

## ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОЗДАНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Н.А. Картель

Институт генетики и цитологии

Фундаментальные исследования в области молекулярной биологии и генетики за последние 30-40 лет XX столетия привели к глубокому пониманию молекулярных механизмов наследственности, структурно-функциональной организации и регуляции геномов живых организмов.

Генетическая инженерия (начало 70-х годов) открыла принципиально новые подходы по использованию живых организмов в интересах человека (медицина, сельское хозяйство, промышленность, экология). Одним из таких подходов является создание в лабораторных условиях генетически-модифицированных или генно-инженерных организмов (ГИО) - растений, животных, микроорганизмов.

Биотехнология создания ГИО заключается в том, что вместо традиционной селекции: (скрещивание мать x отец), при котором объединяются геномы (хромосомы) обоих родителей, используют встраивание новых генов в геном организма. Таким образом, ГИО полностью сохраняет свой геном. К нему лишь прибавляются 1-3 новых гена, которые придают организму какой-то новый (как правило, важный) признак.

Для создания ГИО разработана методология генетической трансформации, которая включает:

- получение и клонирование рекомбинантных молекул ДНК
- культивирование или клонирование клеток и тканей высших организмов *in vitro*
- системы переноса генов от донора к реципиенту (трансгеноз)
- молекулярно-генетический анализ и биотестирование трансгенных организмов (рис.1).

Следовательно, трансгенный организм - это организм, геном которого содержит чужеродную ДНК, интегрированную методом генетической инженерии. Первые попытки создания трансгенных растений были сделаны учеными в середине 70-х годов XX века, а первые коммерческие сорта были созданы в США в 94-96 гг. фирмой Монсанто.

Культура	Генетическая	Фирма
Картофель New Leaf	Устойчивость к колорадскому жуку (ген <i>cry II B.t.</i> )	Монсанто
Кукуруза Jieid Gard	Устойчивость к кукурузному мотыльку (ген <i>cry I A</i> )	Монсанто
Хлопчатник ВоНдагс	Устойчивость к совкам (ген <i>cry I</i> )	Новартис
Томаты	Лежкость плодов	Монсанто

Фирмы и НИИ многих стран сейчас интенсивно работают над созданием, испытанием и коммерческой реализацией трансгенных растений, несущих новые ценные сельскохозяйственные признаки. Основные направления, по которым создаются трансгенные растения,

- устойчивые к гербицидам (Раундап, Баста и др.)
- устойчивые к грибным болезням и вирусам
- с улучшенными качественными показателями и повышенной продуктивностью
- с измененными физиологическими показателями (раннеспелость и др.)
- адаптированные к измененным факторам среды (засуха, жара, холод)
- толерантные к загрязнению почвы (тяжелые металлы, нефтепродукты)
- служащие биореакторами для продукции веществ, используемых в медицине, парфюмерии и др.

Каким образом гены могут защищать растения от гербицидной гибели?

Действующее начало гербицида Баста - фосфинотрицин (аналог глутамата), ингибирует глутамин синтазу, вследствие чего в клетках накапливается NH<sub>4</sub> (аммиак), что приводит к гибели клеток.

Введение в растение гена "bar" из *Streptomyces hygrosopicus* приводит к синтезу фермента фосфинотрицин-ацетилтрансфераза, который разрушает фосфинотрицин, следовательно, токсичность фосфинотрицина не проявляется (рис.2).

Создание сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам, позволяет снизить количество обработок, применив одну с более высокой концентрацией гербицида. Это приводит к снижению накопления гербицидов в почве.

Для создания растений, устойчивых к грибным болезням, вирусам и насекомым используется введение генов от других растений и микроорганизмов:

- Ген хитиназы
- Ген глюконазы
- Ген фитоалексинов
- Ген дефензина редьки
- Vt-гены и др. Создаются:

1) трансгенные растения-биореакторы, способные продуцировать в повышенных количествах вторичные метаболиты.

- Рапс, синтезирующий белки крови, антитела, вакцины (фирмы Calgene, Limaqrain)
- Рапс, синтезирующий высокое содержание лаурата (12-ти членная жирная кислота). Используется для производства стиральных порошков, шампуней, косметики (ген тиоэстеразы из растений).
- Трансгенные растения сои и кукурузы, продуцирующие антитела.

2) экологически-ценные трансгенные растения (например, с геном металлотионина, способны связывать тяжелые металлы)

Трансгенные растения и продукты, получаемые с их использованием

Растение или продукт	Использование	Производитель
Растения, устойчивые к действию гербицидов: рапс, хлопок, соя, зерновые	Коммерческое, например, Roundap Ready TM	Monsanto, Calgene, DuPont, Am.Cyanamid
Фрукты и овощи, устойчивые к действию вирусов: огурец, тыква, папайя и др. (антисмысловая РНК белка оболочки)	Полевые испытания - улучшение качества и увеличение урожайности	Asgrow
Растения, устойчивые к насекомым (экспрессия 8-эндотоксина <i>B.thuringiensis</i> ): зерновые, хлопок, картофель, томаты	Коммерческое	Monsanto, Novartis, ciba-Geidy, Mycogen
Пальма с увеличенным содержанием лизина	Коммерческое	Unilever, Calgene
Злаковые с увеличенным содержанием лизина	Экспериментальное	
Пищевые вакцины: гепатит В (банан)	Научные исследования	
Получение вторичных метаболитов и полимеров в растениях: витамины, ароматизаторы,	Научные исследования	

ферменты, гормоны, моноклональные антитела)		
Томаты с задержкой времени созревания (антисмысловая РНК)	Коммерческое, например, Flavr Savr ТМ	Calgene
Растения, устойчивые к засолению, засухе, тяжелым металлам и др.	Полевые испытания	
Злаки, фиксирующие атмосферный азот (гены бобовых)	Начальная стадия исследований	

Исследования по созданию трансгенных растений в Беларуси:

- В Институте картофелеводства НАНБ совместно с Центром биоинженерии РАН (Москва) ведутся работы по созданию и испытанию трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, а также к У-вирусу.
- Трансгенные растения плодово-ягодных культур создаются и изучаются в ЦБС НАНБ.
- В ИГиЦ НАНБ разрабатываются технологии создания трансгенных растений на модельном объекте табаке, а также на сельскохозяйственных культурах - картофеле, ячмене, пшенице, томатах
- Фундаментальные исследования с использованием трансгенных растений проводятся в ИГиЦ, ИФБ, ЦБС, ИБОХ
- ГП Разработка и использование генно-инженерных биотехнологий в интересах сельского хозяйства и медицины (2002 - 2006 гг.)

В лаборатории молекулярной генетики ИГиЦ НАНБ исследования ведутся в направлении:

- поиска новых, хозяйственно-ценных генов (локализация генов с помощью транспозонного мутагенеза, получение R-генов-гомологов на основе консервативных участков генов pbs-нуклеотид-связывающий участок, и Igt - лейцин-богатый повтор.
- Создание новых векторов для трансформации
- Совершенствование технологии переноса генов в реципиентный организм (баллистический метод, прямой перенос в протопласты, агробактериальная трансформация, комбинированный метод).

С помощью созданных векторов проведена успешная трансформация и получены: трансгенные растения: устойчивые к гербициду Баста (ячмень, табак) (рис. 3).

- табак, устойчивый к фитопатогену *Botrytis cinerea* (рис. 4) устойчивый к тяжелым металлам табак и арабидопсис (рис. 5) устойчивый к нефтепродуктам арабидопсис (рис. 6) (трансформанты с генами GYA и B хорошо растут на почве, содержащей до 6,5% нефти, а также на почве, содержащей до 1,6-1,8 г меди/кг сухого вещества почвы)

- Трансформанты картофеля, несущие транспозоны Ac и Ds (рис. 7).

Почему генетическая инженерия растений все больше используется для создания различного рода биотехнологий?

- Для создания сортов на основе трансгенных растений не требуется такого длительного времени, как при использовании обычных методов селекции (вместо 10-15 лет - 4-5 лет)
- Растительные биотехнологии дешевле и следовательно, экономически более выгодны, чем аналогичные промышленные производства

- Экологически более безопасны, поскольку в основе производства тех или иных веществ лежат существующие в природе тонкие биологические безотходные процессы.

Научные учреждения и фирмы большинства развитых стран активно ведут работу по созданию и использованию самых разнообразных трансгенных растений

Наиболее активно эти работы ведутся в С Ш А , Канаде, Великобритании, Германии, Аргентине, Чили, Кубе, Китае, *Индии и др.*

Предполагается, что в ближайшие 10-15 лет около 80% основных 29 с/х культур будут высеваться семенами трансгенных растений.

В 2002 году в США 25% площадей, занятых кукурузой, 54% соей, и 61% хлопком были засеяны трансгенными сортами.

Использование трансгенных растений позволило резко снизить объем вносимых пестицидов и гербицидов, а также снизить затраты на производство продуктов и вредную нагрузку на окружающую среду.

В государствах ЕС зарегистрировано более 400 заявок на реализацию генетически измененной кукурузы, 13 заявок по пшенице, 3 заявки по ячменю.

## ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОЗДАНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Фундаментальные исследования в области молекулярной биологии и генетики за последние 30-40 лет XX столетия привели к глубокому пониманию молекулярных механизмов наследственности, структурно-функциональной организации и регуляции геномов живых организмов.

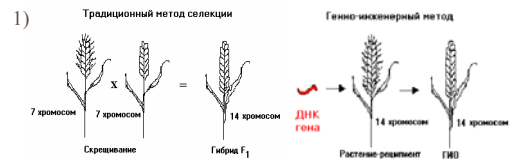
### Генетическая инженерия (начало 70-х годов)

- открыла принципиально новые подходы по использованию живых организмов в интересах человека (медицина, сельское хозяйство, промышленность, экология)

Одним из таких подходов является создание в лабораторных условиях **генетически-модифицированных** или **генно-инженерных организмов (ГИО)** - растений, животных, микроорганизмов.

### Биотехнология создания ГИО заключается в том, что

- вместо традиционной селекции: (скрещивание мать x отец), при котором объединяются геномы (хромосомы) обоих родителей
- используют встраивание новых генов в геном организма



- Таким образом ГИО полностью сохраняет свой геном. К нему лишь прибавляются 1-3 новых гена, которые придают организму какой-то новый (как правило, важный) признак.

### Для создания ГИО разработана методология генетической трансформации,

которая включает:

- получение и клонирование рекомбинантных молекул ДНК
- культивирование или клонирование клеток и тканей высших организмов *in vitro*
- системы переноса генов от донора к реципиенту (трансгеноз)
- молекулярно-генетический анализ и биотестирование трансгенных организмов

### Цикл создания трансгенных растений

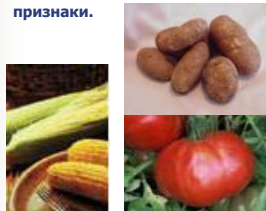


**Трансгенный организм** – это организм, геном которого содержит чужеродную ДНК, интегрированную методом генетической инженерии

- Первые попытки создания трансгенных растений были сделаны учеными в середине 70-х годов XX века, а первые коммерческие сорта были созданы в США в 94-96гг. фирмой Монсанта.

Культура	Генетическая модификация	Фирма
Картофель New Leaf	Устойчивость к колорадскому жуку (ген <i>cry III B.t.</i> )	Монсанта
Кукуруза Jield Gard	Устойчивость к кукурузному мотыльку (ген <i>cry I A</i> )	Монсанта Новартис
Хлопчатник Bollgard	Устойчивость к совкам (ген <i>cry I</i> )	Монсанта
Томаты	Лежкость плодов	Монсанта
Соя	Устойчивость к гербициду РАУНДАП	Монсанта

- Фирмы и НИИ многих стран сейчас интенсивно работают над созданием, испытанием и коммерческой реализацией трансгенных растений, несущих новые ценные сельскохозяйственные признаки.



## Основные направления по которым создаются трансгенные растения,

- устойчивые к гербицидам (Раундап, Баста и др.)
- устойчивые к грибным болезням и вирусам
- с улучшенными качественными показателями и повышенной продуктивностью
- с измененными физиологическими показателями (раннеспелость и др.)
- адаптированные к измененным факторам среды (засуха, жара, холод)
- толерантные к загрязнению почвы (тяжелые металлы, нефтепродукты)
- служащие биореакторами для продукции веществ, используемых в медицине, парфюмерии и др.

## Трансгенные растения устойчивые к гербициду

- Каким образом гены могут защищать растения от гербицидной гибели?

Действующее начало гербицида Баста:

Фосфинотрицин (аналог глутамата)

↓  
усгибрует  
Глутамин синтазу  
↓  
NH<sub>4</sub> аммиак  
↓  
Гибель клеток

Введение в растение гена "bar" из *Streptomyces hygroscopicus*

↓ Синтез фермента  
фосфинотрицин-ацetylтрансфераза  
↓ разрушение  
фосфинотрицина  
↓  
Токсичность не проявляется



Создание сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам, позволяет снизить количество обработок, применив одну с более высокой концентрацией гербицида. Это приводит к снижению накопления гербицидов в почве.

## Вред, наносимый болезнями и вредителями

- Потери урожая до 30% и более
- При использовании защитных средств – 12-13%
- Мировые потери оцениваются в 42 млрд.долларов в год.
- В США на борьбу с колорадским жуком и кукурузным мотыльком тратится около 1млрд.долларов в год
- Сильное загрязнение окружающей среды пестицидами и инсектицидами
- Гибель полезных насекомых и птиц
- Влияние на здоровье людей

## Создание растений, устойчивых к грибным болезням, вирусам и насекомым

- Трансгенные растения с введенными генами от других растений и микроорганизмов:
  - Гены хитиназы
  - Гены глюконазы
  - Гена фитоалексинов
  - Ген дефензина редьки
  - Vt-гены и др.
- Растения приобретают устойчивость к фитофторе, фузариум, альтернарии, ризостонии, устойчивы к колорадскому жуку, X и Y вирусам, и др.

## Трансгенные растения-биореакторы способны продуцировать в повышенных количествах вторичные метаболиты.

- Рапс, синтезирующий белки крови, антитела, вакцины (фирмы Calgene, Limaqain)
- Рапс, синтезирующий высокое содержание лаурата (12-ти членная жирная кислота). Используется для производства стиральных порошков, шампуней, косметики (ген тиаэстеразы из растений).
- Трансгенные растения сои и кукурузы, продуцирующие антитела.

**Экологически-ценные трансгенные растения** (например, с геном металлотионина, способны связывать тяжелые металлы)

## Трансгенные растения и продукты, получаемые с их использованием

Растение или продукт	Использование	Производитель
Растения, устойчивые к действию гербицидов: рапс, хлопок, соя, зерновые	Коммерческое, например, Roundap Ready™	Monsanto, Calgene, DuPont, Am.Cyanamid
Фрукты и овощи, устойчивые к действию вирусов: огурец, тыква, папайя и др. (антисмысловая РНК белка оболочки)	Полевые испытания – улучшение качества и увеличение урожайности	Asgrow
Растения, устойчивые к насекомым (экспрессия <i>α</i> зротоксина <i>B. thuringiensis</i> ): зерновые, хлопок, картофель, томаты	Коммерческое	Monsanto, Novartis, ciba Gldy, Mycogen
Пальма с увеличенным содержанием лизина	Коммерческое	Unilever, Calgene
Злаковые с увеличенным содержанием лизина	Экспериментальное	
Пищевые вакцины: гепатит В (банан)	Научные исследования	
Получение вторичных метаболитов и полимеров в растениях: витамины, ароматизаторы, ферменты, гормоны, моноклональные антитела	Научные исследования	
Томаты с задержкой времени созревания (антисмысловая РНК)	Коммерческое, например, Flavr Savr™	Calgene
Растения, устойчивые к засолению, засухе, тяжелым металлам и др.	Полевые испытания	
Злаки, фиксирующие атмосферный азот (гены бобовых)	Начальная стадия исследований	

## ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СОЗДАНИЮ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ В БЕЛАРУСИ:

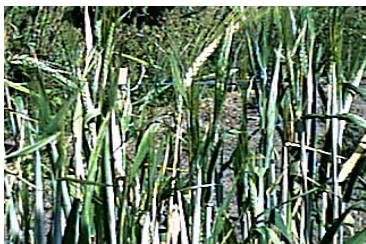
- В Институте картофелеводства НАНБ совместно с Центром биотехнологии РАН (Москва) ведутся работы по созданию и испытанию трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, а также к У-вирусу.
- Трансгенные растения плодово-ягодных культур создаются и изучаются в ЦБС НАНБ.
- В ИГиЦ НАНБ разрабатываются технологии создания трансгенных растений на модельном объекте табаке, а также на сельскохозяйственных культурах – картофеле, ячмене, пшенице, томатах
- Фундаментальные исследования с использованием трансгенных растений проводятся в ИГиЦ, ИФБ, ЦБС, ИБОХ
- ГП Разработка и использование генно-инженерных биотехнологий в интересах сельского хозяйства и медицины (2002 – 2006 гг.)

## В ЛАБОРАТОРИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ ИГиЦ НАНБ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЕДУТСЯ В НАПРАВЛЕНИИ:

- ПОИСКА НОВЫХ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ГЕНОВ (ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСПОЗОННОГО МУТАГЕНЕЗА, ПОЛУЧЕНИЕ R-ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ НА ОСНОВЕ КОНСЕРВАТИВНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ; NBS – НУКЛЕОТИД СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК И LRR – ЛЕЙЦИН БОГАТЫЙ ПОВТОР)
- СОЗДАНИЕ НОВЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ
- СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В РЕЦИПИЕНТНЫЙ ОРГАНИЗМ (БАЛЛИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД, ПРЯМОЙ ПЕРЕНОС В ПРОТОПЛАСТЫ, АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, КОМБИНИРОВАННЫЙ МЕТОД)

С помощью созданных векторов проведена успешная трансформация и получены трансгенные растения:

устойчивые к гербициду Баста (ячмень, табак)



ТРАНСГЕННЫЙ ЯЧМЕНЬ, СОДЕРЖАЩИЙ ГЕН bar

## Табак, устойчивый к фитопатогену Botrytis cinerea



- 1 – КОНТРОЛЬНОЕ РАСТЕНИЕ SR1
- 2 – КОНТРОЛЬНОЕ РАСТЕНИЕ С ПУСТЫМ ВЕКТОРОМ (bar)
- 3 – ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ С rHbA ГЕНОМ
- 4 – ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ С rHbV ГЕНОМ
- 5 - ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ С rHbAV ГЕНАМИ



### Устойчивый к тяжелым металлам табак



Растения, выращенные на меди (1,6г/кг)  
Слева: контрольное растение табака SR1  
Справа: трансгенное растение табака (ген rhIA)

### И АРАБИДОПСИС



- 1 – КОНТРОЛЬНОЕ РАСТЕНИЕ НА ПОЧВЕ С МЕДЬЮ (1,8Г/КГ)
- 2 – КОНТРОЛЬНОЕ РАСТЕНИЕ С ПУСТЫМ ВЕКТОРОМ (bar) НА ЧИСТОЙ ПОЧВЕ
- 3 – КОНТРОЛЬНОЕ РАСТЕНИЕ С ПУСТЫМ ВЕКТОРОМ (bar) НА ПОЧВЕ С МЕДЬЮ (1,8Г/КГ)
- 4,5 – ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ С ГЕНОМ rhA НА ПОЧВЕ С МЕДЬЮ (1,8Г/КГ)
- 6 – ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ С ГЕНОМ rhAB НА ПОЧВЕ С МЕДЬЮ (1,8Г/КГ)

### Устойчивый к нефтепродуктам арабидопсис

- Растения
- 1-контрольное
  - 2-с rhIA геном
  - 3-с rhIB геном
  - 4-с rhIA+rhIB генами



Трансформанты с генами rhIA и B хорошо растут на почве, содержащей до 6,5% нефти, а также на почве, содержащей до 1,6-1,8 г меди/кг сухого вещества почвы

### Трансформанты картофеля, несущие трансозоны As и Ds



Слева: регенерация трансформантов картофеля с генами As-Ds на селективной среде.  
Справа: трансгенный картофель в почве

### Почему генетическая инженерия растений все больше используется для создания различного рода биотехнологий?

- Для создания сортов на основе трансгенных растений не требуется такого длительного времени, как при использовании обычных методов селекции (вместо 10-15 лет – 4-5 лет)
- Растительные биотехнологии дешевле и следовательно, экономически более выгодны, чем аналогичные промышленные производства
- Экологически более безопасны, поскольку в основе производства тех или иных веществ лежат существующие в природе тонкие биологические безотходные процессы.

### Научные учреждения и фирмы большинства развитых стран активно ведут работу по созданию и использованию самых разнообразных трансгенных растений

- Наиболее активно эти работы ведутся в США, Канаде, Великобритании, Германии, Аргентине, Чили, Кубе, Китае, Индии и др.
- Предполагается, что в ближайшие 10-15 лет около 80% основных 29 с/х культур будут высеваться семенами трансгенных растений.
- В 2002 году в США 25% площадей, занятых кукурузой, 54% соей, и 61% хлопком были засеяны трансгенными сортами.
- Использование трансгенных растений позволило резко снизить объем вносимых пестицидов и гербицидов, а также снизить затраты на производство продуктов и вредную нагрузку на окружающую среду.
- В государствах ЕС зарегистрировано более 400 заявок на реализацию генетически измененной кукурузы, 13 заявок по пшенице, 3 заявки по ячменю.



**Благодарю за внимание**

