

ВОЗМОЖНЫ РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ:

1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ:

1.1 Перенос гетерологичного гена из одного вида/организма в другой:

1.1.1 Ядерная трансформация

1.1.2 Хлоропластная трансформация

2. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ:

2.1 Использование стресс индуцибельных и тканеспецифичных промоторов для экспрессии генов, ответственных за изменяемый признак в нужное время и нужной ткани растений

2.2 Использование факторов транскрипции, включающих экспрессию десятков генов, определяющих количественные признаки

2.3 Антисенс технологии для эффекта «замолкания (silencing)» генов

2.4 Интерференция РНК (RNAi) для «замолкания (silencing)» генов

3. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА:

3.1 Редактирование генома – новый способ точной замены гена РНК-направленными нуклеазами CRISPR/Cas9

3.2 Направленная модификация последовательностей нуклеотидов в геноме специфическими ферментами (цинковые пальцы)

Группа Генетической трансформации и редактирования генома сельхоз. растений

Д.Б.Н., А.К.ГАПОНЕНКО
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К.КОЛЬЦОВА РАН,
ЛАБОРАТОРИЯ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА.
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ, БИОТЕХНОЛОГИИ, СЕЛЕКЦИИ И
СЕМЕНОВОДСТВА РГАУ-МСХА ИМЕНИ К. А.ТИМИРЯЗЕВА



Мы разработали методы генетической трансформации пшеницы, подсолнечника и сахарной свеклы.



МЫ РАБОТАЕМ НАД НАЦИОНАЛЬНО-ЗНАЧИМЫМИ ИННОВАЦИОННЫМИ ПРОЕКТАМИ:

- 1. «УЛУЧШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОДУКТИВНЫХ, СИЛЬНЫХ И ЦЕННЫХ СОРТОВ РОССИЙСКИХ ПШЕНИЦЫ К АБИОТИЧЕСКИМ И БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ».**
- 2. «В РЕЗУЛЬТАТЕ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЕКТОВ ДОЛЖНЫ БЫТЬ СОЗДАНЫ: СИЛЬНЫЕ И ЦЕННЫЕ СОРТА ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДУ, К КЛОПУ-ЧЕРЕПАШКЕ, ДЕФИЦИТУ ВОДЫ(ЗАСУХЕ) И ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ».**

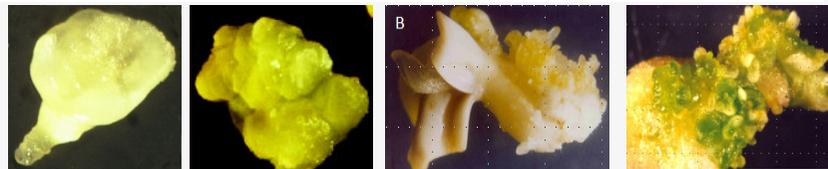
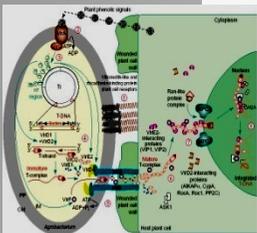
Agrobacterium Mediated transformation

Основные этапы генетической трансформации

Microprojectile Bombardment (Biolistic)

Индукция морфогенного каллуса, выбор экспланта или клеточной структуры, компетентной к прямой регенерации растения *in vitro*.

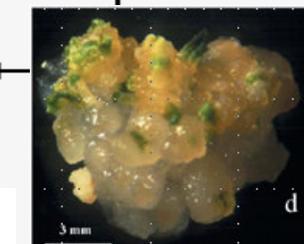
Co-cultivation



Bombardment



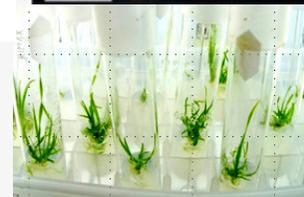
Селективный отбор трансформированных клеток, на среде с селективным агентом



Индукция регенерации побегов или эмбриогенеза *in vitro*.



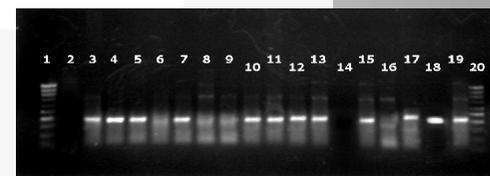
Укоренение или прививка побегов



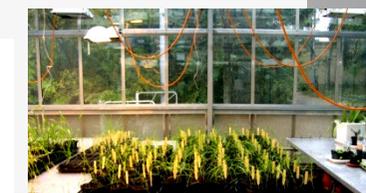
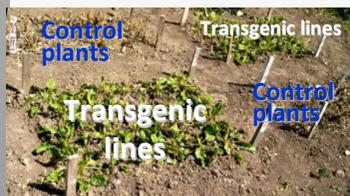
Молекулярный – ПСР, RT-PCR и Саузерн, Вестерн анализы на предмет интеграции в геном и определение числа копий введенного гена.



Адаптация пробирочных растений к условиям теплицы.

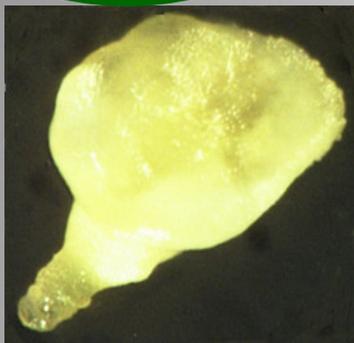


Отбор трансформантов с высокой экспрессией трансгена и с наименьшими отклонениями от исходного фенотипа. Полевые испытания и испытания на биобезопасность UPOF.

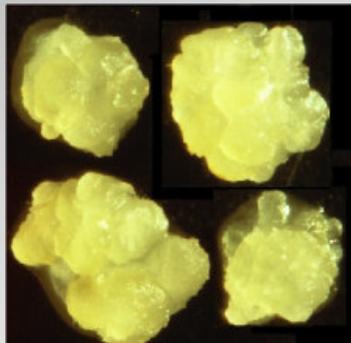


Системы
генетической
трансформации

Мы успешно работаем над регенерацией растений из различных генотипов российской пшеницы *in vitro* с 1984 года и над генетической трансформацией пшеницы с 1991 года.



Незрелый зародыш



Морфогенный каллус



Регенерация побегов *in vitro*



Укоренение побегов

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
БИОБАЛЛИСТИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.), ПРОВОДИМОЙ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УСТАНОВКИ Particle Inflow Gun

© 2006 г. В. С. Фадеев, О. В. Блинкова, А. К. Гапоненко

ГЕНЕТИКА, 2006, том 42, № 4, с. 1–12

Достигнутая
частота
трансформации
составила - 5%

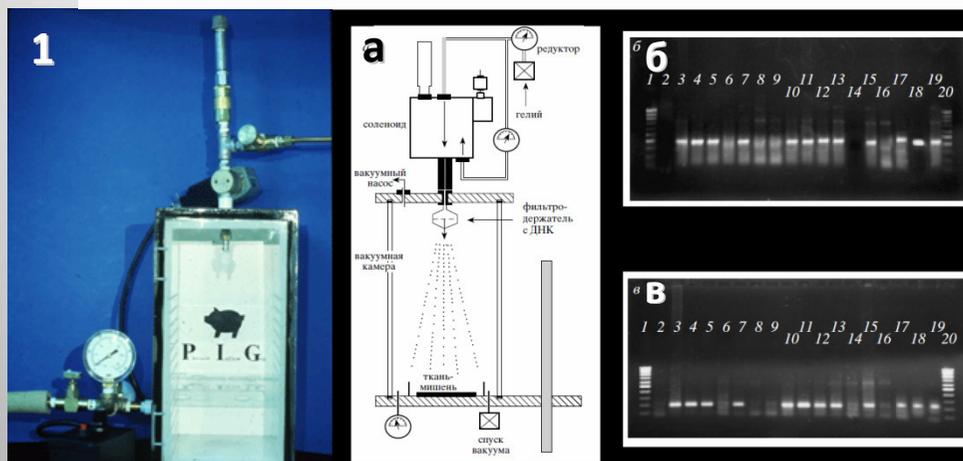
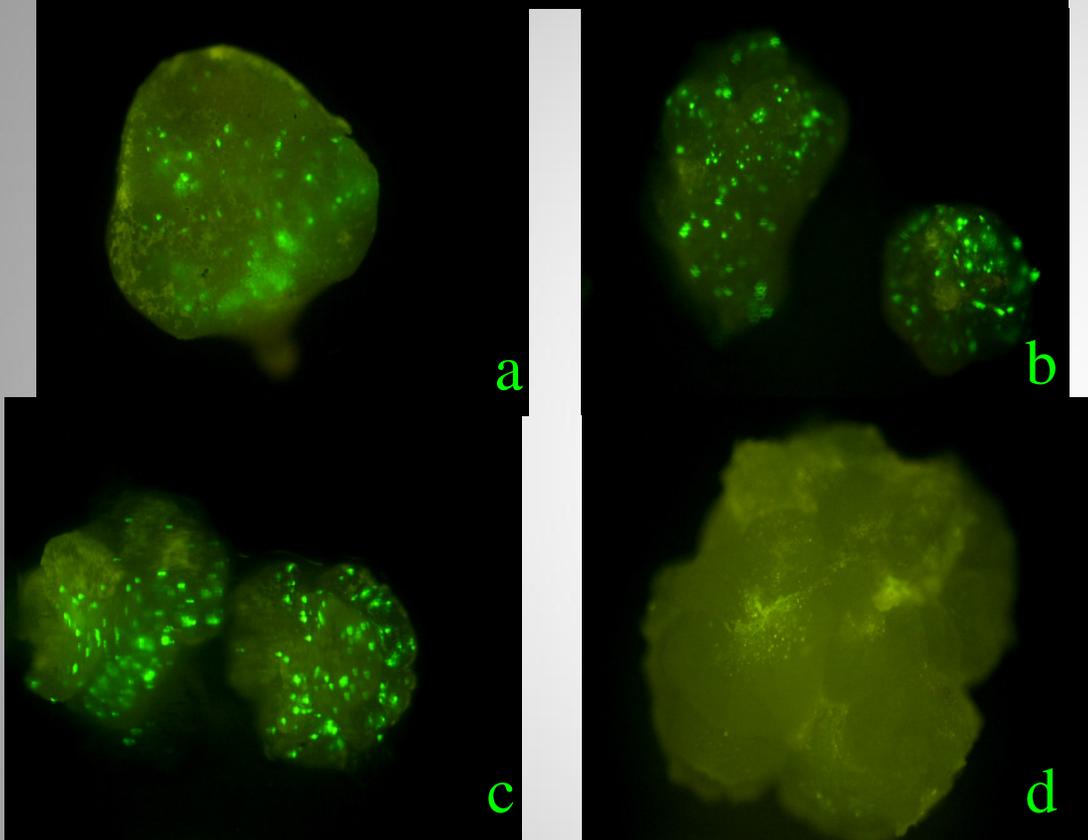


Рис. 4. Баллистическая пушка PIG и ПЦР-анализ полученных трансформантов. а – схема пушки PIG (Particle Inflow Gun); б, в – ПЦР-анализ части из полученных предположительных растений-трансформантов по *bar* (б) и *nos3'* (в) праймераму Дорожки электрофореза: 1, 20 – MWMarker 1 kb; 2 – негативный контроль ДНК пшеницы; 3–17 – ДНК первичных трансформантов; 18 – позитивной контроль – ДНК трансгенного картофеля; 19 – плазида psGFP-BAR.

Мониторинг экспрессии маркерного гена - **Green Fluorescent Protein (GFP)** в трансгенных тканях пшеницы

Транзиентная экспрессия



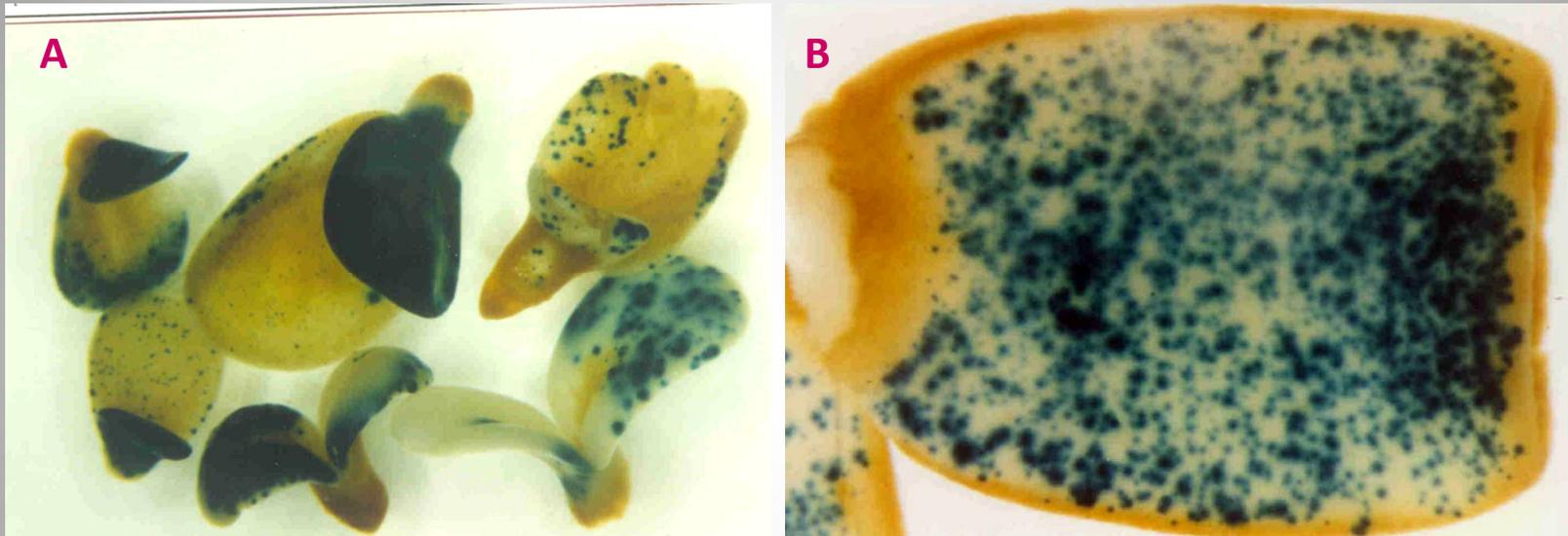
- a) Transient expression of *gfp* gene into immature embryos
- b, c) Transient expression of *gfp* gene into calli after 24 hours of Biolistic treatment
- d) Контроль. Каллус не подвергнутый биобаллистике

Стабильная экспрессия



Fadeev and Gaponenko, 2006

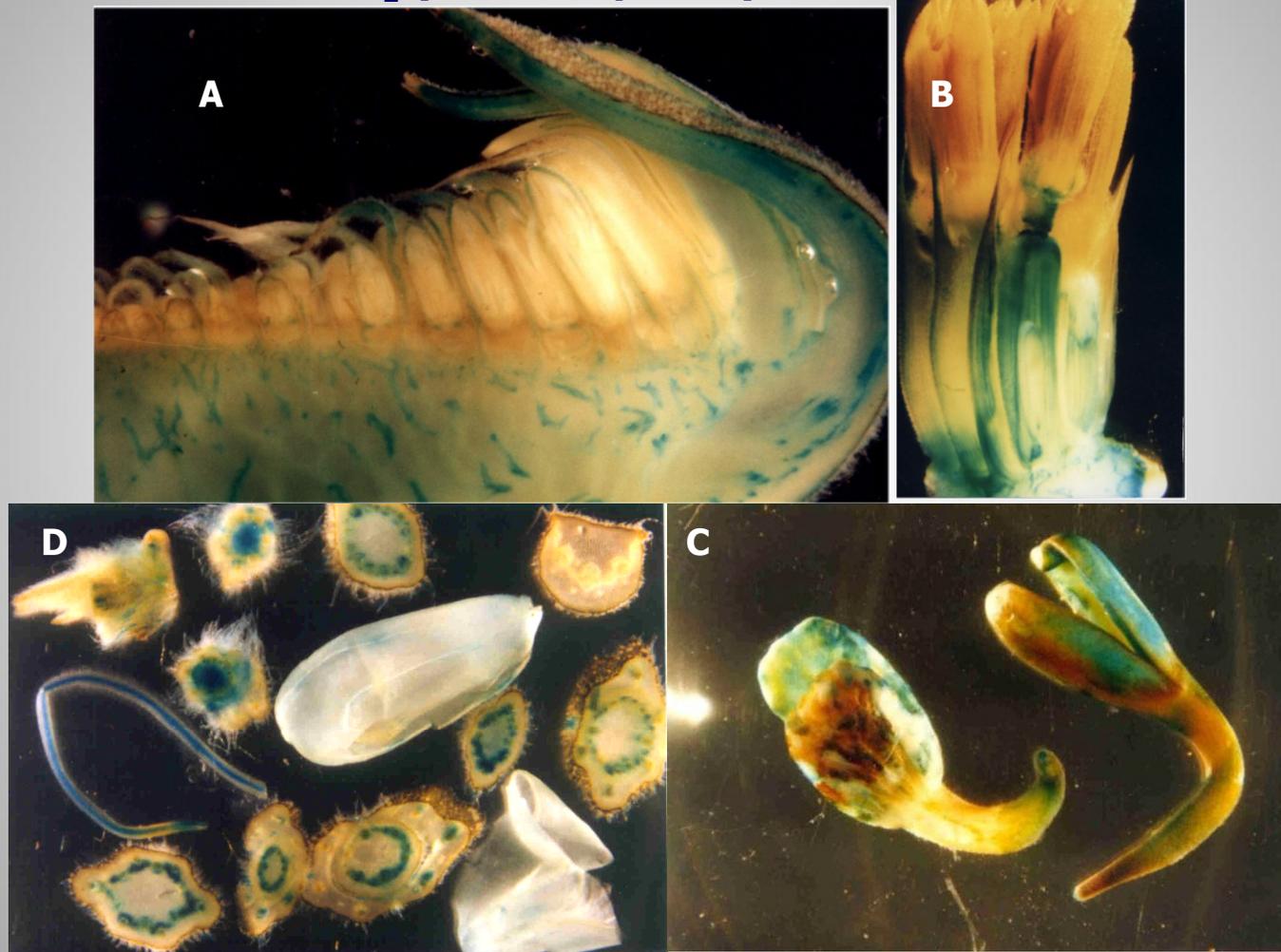
Маркерные гены β -глюкоронидаза - *uidA*



Мониторинг транзientной экспрессии гена
 β -глюкоронидазы *uidA*, при биобаллистической трансформации
подсолнечника: А – незрелых зародышах, В – семядолях подсолнечника.
(Гапоненко, 1993)

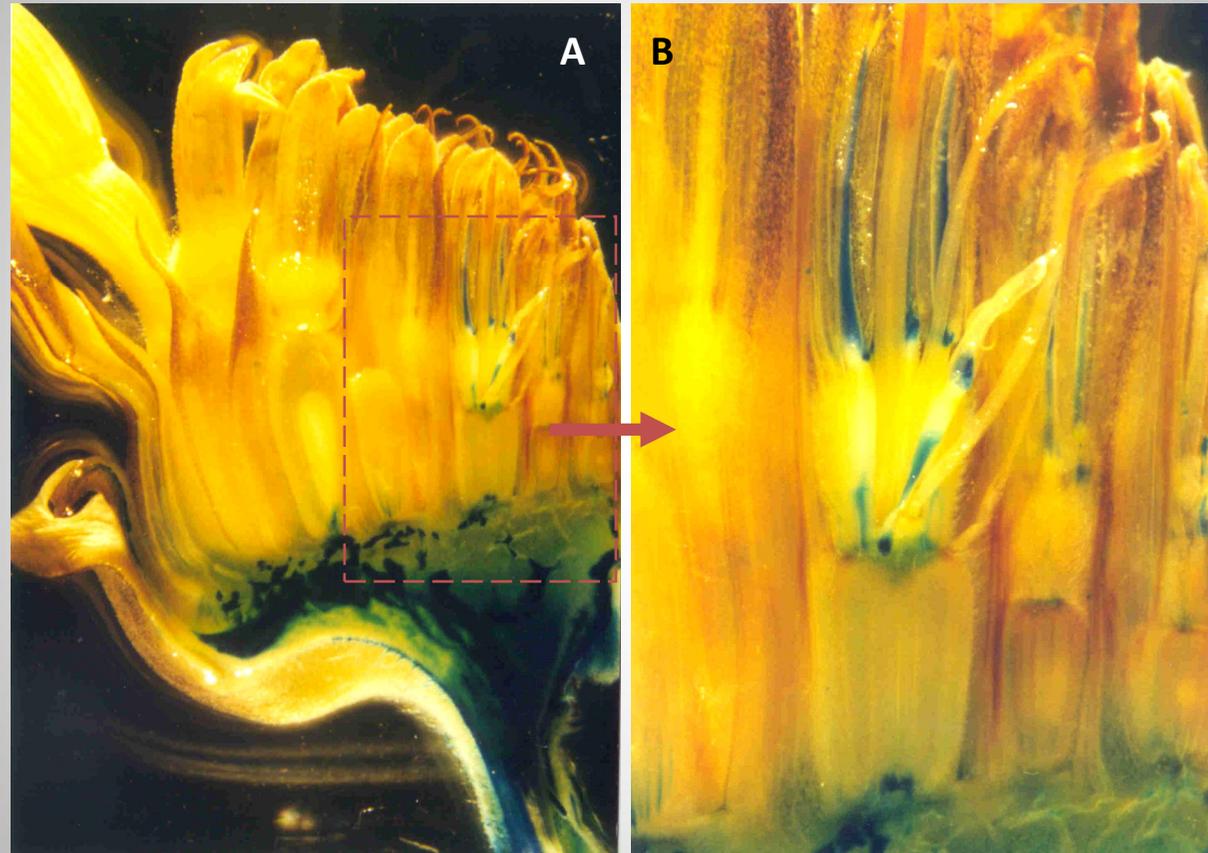
Экспрессия маркерного гена гена β -глюкозидазы - *uidA* в трансгенном подсолнечнике:

A – разрез незрелого соцветия; **B** – цветках и развивающихся семенах;
C – прорастающих семенах T_1 (2ой генерации) и **D** – различных тканях растения.



(Гапоненко, 1997)

Экспрессия маркерного гена гена β -глюкоронидазы - *uidA* в трансгенном подсолнечнике: **A** – разрез незрелого соцветия;
B – специфическая экспрессия гена *uidA* в пыльцевых нитях.



(Гапоненко, 1997)



**Введение в генетическую
инженерию растений:
молекулярные механизмы,
методы и практика.**

*Профессор, д.б.н., А.К.Гапоненко,
Главный научный сотрудник Института
Биологии Развития им. Н.К.Кольцова РАН.*