LMO in the Biosafety Clearing-House © SCBD 2012

Добавлены гены:

- *aroA* из *D. dadantii* ENA 49 с двумя заменами (Pro101Ser и Thr97Ile);
- *thiO* из *B. subtilis* с тремя заменами (Gly51Ser, Ala54Arg и His244Ala)



Canola modified for herbicide tolerance



<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=108048>

Read barcode or type above URL into internet browser to access information on this LMO in the Biosafety Clearing-House © SCBD 2012

Серия АА



№ 000002

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды
Республики Беларусь

РАЗРЕШЕНИЕ № 2

на высвобождение непатогенных генно-инженерных
организмов в окружающую среду

Настоящим разрешается Белорусскому государственному университету,
(наименование и местонахождение юридического лица, фамилия, имя, отчество)
220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4
(и место жительства индивидуального предпринимателя)

высвобождение в окружающую среду непатогенных генно-инженерных организмов

трансгенной линии рапса с геном agoA

(русское и латинское название вида или вида генно-инженерных организмов)

на участке специально оборудованного опытного поля (г. Минск,
(область, район, населенный пункт, площадь участка)
Первомайский район, ул. Ф. Скорины, 34) ГНУ «Институт генетики и
(наименование участка, адрес участка или
цитологии Национальной академии наук Беларуси»
(наименование и адрес учреждения)

при условии соблюдения следующих мер предупреждения риска возможных неблагоприятных последствий такого высвобождения:

- 1) круглосуточный контроль камер слежения и звуковой сигнализации;
(перечисляются меры предупреждения риска)
- 2) отсутствие возможности проникновения посторонних лиц и животных;
- 3) искусственная изоляция соцветий для предотвращения рассева пыльцы и семян;

после завершения вегетационного периода всю наземную часть растений, после срезки изолированных кистей с семенами, уничтожить путем сжигания в крематории; участок земли перепахать;

- 4) проведение мониторинга животного и растительного мира в радиусе 300 м от опытного поля

Заместитель Министра



И.М. Качановский

(инициалы, фамилия)

М.П.

Дата выдачи 21 июля 2015

Спасибо за внимание

