



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В РАЗРАБОТКЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСАМ И ВИРОИДУ

П. С. Никулин

Институт цитологии и генетики СО РАН

Новосибирский государственный университет

Научный руководитель:

к. б. н. доцент Кочетов А. В.

Новосибирск 2013

Вирусы как вредители сельхозкультур



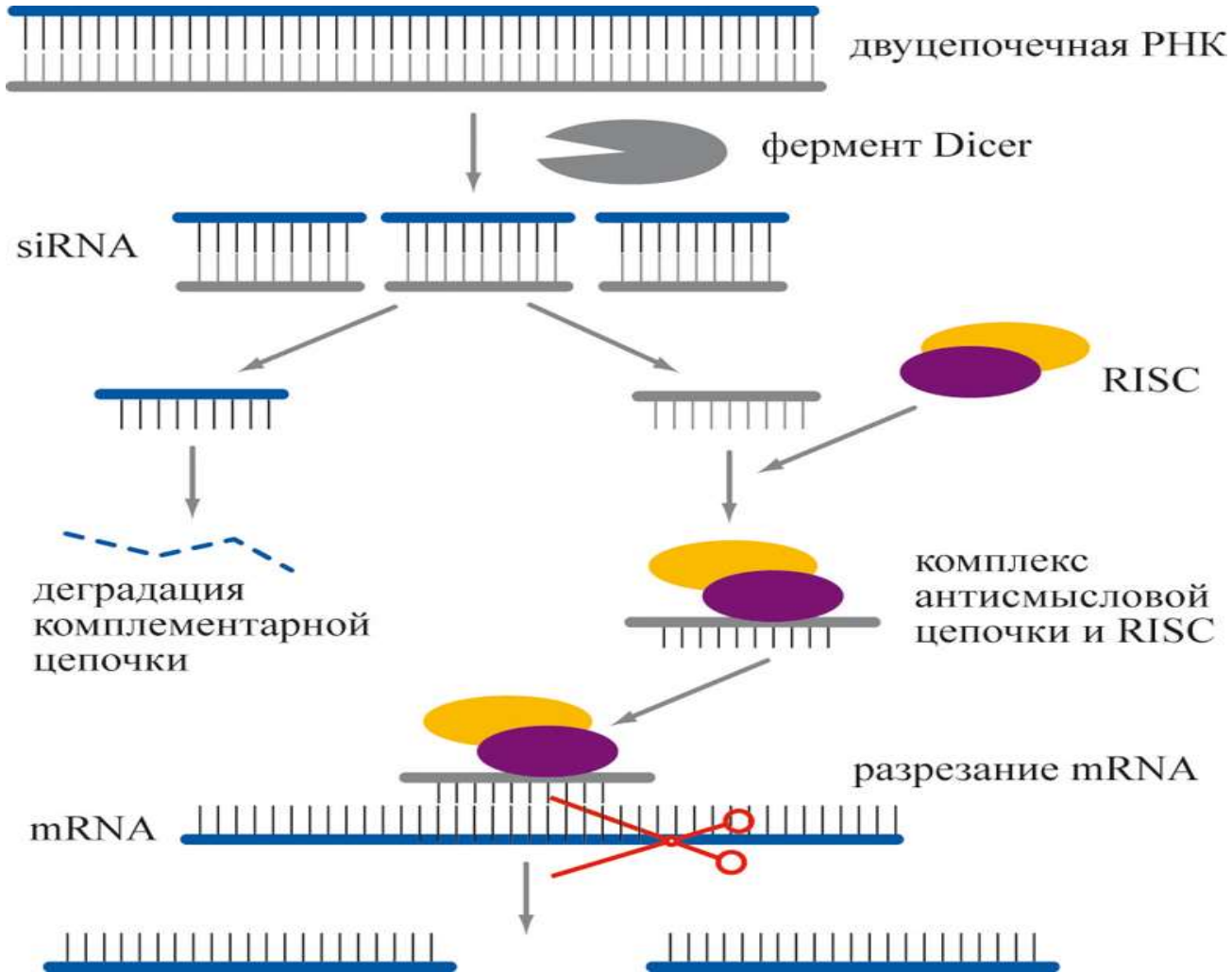
Вирус скручивания листьев картофеля



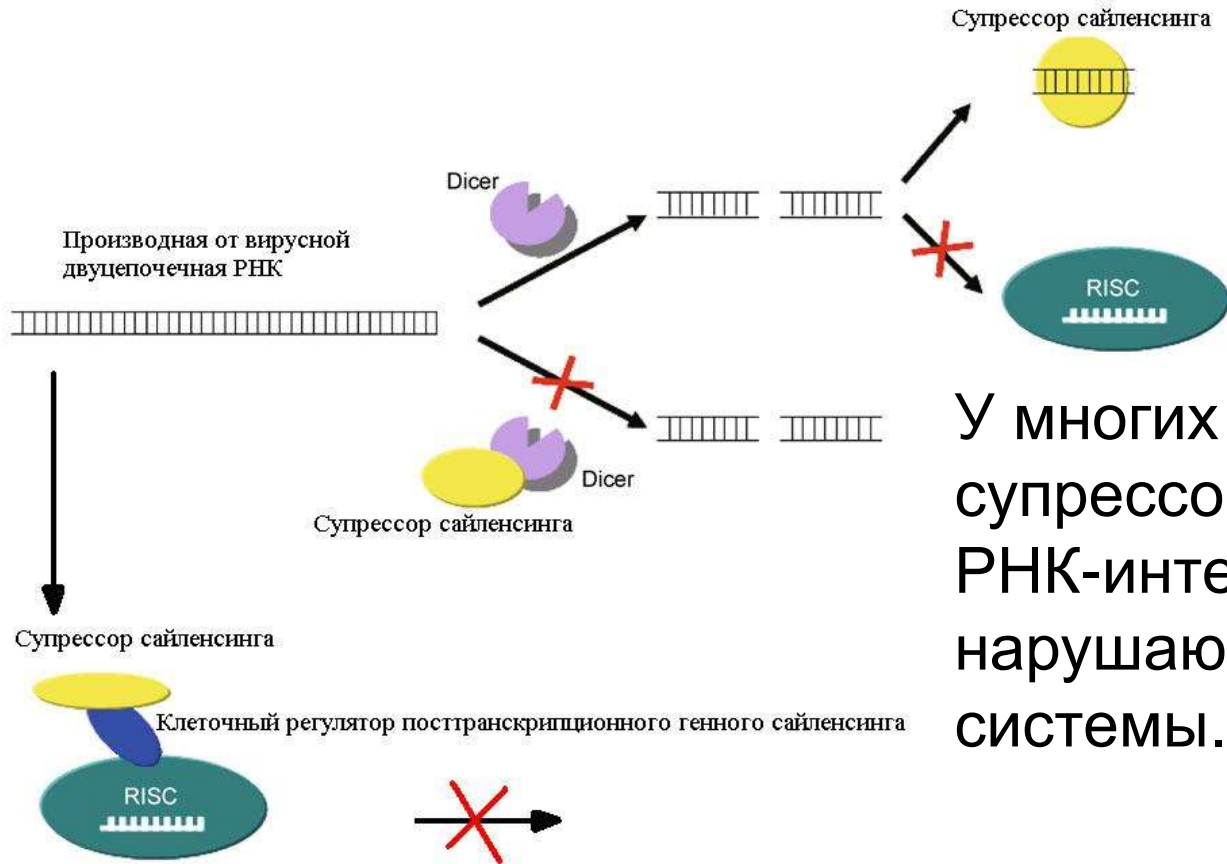
Вирус картофеля Y

- Приводят к потере урожайности
- Снижают качество продукта
- Распространяются через поранения, а также через переносчиков, таких как тли
- В растениях культивируемых вегетативно имеют свойство накапливаться
- Вирусы растений являются в большинстве своём РНК-вирусами

РНК-интерференция



Вирусные супрессоры РНК-интерференции



У многих вирусов есть гены супрессоров РНК-интерференции, белков нарушающих работу этой системы.

Однако предполагается, что при наличии в клетке растения малых интерферирующих РНК, вирусная РНК будет уничтожаться до того как супрессоры смогут накопиться в клетке.

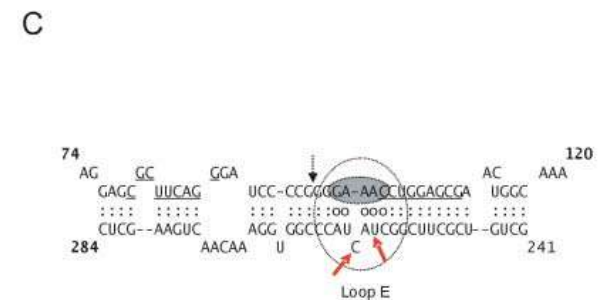
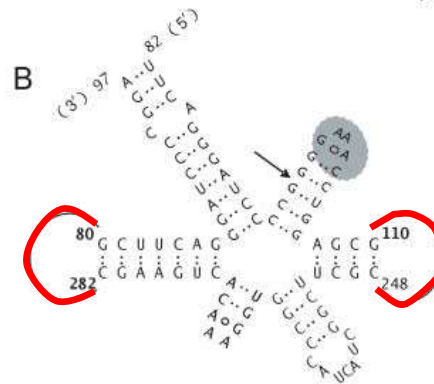
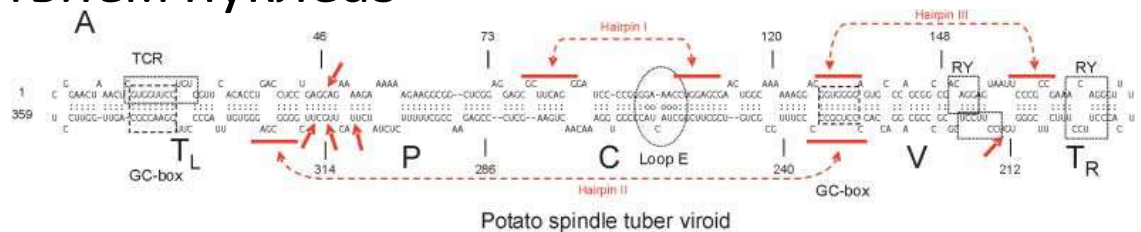
Вироид веретеновидности клубней картофеля

- Представляет из себя кольцевую некодирующую РНК.
- Вызывает готику картофеля – заболевание угнетающее развитие растения, тем самым снижая его плодовитость
- За счет своей вторичной структуры способен противостоять дегенерации под действием нуклеаз



Здоровые клубни

Клубни растения пораженного виroidом



Предполагается, что если в петлях производить разрывы, это нарушит цикл репликации виroidа.

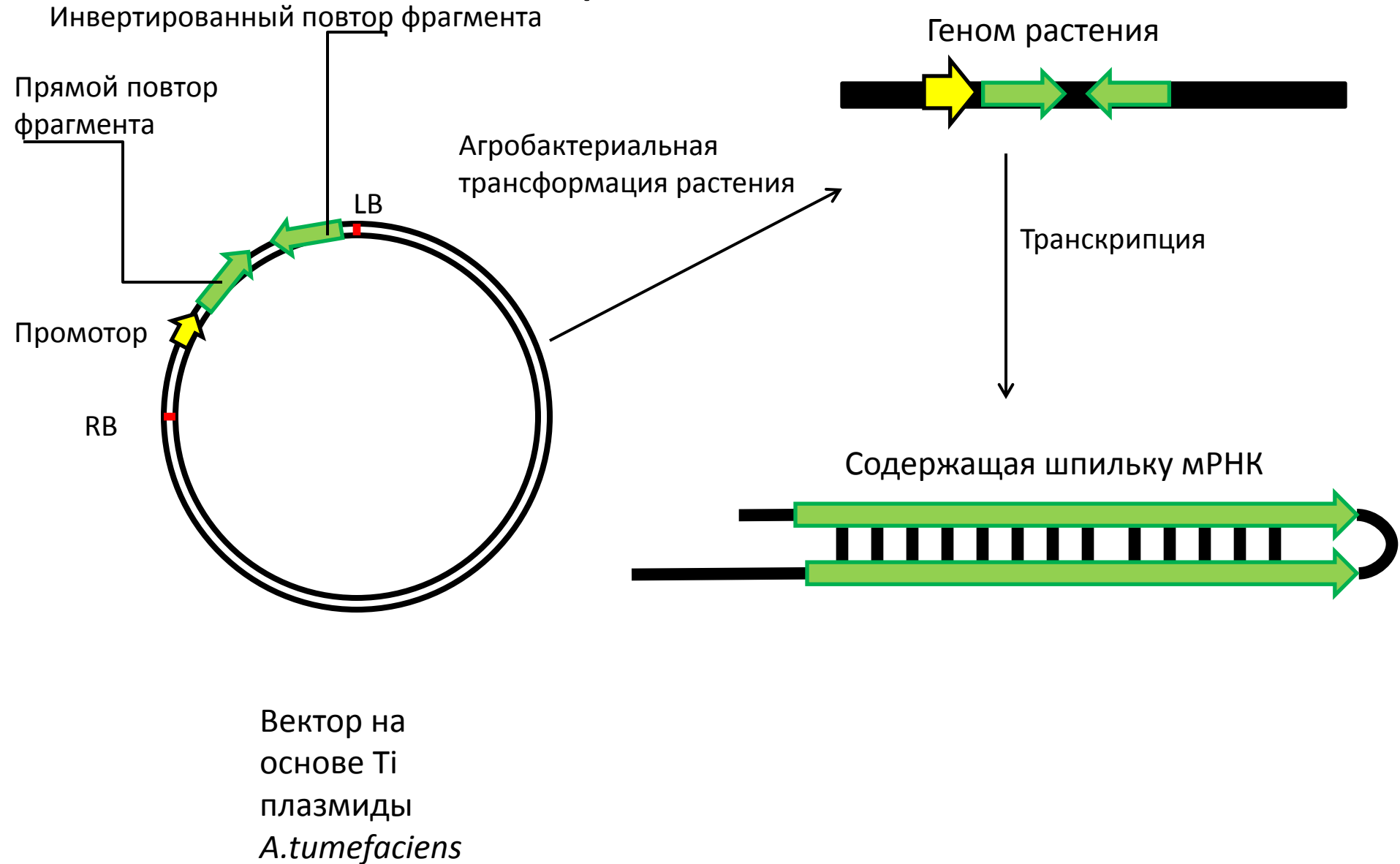
Цели и задачи

Целью этой работы является создание нового способа повышения специфической сопротивляемости растений картофеля к вирусам картофеля X, Y, M, S, вирусу погрешности табака, вирусу скрученности листьев картофеля, а также к вириоду веретеновидности клубней картофеля, основанного на механизме РНК-интерференции.

Задачи:

1. Дизайн противовирусной и противовириодной генетических конструкций.
2. Получение конструкций генно-инженерными методами.
3. Трансформация растений табака и анализ растений-трансформантов на наличие специфических siRNA.

Инженерия эффектов сайленсинга в растениях



Отбор вирусов

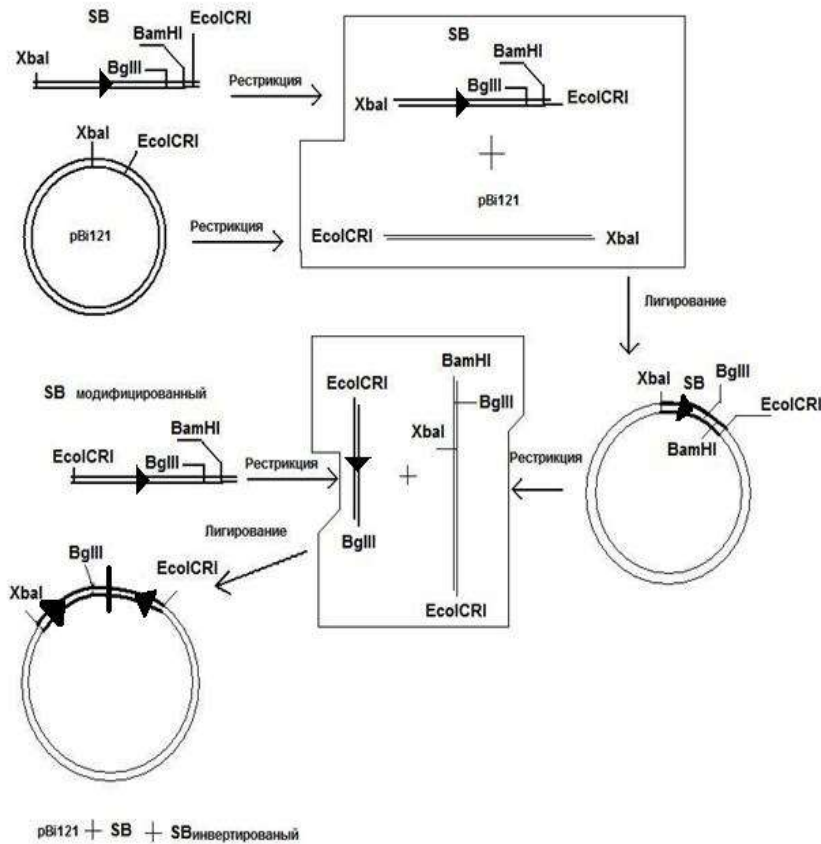
- Были выбраны вирусы, против которых должна формироваться защита под действием противовирусной конструкции. Выбранными вирусами стали вирус погремковости табака, вирусы картофеля S, M, X, Y, и вирус скрученности листьев картофеля. Главным критерием выбора являлось наличие у вирусов супрессоров РНК-интерференции, последние три вируса также являются крупнейшими вредителями сельского хозяйства.
- После того как вирусы были выбраны, был произведен отбор генов-мишеней, элементы которых в дальнейшем использовались в создании противовирусной конструкции. Были выбраны все гены супрессоров, а также гены содержащие крупные консервативные фрагменты.

Фрагменты

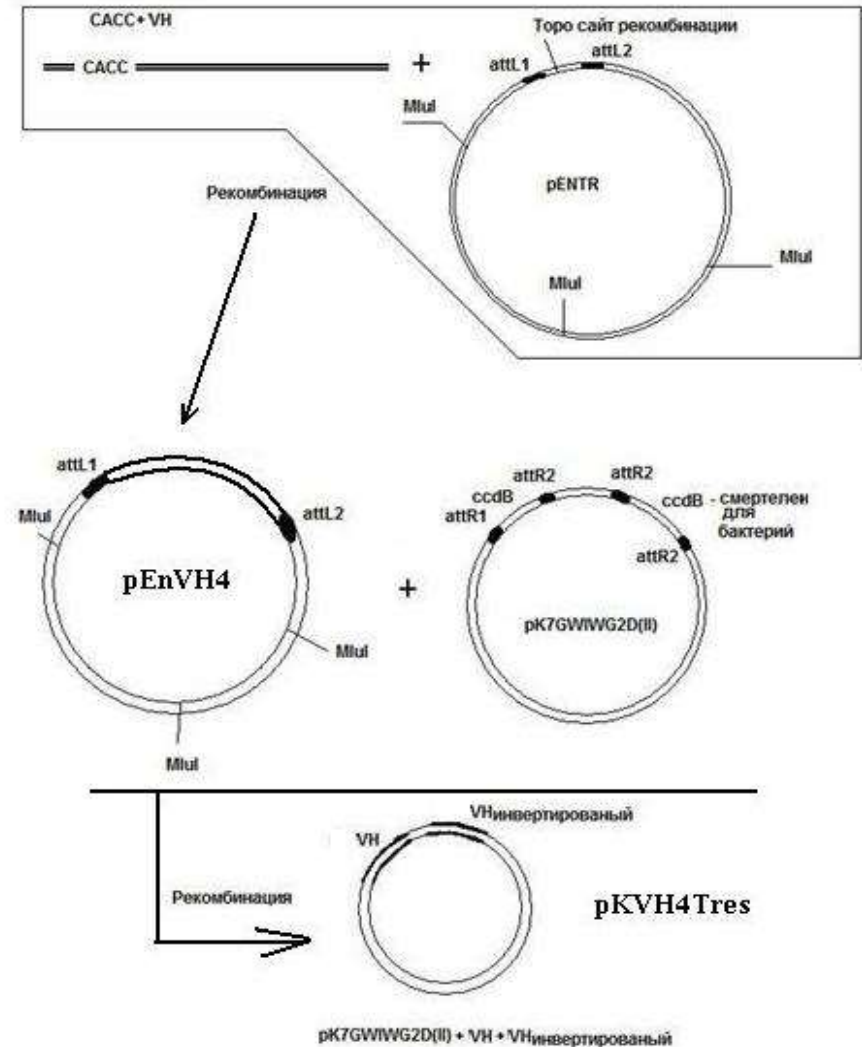
- Были отобраны короткие (30 нуклеотидов) консервативные последовательности у выбранных генов вирусов/участков генома вириоида. Для этого был использован алгоритм BLAST.
- Консервативные последовательности были составлены в две линейные структуры: состоящий из последовательностей вирусов фрагмент SB и состоящий из последовательностей петель вириоида фрагмент VH.
- Полученные линейные фрагменты были проанализированы на предмет возможных сайтов сплайсинга. Фрагменты были модифицированы таким образом, чтобы удалить предсказанные сайты сплайсинга.
- Фрагменты были синтезированы.

Конструирование

Конструирование с помощью лигазно рестриктазного метода



Конструирование с помощью технологии GateWay



Полученные конструкции.

Т-ДНК вектора на основе pVi121

Т-ДНК вектора на основе pK7GWIWG2D(II)

NPTII – ген устойчивости к канамицину

NPTII – ген устойчивости к канамицину

NOS промотор

35S промоторы

NOS терминаторы

35S терминаторы

35S промотор

Прямой повтор фрагмента VH

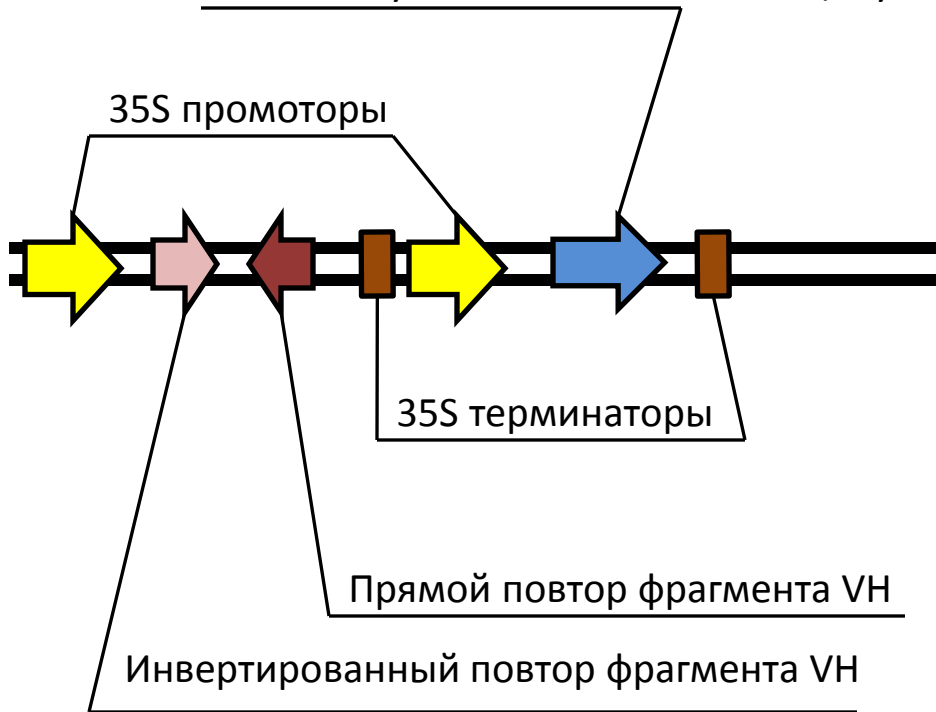
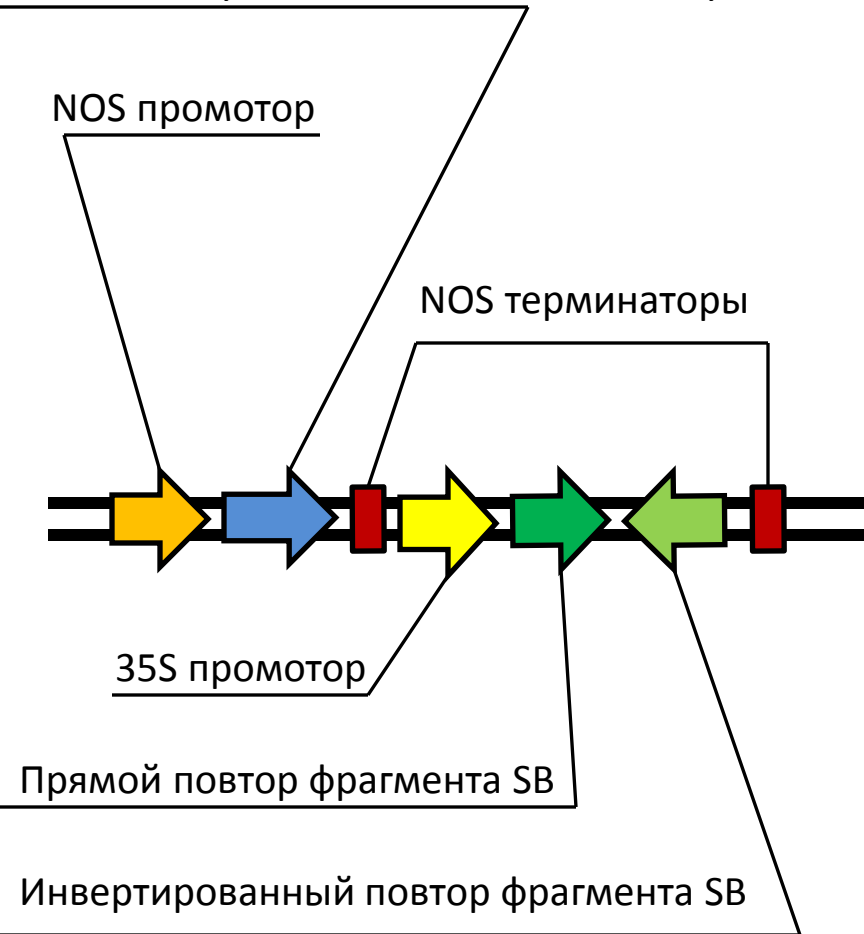
Инвертированный повтор фрагмента VH

Прямой повтор фрагмента SB

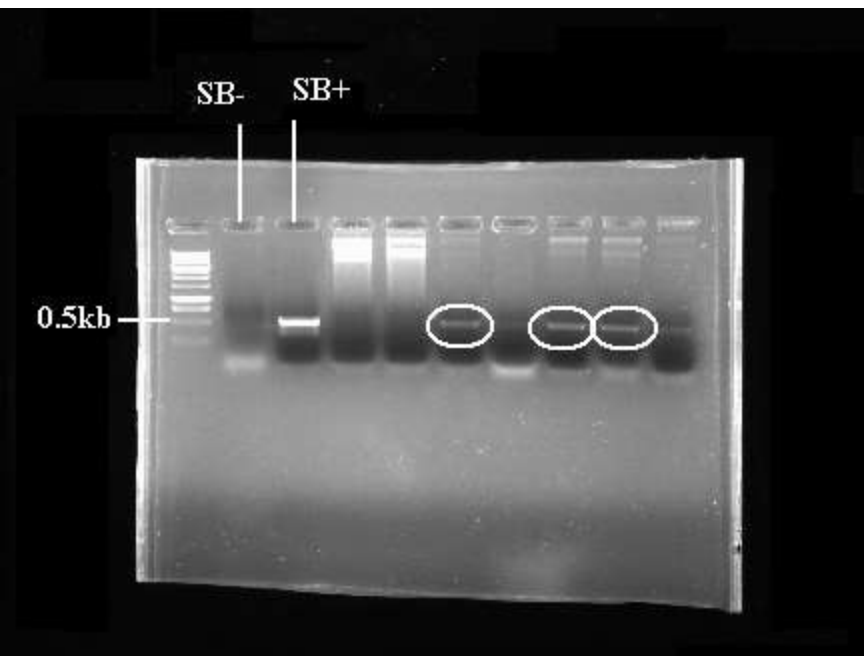
Инвертированный повтор фрагмента SB

pKVHtres

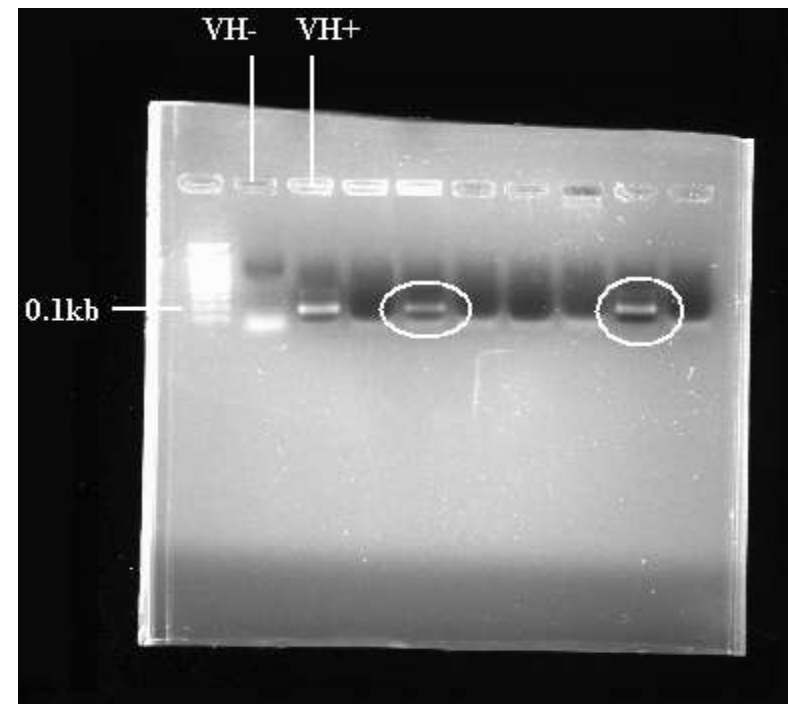
pBiSB_J1III



ПЦР-анализ колоний бактерий на наличие встроенок нужного размера в плазмидах



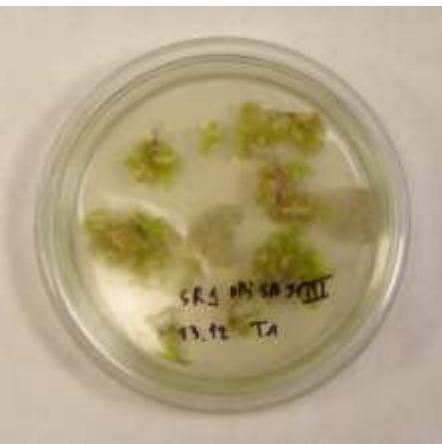
Электрофореграмма ПЦР реакции с колоний трансформированных лигазной смесью. SB- – отрицательный контроль, SB+ – положительный контроль, овалами обозначены бэнды соответствующие фрагменту SB.



Электрофореграмма ПЦР реакции с колоний трансформированных клонанной смесью. VH- – отрицательный контроль, VH+ – положительный контроль, овалами обозначены бэнды соответствующие фрагменту VH.

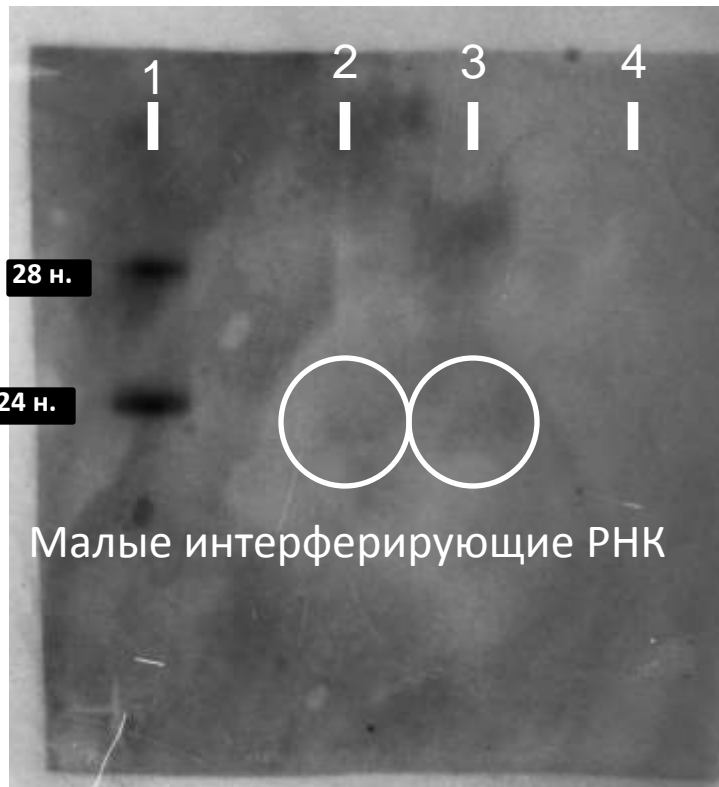
Работа с растительным материалом

- Полученной конструкцией pBiSB_J1III были трансформированы экспланты растений *Nicotiana tabacum* линии SR1.
- Экспланты на которых происходило каллусообразование были пренесены на среду иницирующую органогенез.
- Экспланты успешно развивавшие корневую систему переносились в условия теплицы.



Анализ трансформантов

- Были проведены первичные попытки анализа трансформантов на наличие siRNA с использованием northern blot.
- Предварительные результаты показывают наличие противовирусных малых интерферирующих РНК.



1. Молекулярный маркер.
2. Образец из растения трансформанта pBISBJ1II линии 2
3. Образец из растения трансформанта pBISBJ1II линии 3
4. Контроль

Выводы

- 1) Разработаны схемы генетических конструкций кодирующих противовирусный и противовироидный dsRNA супрессоры.
- 2) Получены генетические конструкции:
 - рViSBJ1III – конструкция, содержащая фрагмент кодирующий dsRNA супрессор вирусов картофеля X, Y, S, M, вируса погремковости табака и вируса скрученности листьев картофеля;
 - ркVHtres - конструкция содержащая фрагмент кодирующий dsRNA комплементарную участкам РНК вириона веретеновидности клубней картофеля;
- 3) Получены растения *N. tabacum*, несущие конструкцию рViSBJ1III. Показано, что в клетках растений-трансформантов присутствуют siRNA, комплементарные генетической конструкции.

План дальнейшей работы

- Трансформация конструкциями растений *Solanum tuberosum*, получение трансформантов.
- Испытания трансформантов на устойчивость к вирусам и вириоду
- Анализ результатов