

Генная инженерия и геномное редактирование растений

Брускин Сергей, к.б.н.,
Зав. лабораторией функциональной геномики
ИОГен РАН

Пример применения методов геномного редактирования томатов

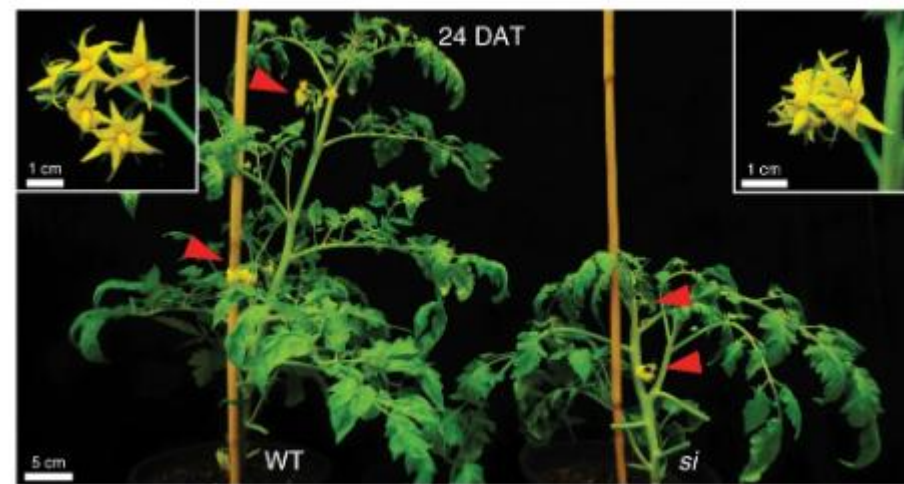
nature
biotechnology

LETTERS

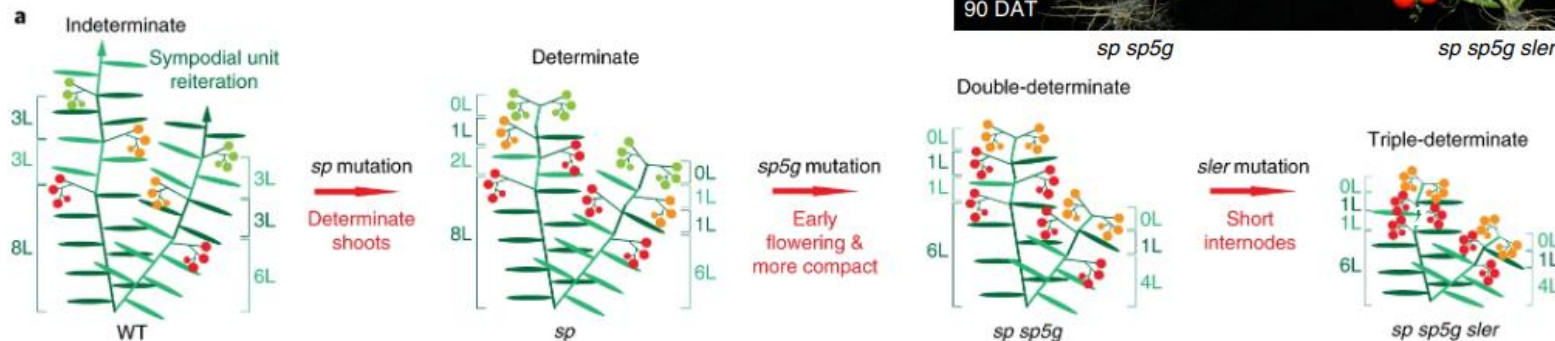
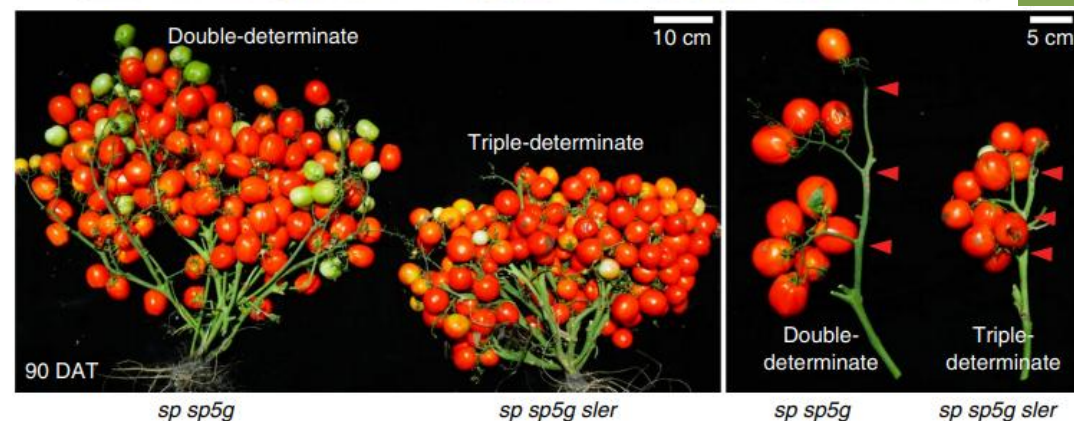
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0361-2>

Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture

Choon-Tak Kwon¹, Jung Heo², Zachary H. Lemmon^{1,8}, Yossi Capua^{3,9}, Samuel F. Hutton⁴, Joyce Van Eck^{5,6}, Soon Ju Park² and Zachary B. Lippman^{1,7*}

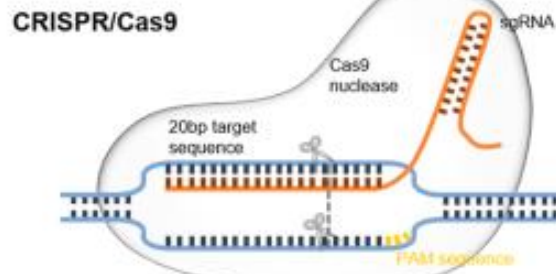
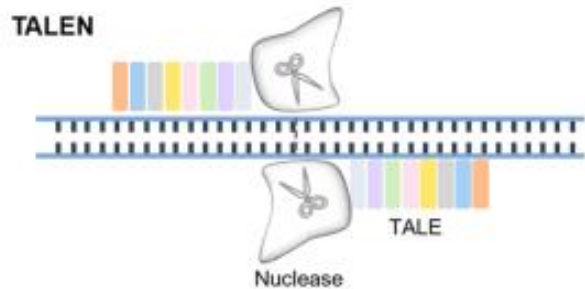
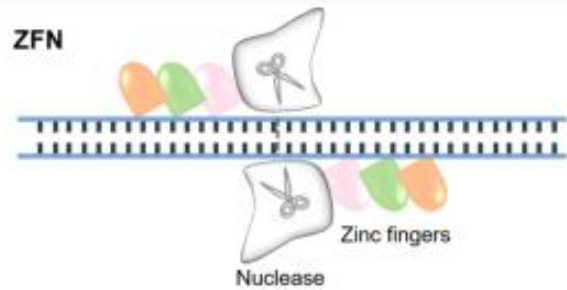


регулятор длины стебля SLER
регулятор времени цветения SP5G
регулятор роста SP

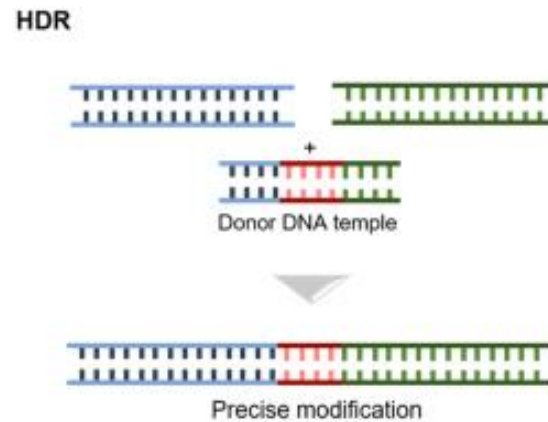
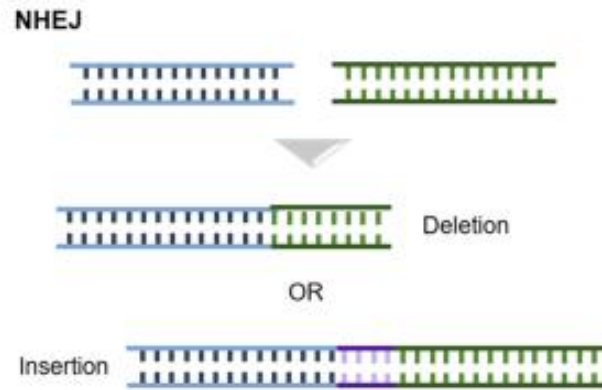


Геномное редактирование: принцип действия

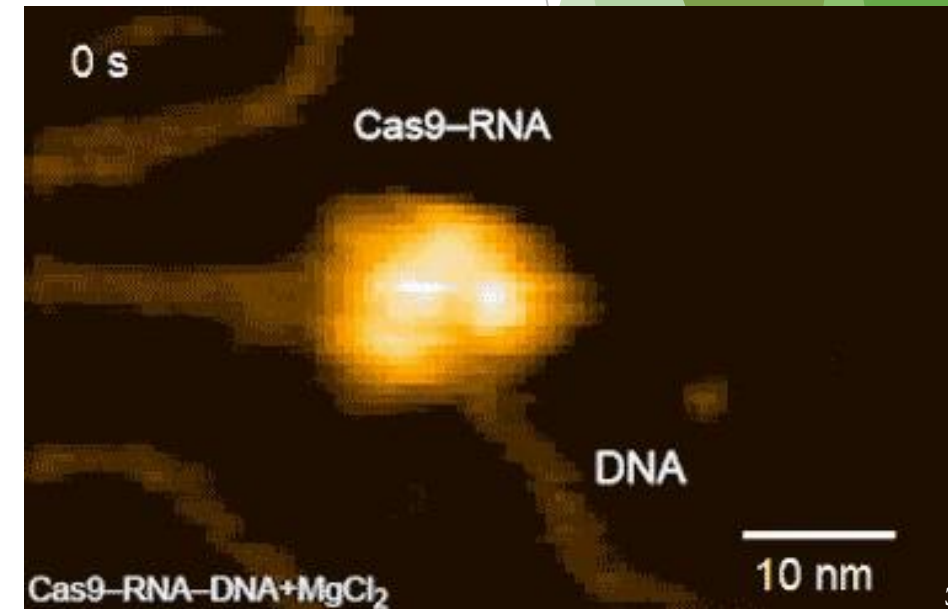
Double strand break



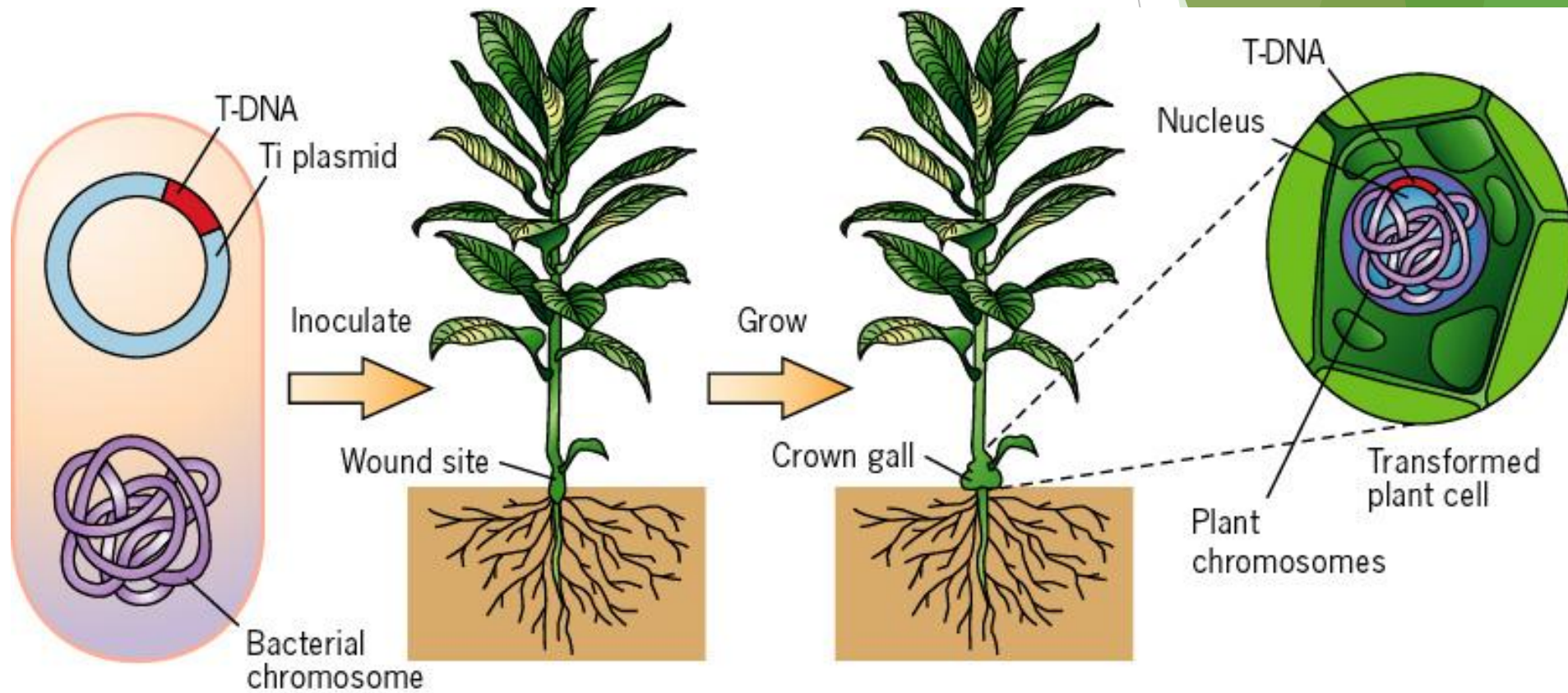
Double strand repair



CRISPR in Action. The Cas9/sgRNA complex cleaving DNA visualized by high speed atomic force microscopy

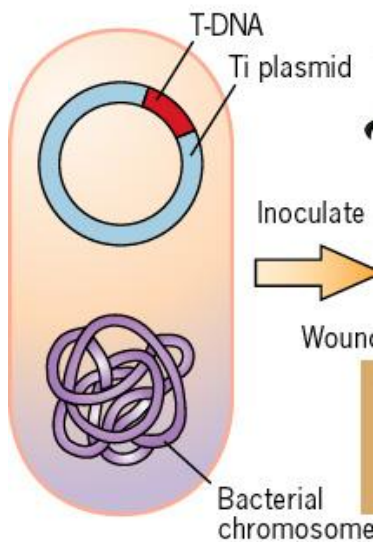


Трансформация клеток растений бактерией *Agrobacterium tumefaciens*



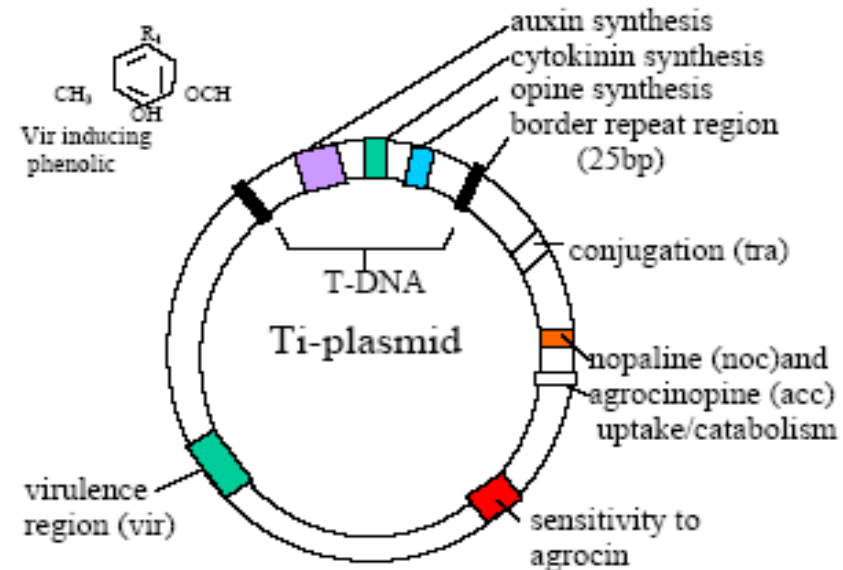
Agrobacterium tumefaciens

Ti-плазмиды

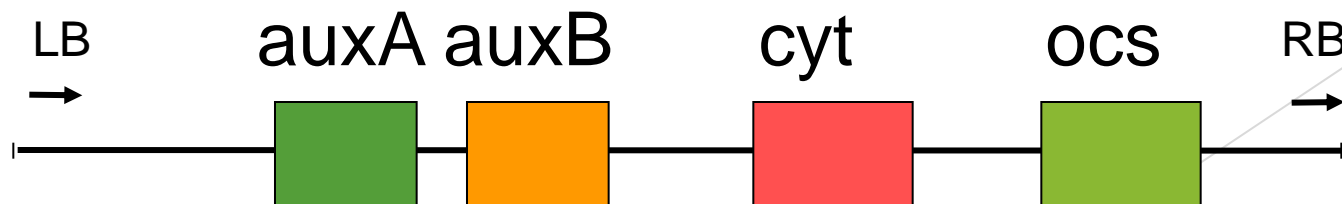


Agrobacterium tumefaciens

- ▶ Большие - 200 кВ
- ▶ ~ 10% переносится в геном растений (Т-ДНК)
- ▶ Ti-плазмиды также несут:
 - Гены метаболизма опинов
 - Гены синтеза ауксина
 - Гены синтеза цитокинина
 - Белки, вовлеченные в мобилизацию Т-ДНК (*Vir* гены).

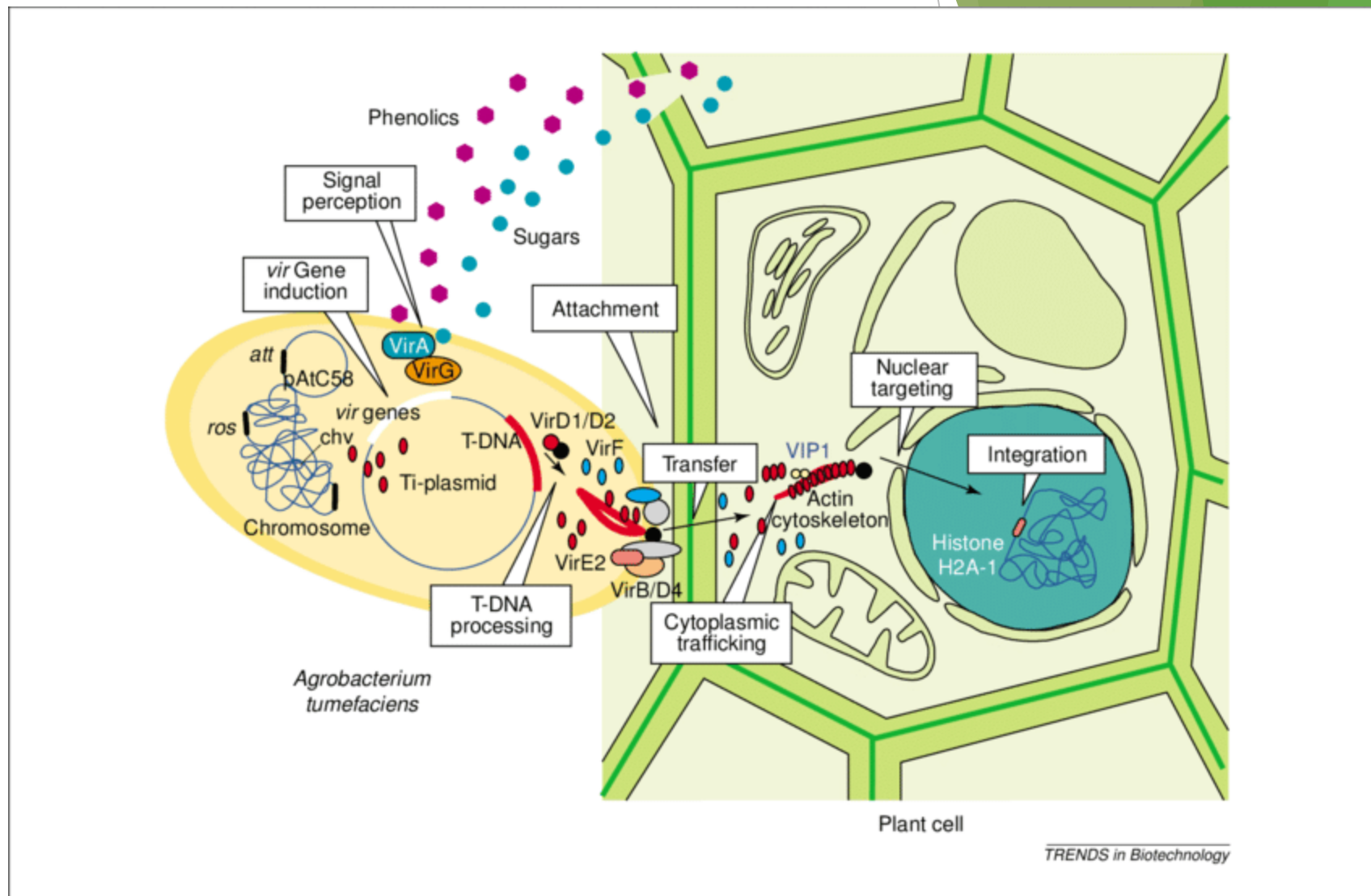


Т-ДНК



Функции *Vir* генов

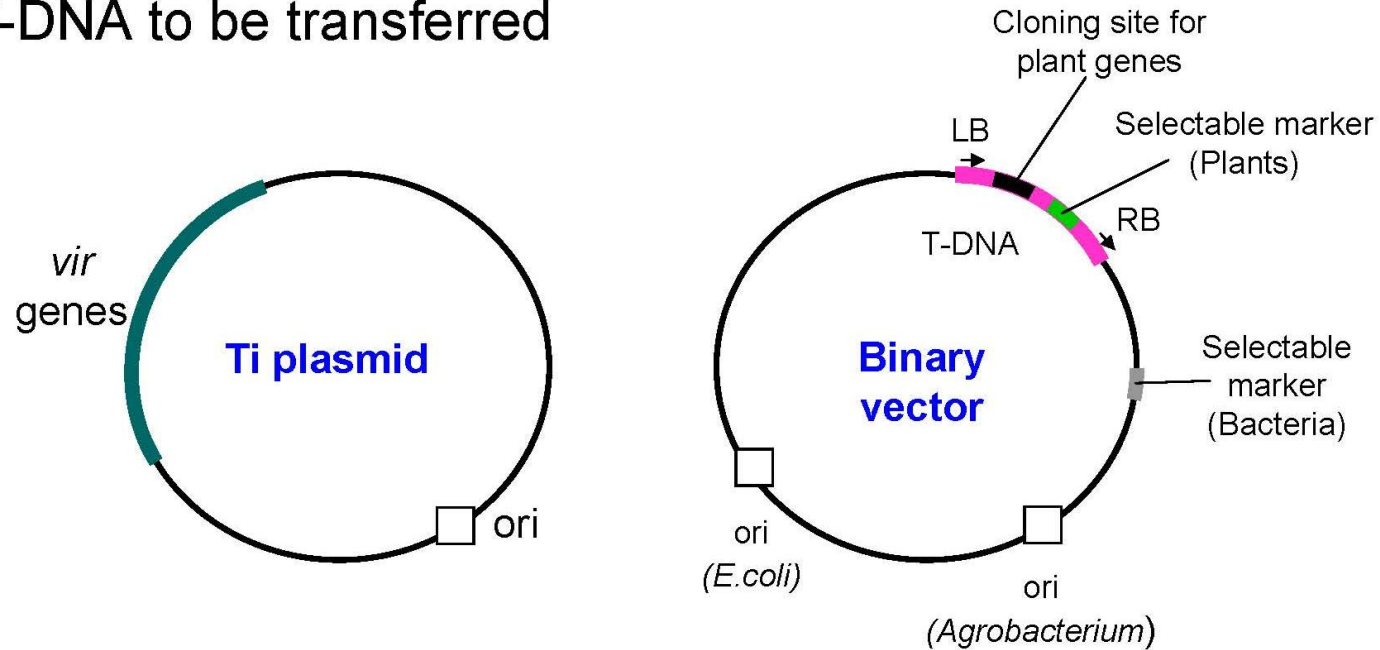
- ▶ *virA* - транспорт ацетосирингона в бактериальную клетку, посттрансляционная активация *virG* (фосфорилирование)
- ▶ *virG* - активирует транскрипцию других *vir* генов
- ▶ *virD2* - эндонуклеаза/интеграза, режет Т-ДНК по бордерам
- ▶ *virE2* - связывается с Т-ДНК, осуществляет ее перенос через растительные мембраны
- ▶ *virE1* - шаперон для *virE2*
- ▶ *virD2* & *virE2* имеют NLSs, направляют Т-ДНК в ядро клеток растений
- ▶ *virB* - оперон, 11 белков, перенос Т-ДНК через бактериальную мембрану



Индукция *vir*-генов происходит под действием арабинозы, галактозы, фенольных соединений

Agrobacterium tumefaciens как инструмент генной инженерии

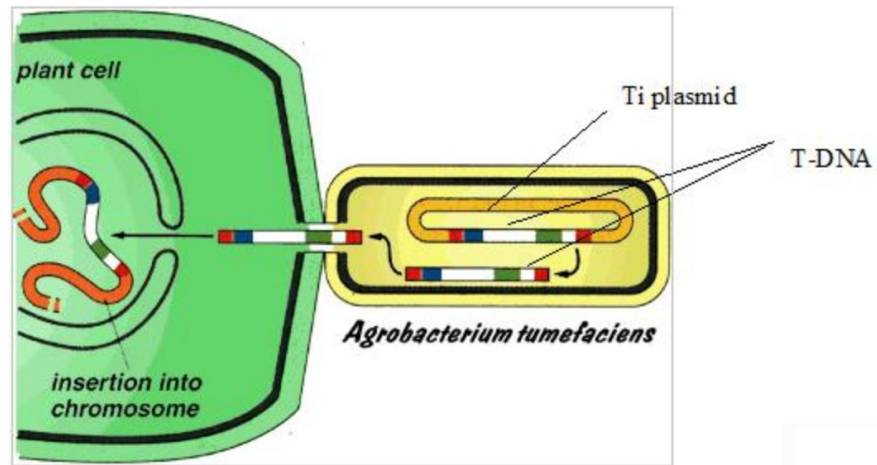
- *vir* genes and T-DNA can be on separate plasmids
- only left and right borders (LB & RB) are required for T-DNA to be transferred



Основные методы трансформации растений

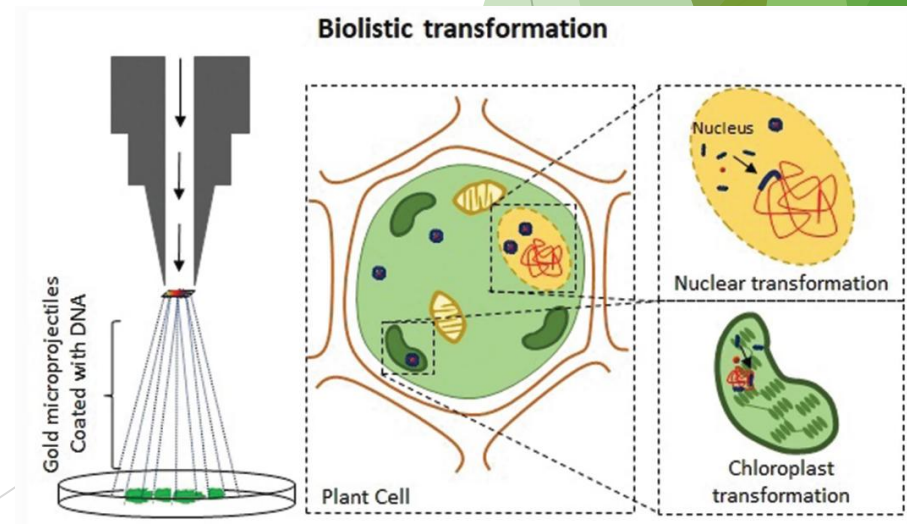
► Агробактериальная трансформация

Трансформация листовых дисков, незрелых эмбрионов, Floral Dip и т.д.

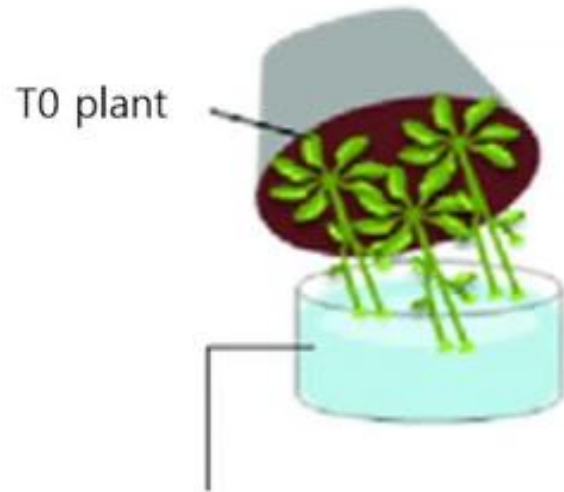


► Прямой перенос ДНК

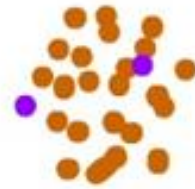
Биобаллистика, прямой перенос ДНК в протопласты



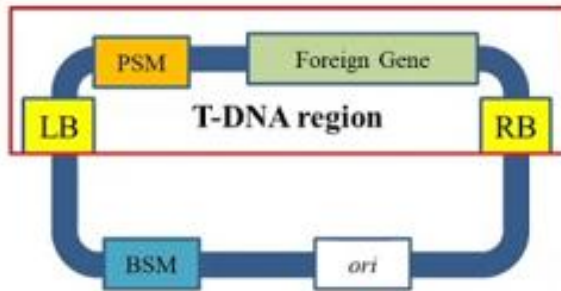
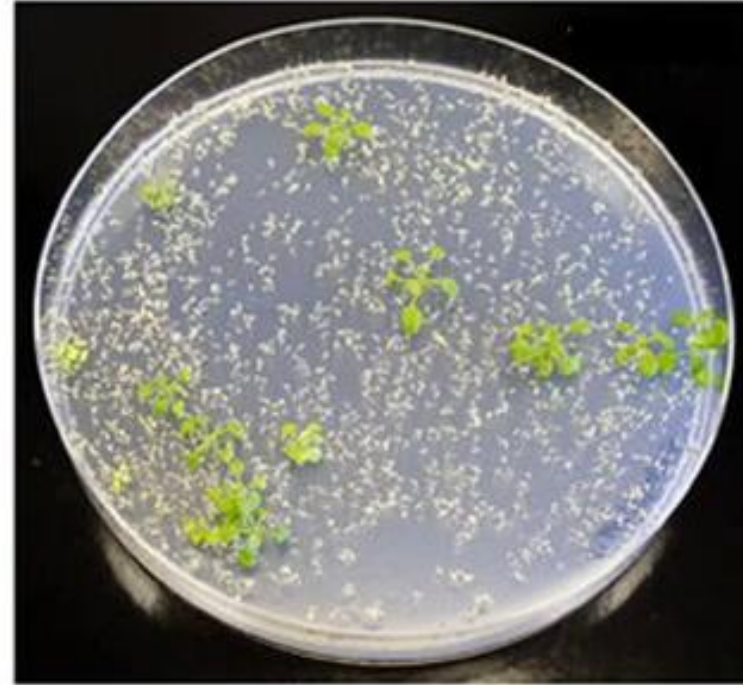
Floral Dip Method



T1 seeds

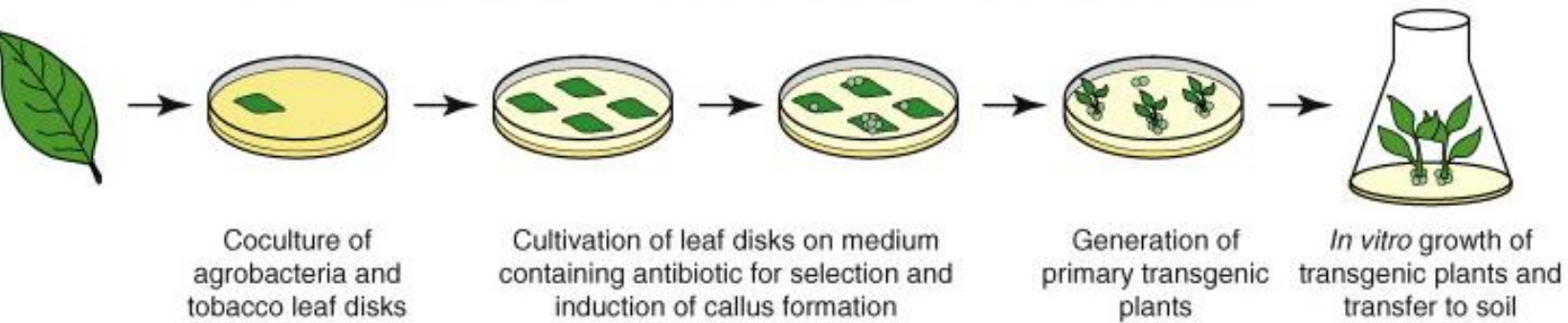


T1 plants (Heterozygotes)



-PSM: Plant selection marker

Агробактериальная трансформация ЛИСТОВЫХ ДИСКОВ

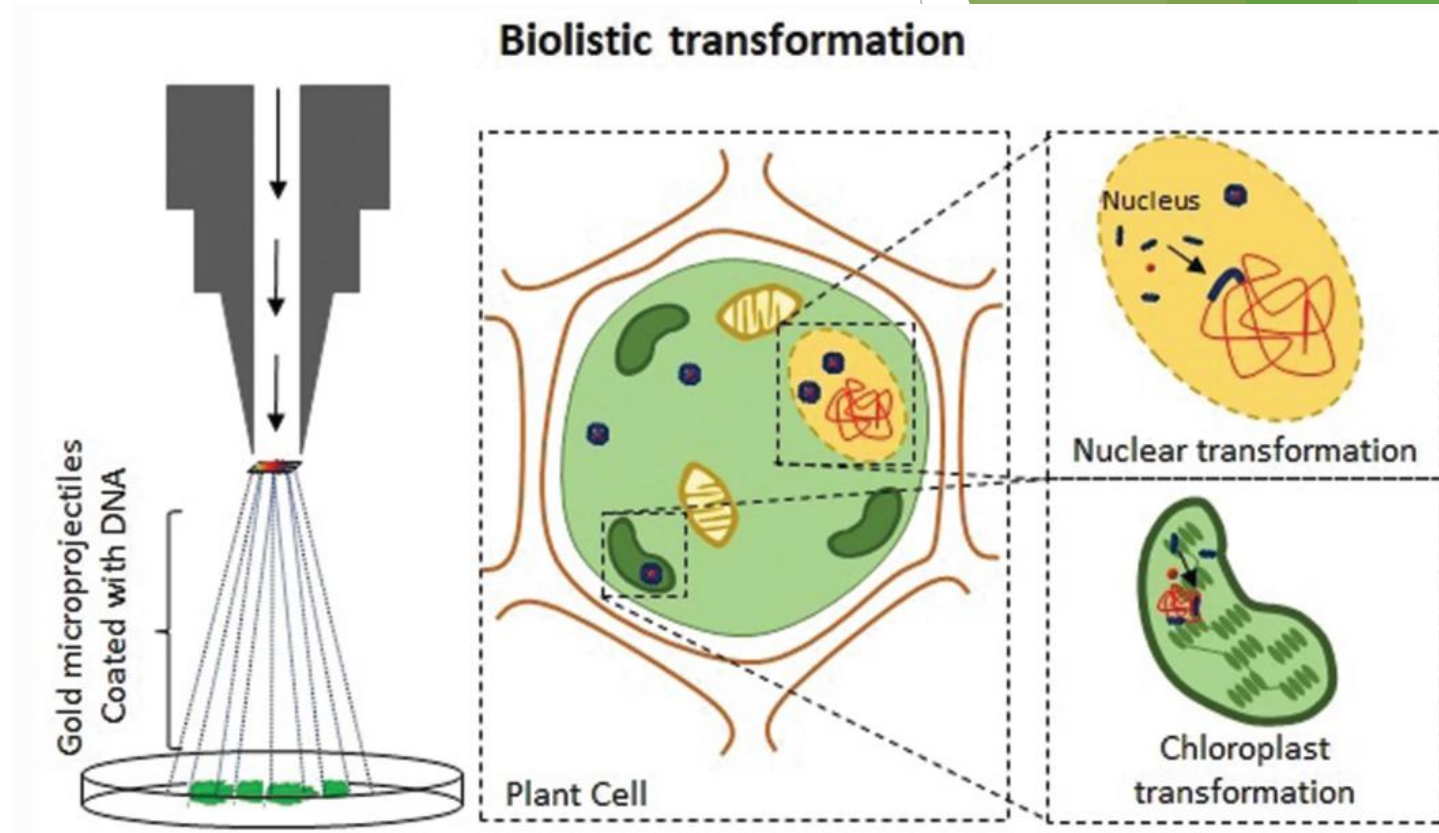


Биобаллистика

- ▶ Можно использовать клетки с клеточной стенкой, любая ткань.
- ▶ Можно трансформировать органеллы!

▶ Методика:

1. Преципитация ДНК на частицах вольфрама или золота.
2. «стрельба» частицами из «пушки», т.е. введение ДНК в клетку растения.
3. Отбор и регенерация устойчивых растений



Повышение эффективности генетической трансформации растений

Повышение эффективности агробактериального переноса T-ДНК

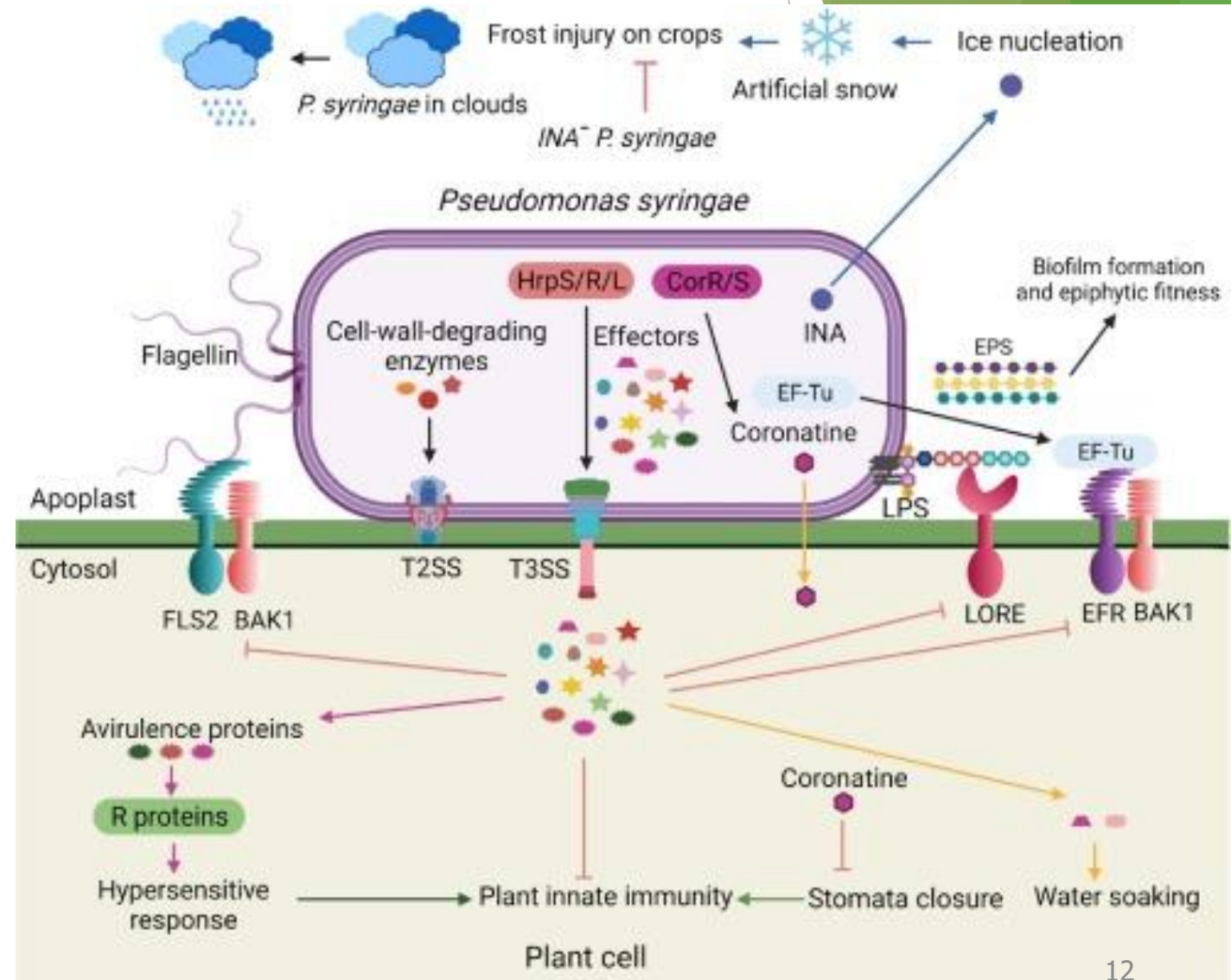
Article | [Open access](#) | [Published: 11 May 2022](#)

***Agrobacterium* expressing a type III secretion system delivers *Pseudomonas* effectors into plant cells to enhance transformation**

[Vidhyavathi Raman](#), [Clemencia M. Rojas](#), [Balaji Vasudevan](#), [Kevin Dunning](#), [Jaydeep Kolape](#), [Sunhee Oh](#), [Jianfei Yun](#), [Lishan Yang](#), [Guangming Li](#), [Bikram D. Pant](#), [Qingzhen Jiang](#) & [Kirankumar S. Mysore](#) ✉

[Nature Communications](#) **13**, Article number: 2581 (2022) | [Cite this article](#)

увеличение эффективности агробактериальной трансформации пшеницы, люцерны и проса на ~250–400%




Повышение эффективности генетической трансформации растений

Повышение
эффективности
агробактериального
переноса T-ДНК

Article | [Open access](#) | [Published: 11 May 2022](#)

***Agrobacterium* expressing a type III secretion system delivers *Pseudomonas* effectors into plant cells to enhance transformation**

[Vidhyavathi Raman](#), [Clemencia M. Rojas](#), [Balaji Vasudevan](#), [Kevin Dunning](#), [Jaydeep Kolape](#), [Sunhee Oh](#), [Jianfei Yun](#), [Lishan Yang](#), [Guangming Li](#), [Bikram D. Pant](#), [Qingzhen Jiang](#) & [Kirankumar S. Mysore](#) 

[Nature Communications](#) **13**, Article number: 2581 (2022) | [Cite this article](#)

Engineered *A. tumefaciens* strains expressing a T3SS and *AvrPto* increase the transient and stable transformation efficiency of Arabidopsis

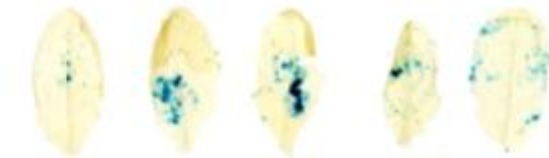
EHA105
(pCAMBIA1301)



EHA105
(pCAMBIA1301, vector, pLN18)



EHA105
(pCAMBIA1301, *AvrPto*)



EHA105
(pCAMBIA1301, *AvrPto*, pLN18)



Повышение эффективности генетической трансформации растений

Повышение
эффективности
агробактериального
переноса T-ДНК

Article | [Open access](#) | [Published: 11 May 2022](#)

***Agrobacterium* expressing a type III secretion system delivers *Pseudomonas* effectors into plant cells to enhance transformation**

[Vidhyavathi Raman](#), [Clemencia M. Rojas](#), [Balaji Vasudevan](#), [Kevin Dunning](#), [Jaydeep Kolape](#), [Sunhee Oh](#), [Jianfei Yun](#), [Lishan Yang](#), [Guangming Li](#), [Bikram D. Pant](#), [Qingzhen Jiang](#) & [Kirankumar S. Mysore](#) 

[Nature Communications](#) **13**, Article number: 2581 (2022) | [Cite this article](#)

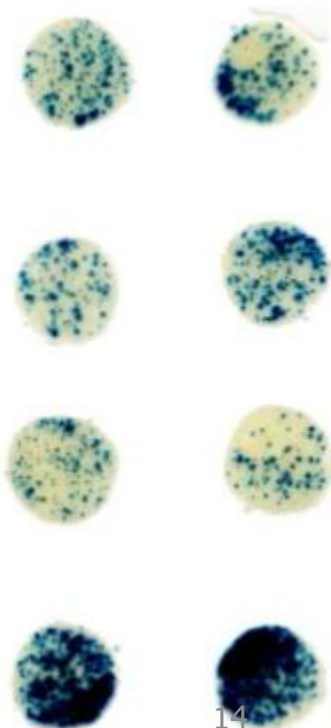
Engineered *A. tumefaciens* strains expressing a T3SS and *AvrPto* increase the transient and stable transformation efficiency of *N. benthamiana*

GV2260
(pCAMBIA1301)

GV2260
(pCAMBIA1301, vector, pLN18)

GV2260
(pCAMBIA1301, *AvrPto*)

GV2260
(pCAMBIA1301, *AvrPto*, pLN18)



Повышение эффективности генетической трансформации растений

Повышение эффективности регенерации растений

Article | [Open access](#) | [Published: 09 February 2023](#)

Leaf transformation for efficient random integration and targeted genome modification in maize and sorghum

[Ning Wang](#), [Larisa Ryan](#), [Nagesh Sardesai](#), [Emily Wu](#), [Brian Lenderts](#), [Keith Lowe](#), [Ping Che](#), [Ajith Anand](#), [Andrew Worden](#), [Daleen van Dyk](#), [Pierluigi Barone](#), [Sergei Svtashev](#), [Todd Jones](#) & [William Gordon-Kamm](#)



[Nature Plants](#) **9**, 255–270 (2023) | [Cite this article](#)

Table 1

Morphogenic transcription factors used for plant transformation.

MTF	Plants	Mechanism	Abnormal phenotype
AGL15	<i>Arabidopsis</i> [43], cotton [44], and soybean [43]	Embryogenesis	Yes
BBM	<i>Arabidopsis</i> [45], cacao [46], canola [45], maize [8••], poplar [47], rice [48••], sweet pepper [49], and tobacco [50]	Organogenesis/embryogenesis	Yes
BBM/WUS	Maize [4,8••,17,51,52], rice [8••], sorghum [8••,53,54], sugarcane [8••], switchgrass [24], and tef [25]	Embryogenesis	Yes
CUC1/2	<i>Arabidopsis</i> [55]	Organogenesis	Yes
ESR1/2	<i>Arabidopsis</i> [56,57]	Organogenesis	No
GRF4–GIF1	Lemon[9••], rice[9••], and wheat [9••]	Organogenesis/embryogenesis	No
GRF5	Maize [10••], soybean [10••], sugar beet [10••], and sunflower [10••]	Organogenesis/embryogenesis	No
IPT	Aspen[58], lettuce [59], and tobacco [59]	Organogenesis	No
IPT/WUS2	<i>Arabidopsis</i> [21••], <i>Nicotiana benthamiana</i> [21••], tobacco [21••], and tomato [21••]	Organogenesis	No
Kn1/NTH	Tobacco [60,61], orange[62], and lemon [62]	Organogenesis	Yes
MPΔ	<i>Arabidopsis</i> [63]	Organogenesis	Yes
PLT5	Bok choy [22••], Pei-Tsai [22••], pepper [22••], and tomato [22••]	Organogenesis	No
RKD4	<i>Phalaenopsis</i> (orchid) [64]	Embryogenesis	No
STM	<i>Arabidopsis</i> [65]	Embryogenesis	NA
STM/WUS2	Grape[21••], potato [21••], and tobacco [21••]	Organogenesis	No
WOX2 + 8 or 2 + 9	Tobacco[66]	Organogenesis	Yes
WOX5	Barley [11••], maize [11••], rye [11••], triticale [11••], and wheat [11••]	Embryogenesis	No
WUS	Coffee [67], cotton [68], maize [18•], poplar [48••], and tobacco [69]	Embryogenesis	Yes

Повышение эффективности генетической трансформации растений

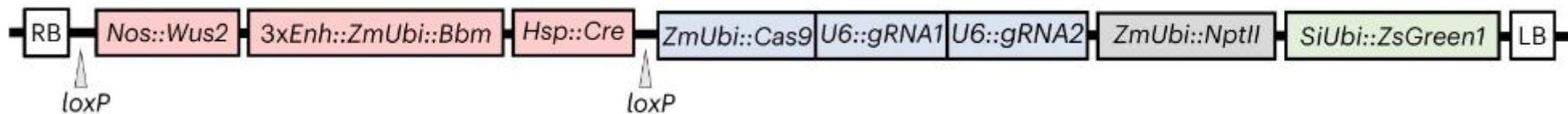
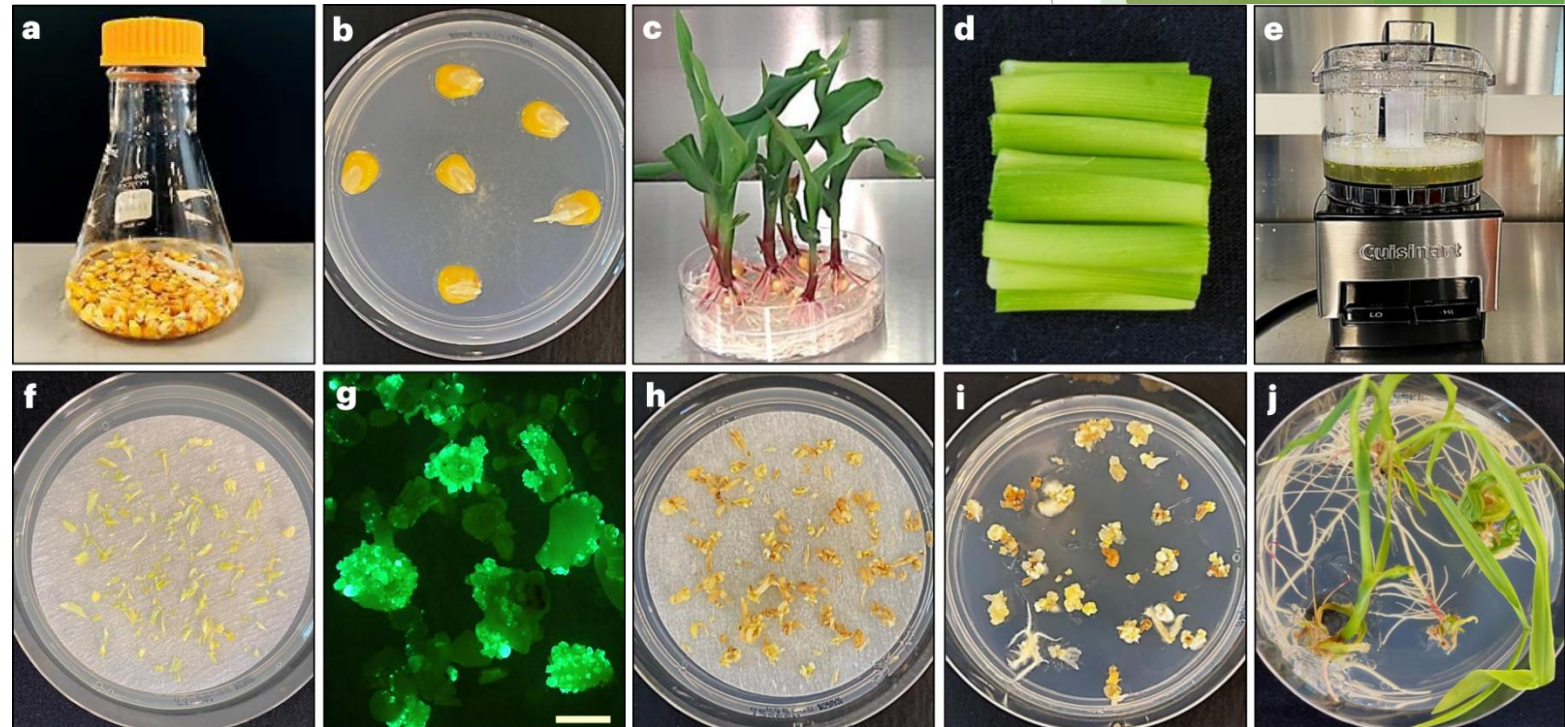
Повышение эффективности регенерации растений

Article | [Open access](#) | [Published: 09 February 2023](#)

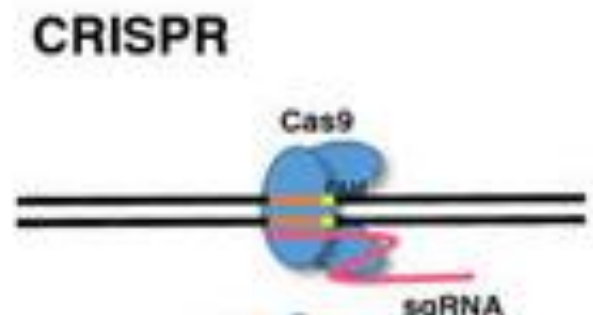
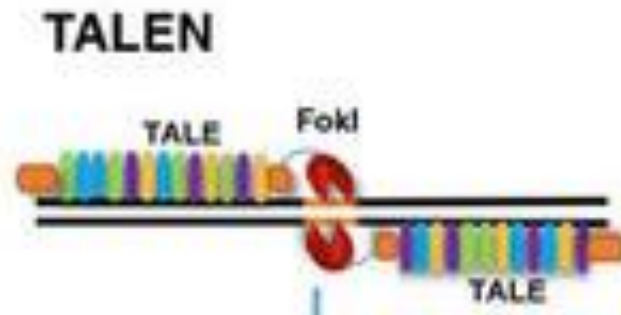
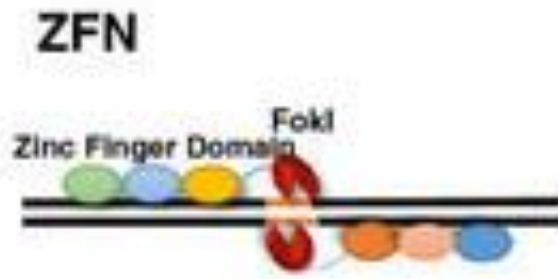
Leaf transformation for efficient random integration and targeted genome modification in maize and sorghum

[Ning Wang](#), [Larisa Ryan](#), [Nagesh Sardesai](#), [Emily Wu](#), [Brian Lenderts](#), [Keith Lowe](#), [Ping Che](#), [Ajith Anand](#), [Andrew Worden](#), [Daleen van Dyk](#), [Pierluigi Barone](#), [Sergei Svitashov](#), [Todd Jones](#) & [William Gordon-Kamm](#) [✉](#)

[Nature Plants](#) **9**, 255–270 (2023) | [Cite this article](#)

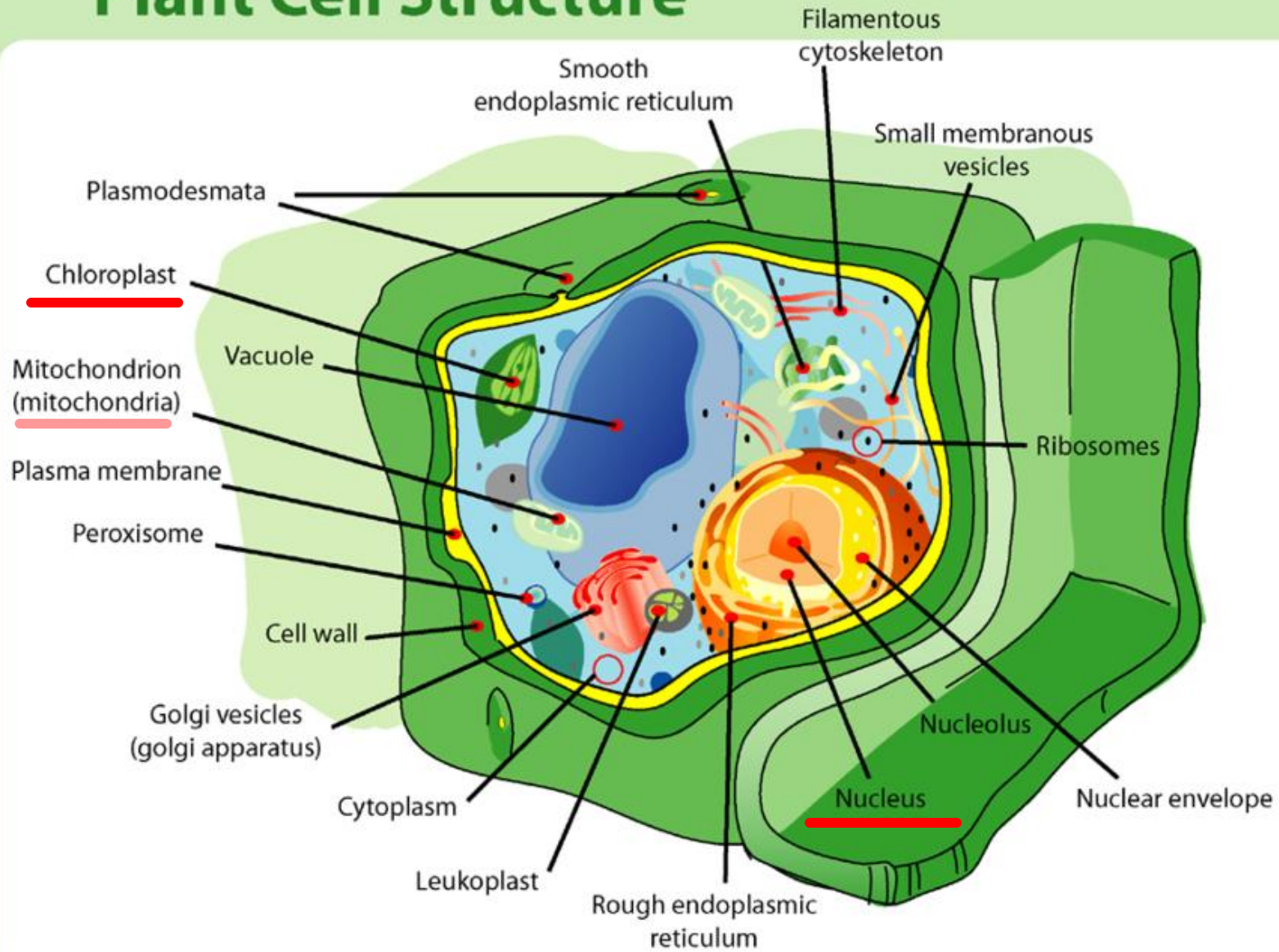


ЧТО ТАКОЕ ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ?

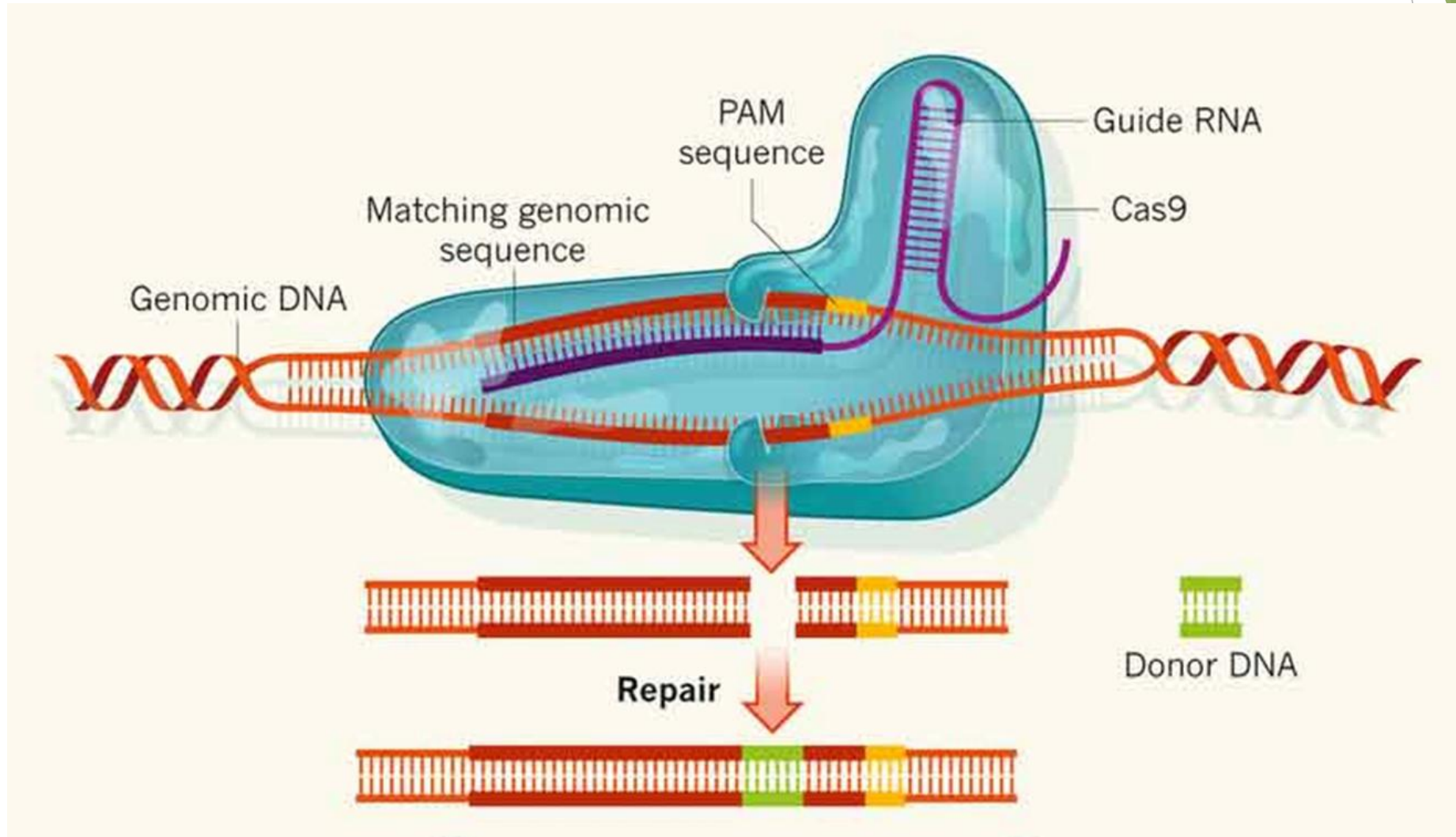


Найти нужные 20-30 нуклеотидов из миллиардов → **Разрезать**/заменить

Plant Cell Structure

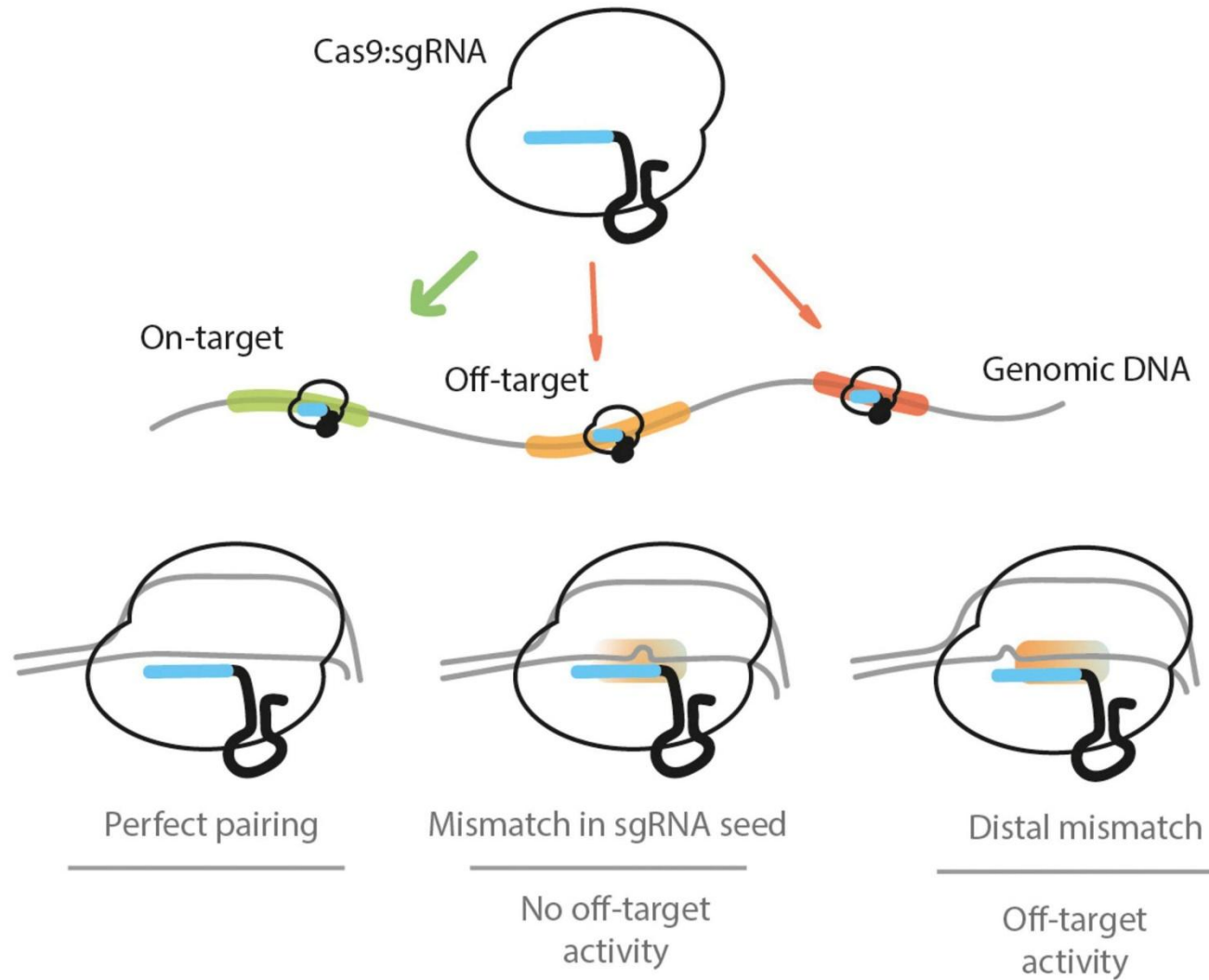


CRISPR Cas9



CRISPR Cas9

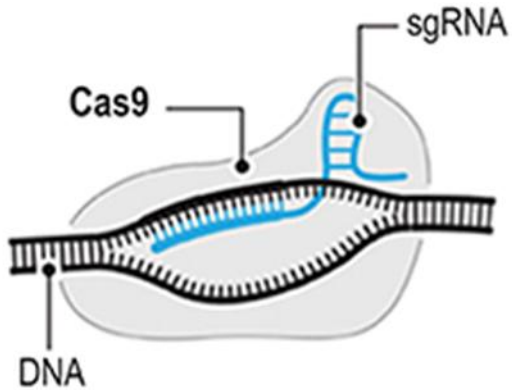
внецелевое редактирование



Методические подходы к редактированию

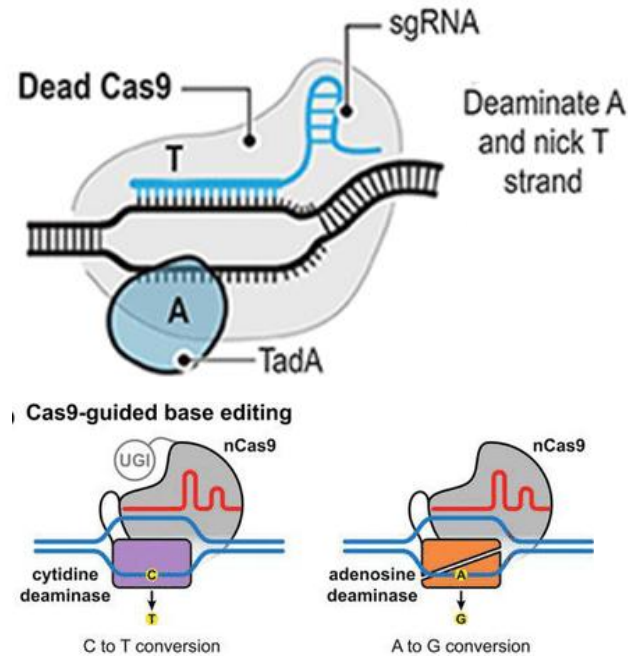
Для нокаута генов

Сайт-специфичная нуклеаза
SpCas9
Cpf1 etc.



Для замен нуклеотидов

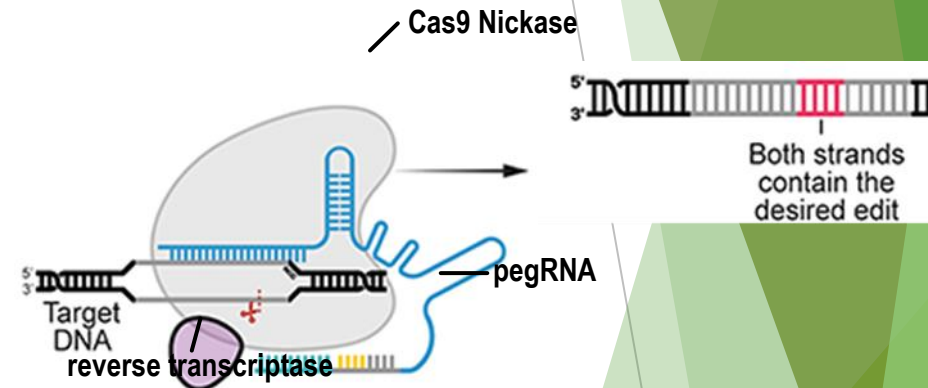
Редактор оснований



+ Uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI)

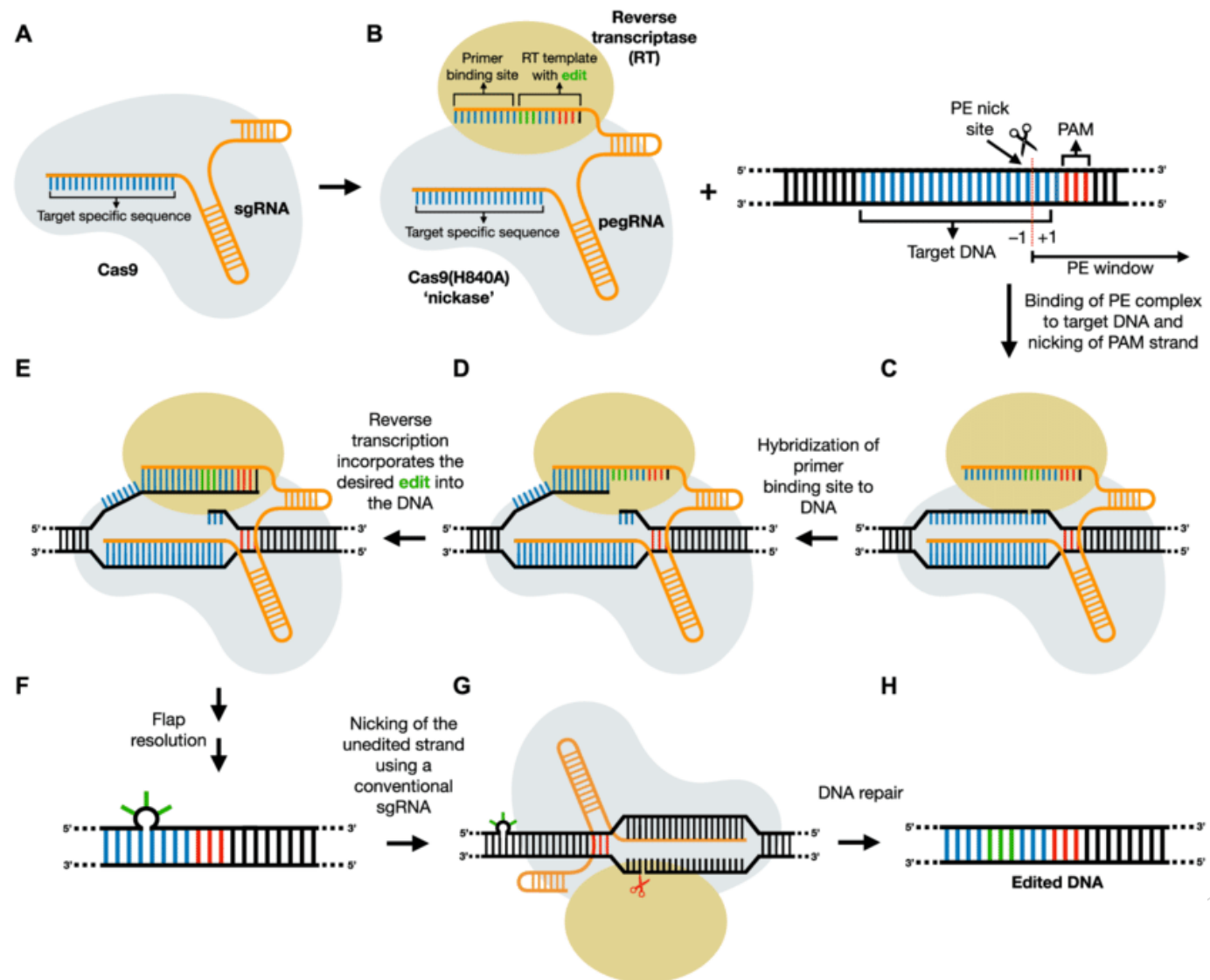
Для замен нуклеотидов и инсерций

Праймированный редактор



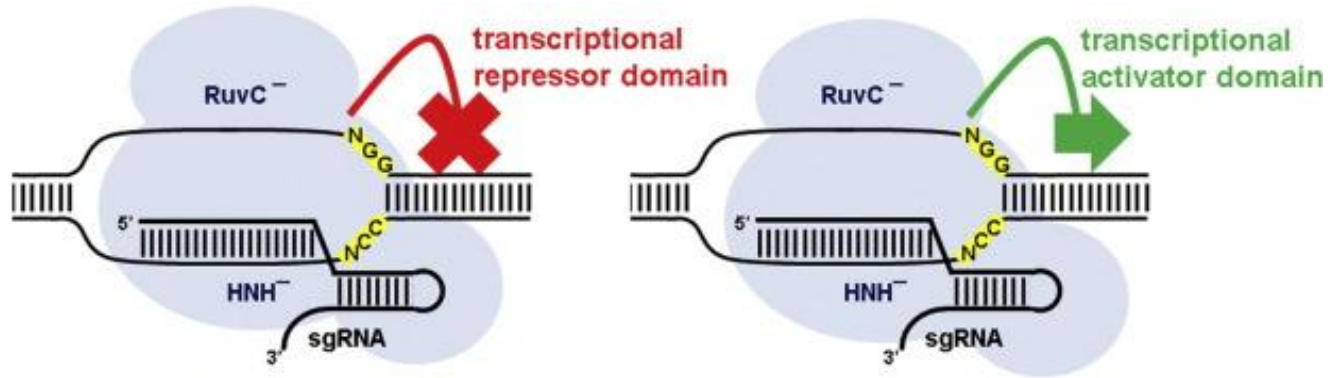
CRISPR Cas9

Праймированный редактор

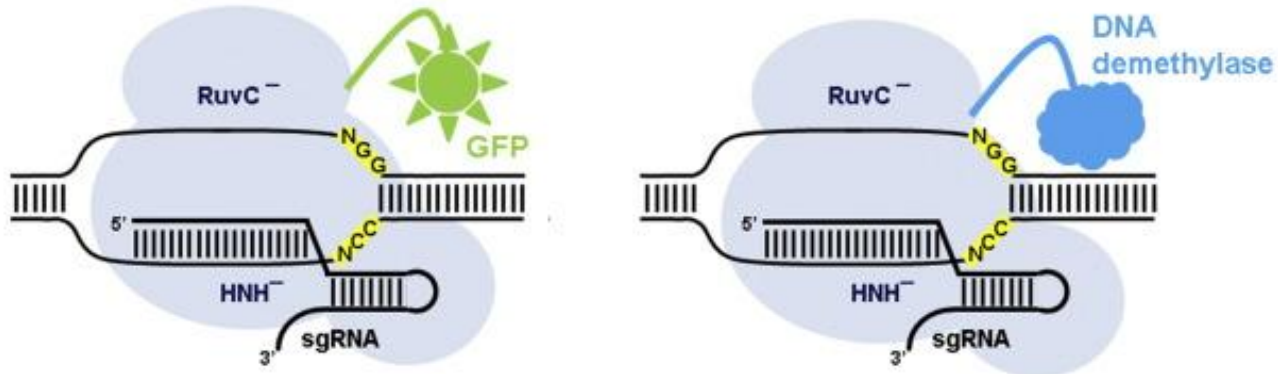


Применение системы CRISPR/Cas помимо редактирования генома

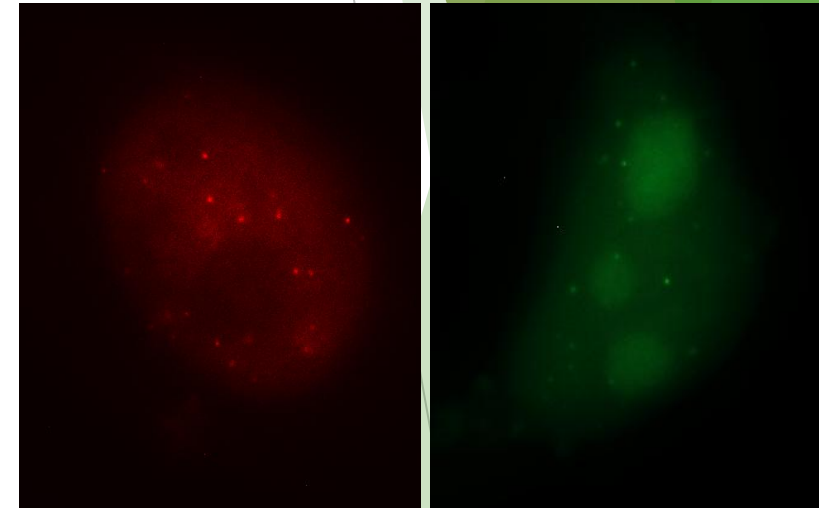
(a)
Gene regulation



(b)
Cargo delivery



Визуализация теломер



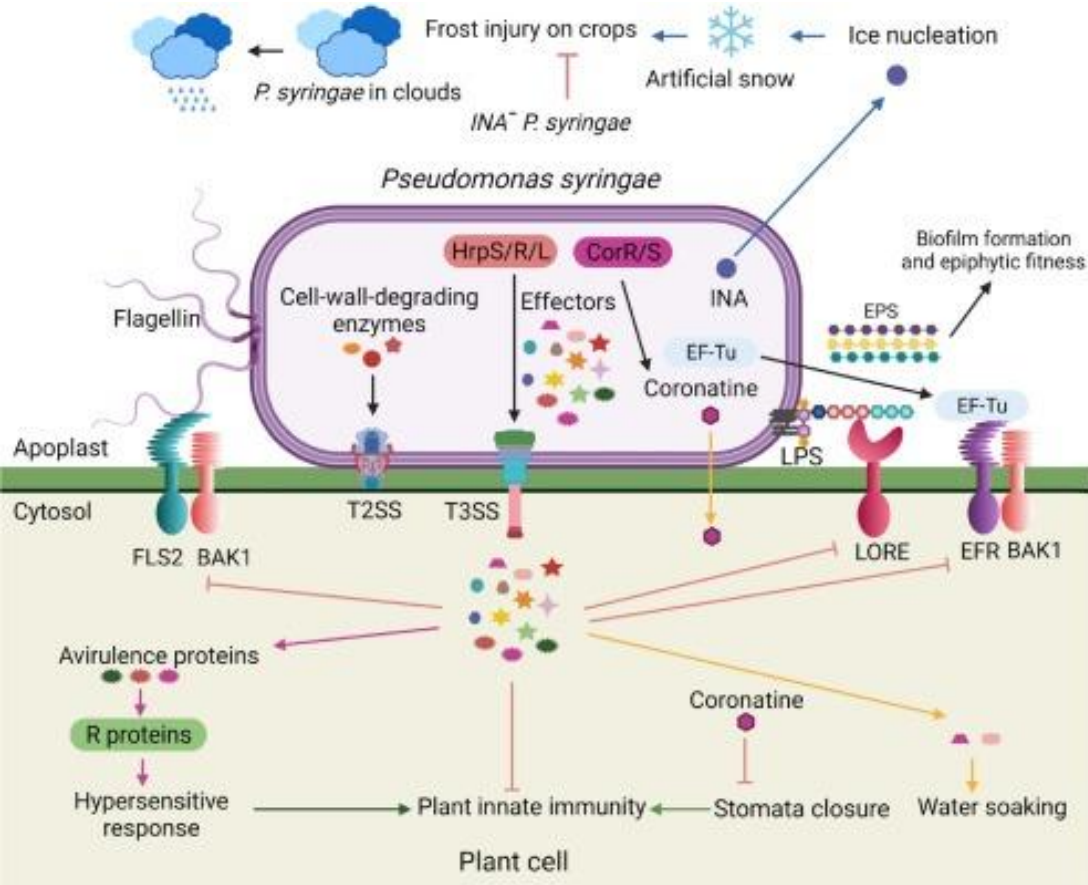
Законодательные особенности геномного редактирования

Бразилия, Аргентина, США, Австралия, Китай, Великобритания...

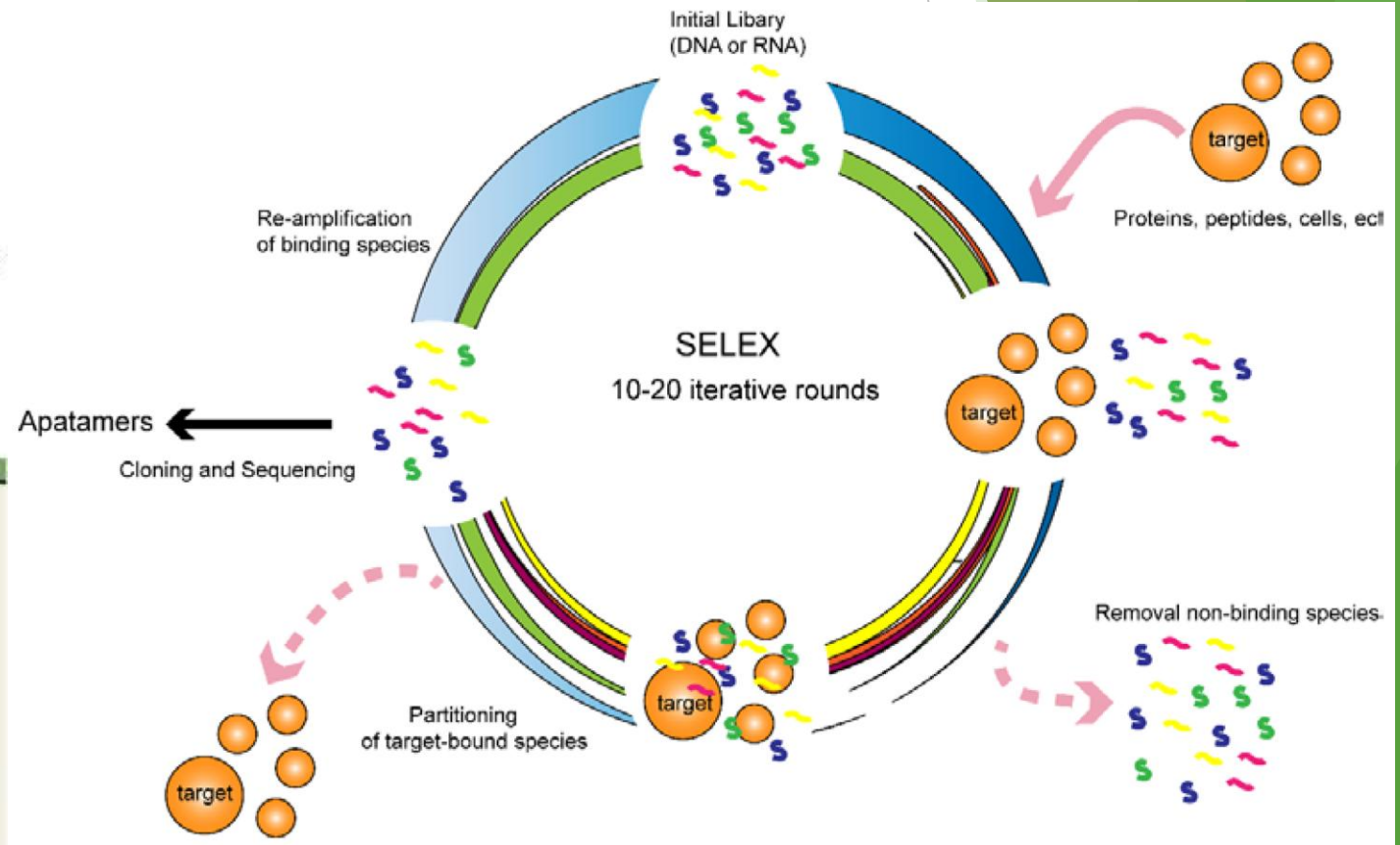
использование методов редактирования геномов, в том числе CRISPR-Cas9, не будет регулироваться, если в конечный продукт не вводится новый генетический материал

Если не ожидается, что в геноме организма будет обнаружена новая комбинация генетического материала, и организм не будут регулироваться как ГМО. В случаях, если в некоторых промежуточных поколениях метод включал трансгенез, заявитель должен предъявлять доказательства удаления трансгена из конечного продукта. Иначе это ГМО

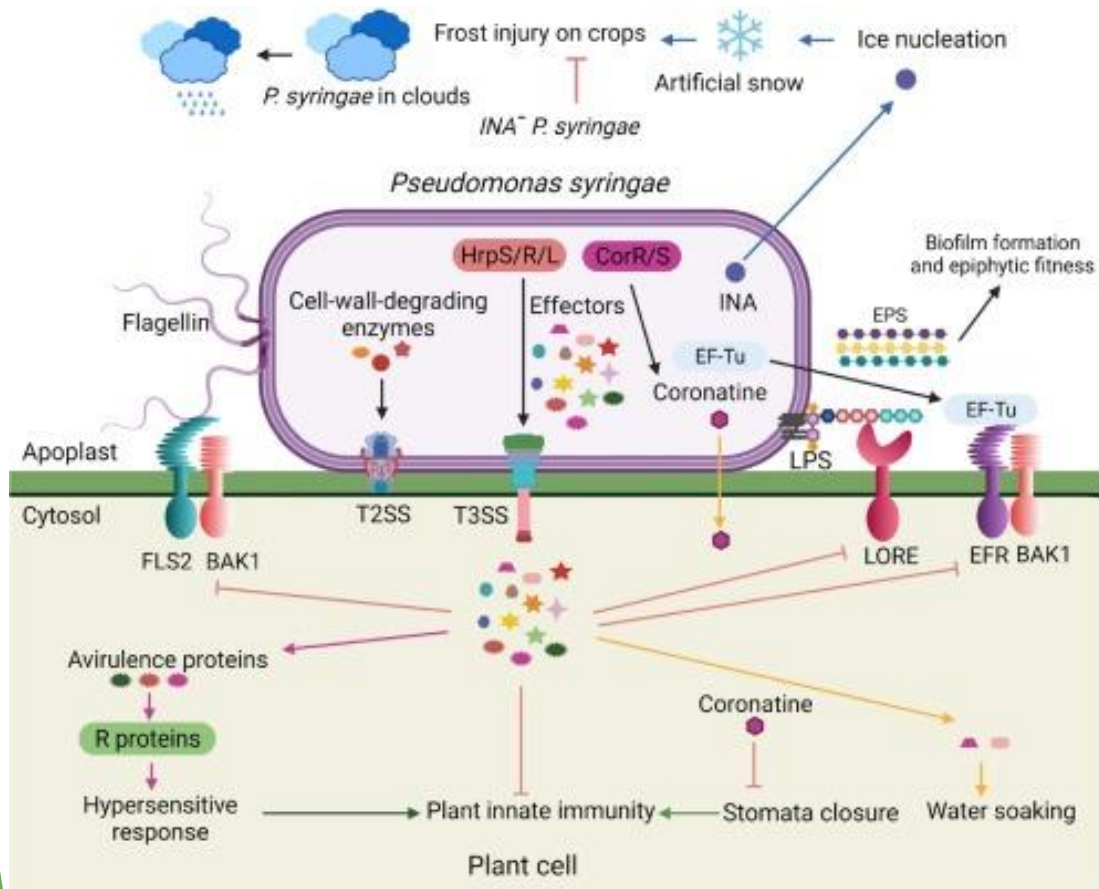
Using an RNA aptamer to inhibit the action of effector proteins of plant pathogens



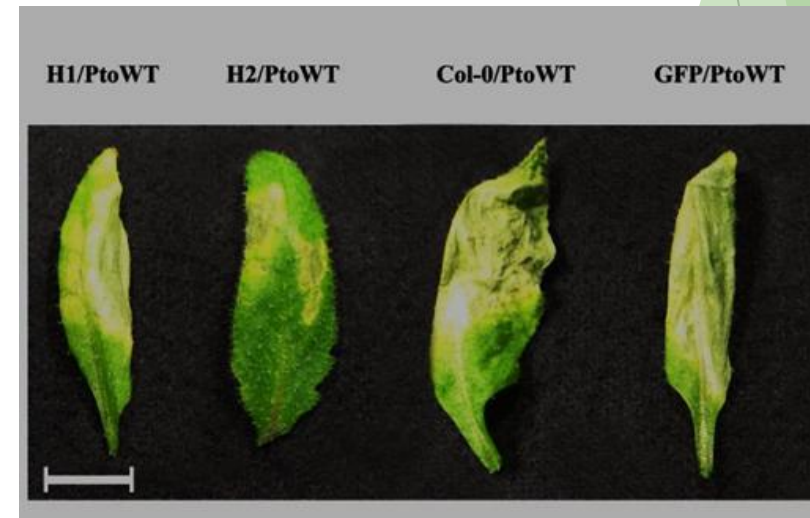
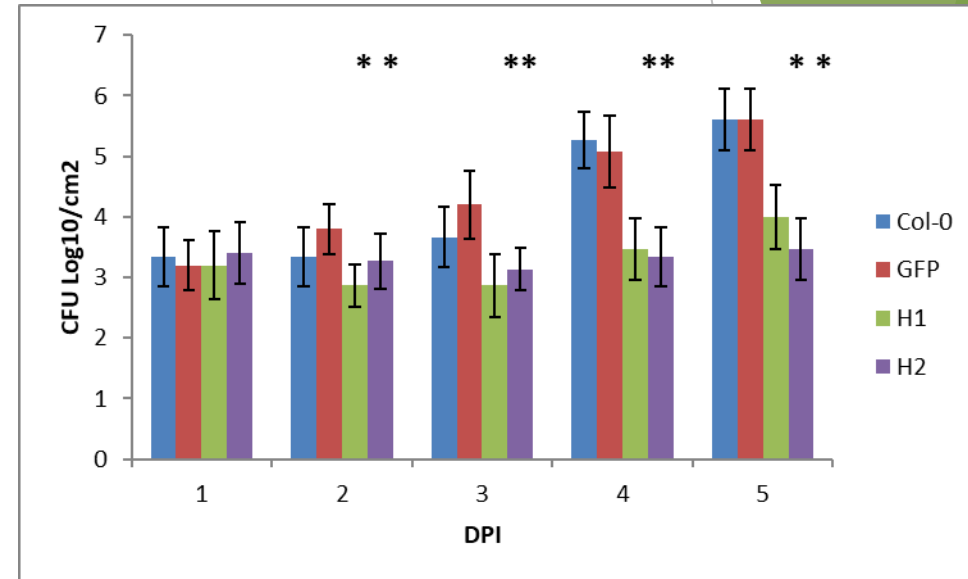
Trends in Microbiology



Using an RNA aptamer to inhibit the action of effector proteins of plant pathogens



Trends in Microbiology



Спасибо за внимание!

Применение CRISPR/CAS

[nature](#) > [nature biotechnology](#) > [news in brief](#) > article

News in Brief | [Published: 30 December 2021](#)

Japan embraces CRISPR-edited fish

[Nature Biotechnology](#) 40, 10 (2022) | [Cite this article](#)

9266 Accesses | 11 Citations | 330 Altmetric | [Metrics](#)

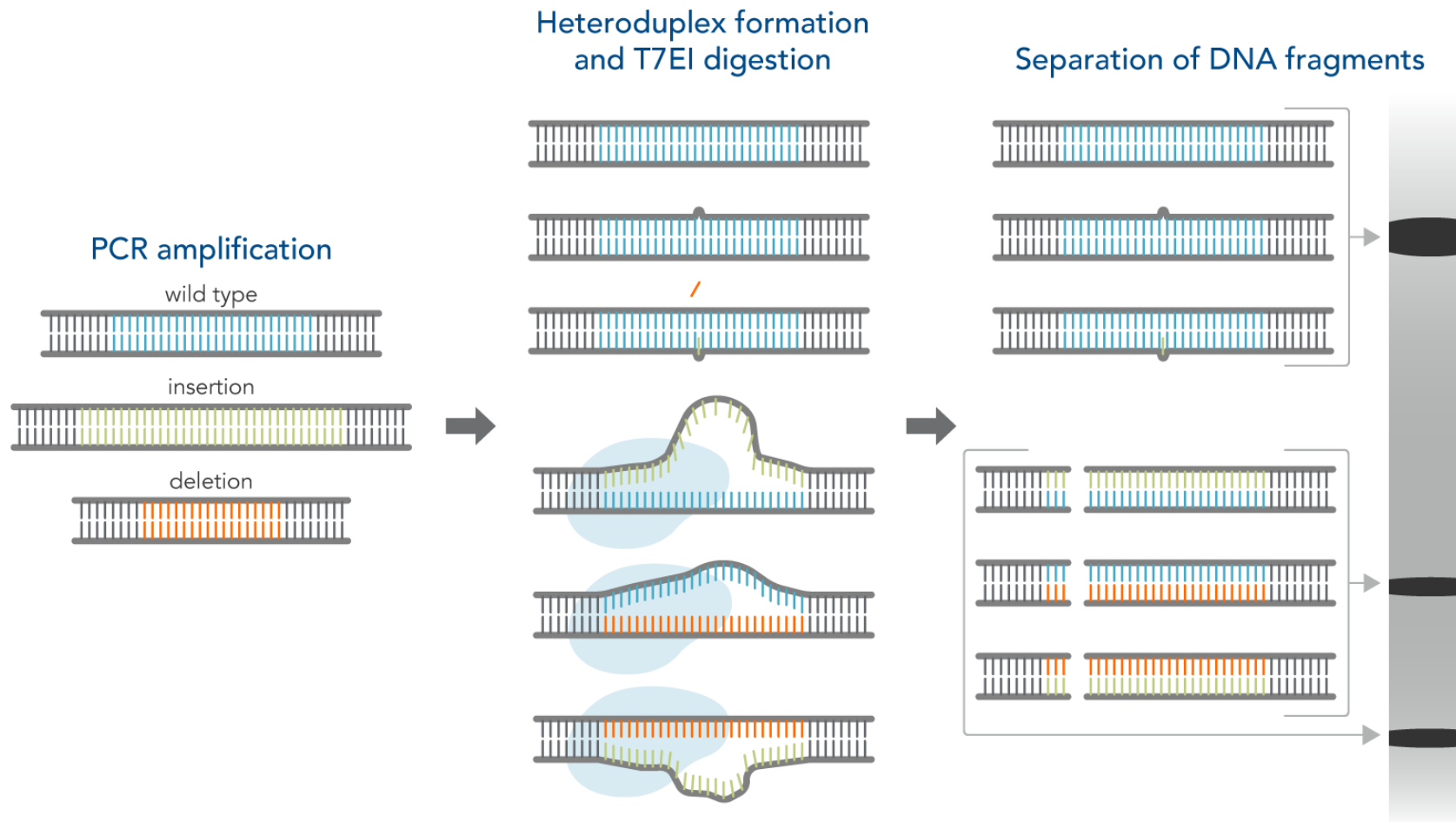


Japan has approved the sale of two CRISPR-edited fish: a tiger puffer and a red sea bream, both developed by the Kyoto-based startup Regional Fish Institute with Kyoto University and Kindai University

Researchers achieved the trait in tiger puffer by **disrupting the leptin receptor gene**, which **controls appetite**, causing the fish to eat more and increasing the speed at which they gain weight. The edited **fish grow 1.9 times heavier** than conventional tiger puffers, allowing them to reach market size sooner, according to the company. For red sea bream, the researchers **disabled** the protein **myostatin**, which **suppresses muscle growth**, allowing the fish to grow about **1.2 times larger on the same amount of**

ДЕТЕКЦИЯ СОБЫТИЙ РЕДАКТИРОВАНИЯ

T7ei assay



ДЕТЕКЦИЯ СОБЫТИЙ РЕДАКТИРОВАНИЯ ddPCR

