

Νέες τεχνολογίες στη βελτίωση των φυτών

Νέες τεχνικές στη βελτίωση των φυτών (NTB)

- Οι βελτιωτές ανέκαθεν υιοθετούσαν νέες τεχνικές/τεχνολογίες :
 - Απλοειδή και διαπλοειδή
 - Χρωσωμικές μεταβολές– σειρές υποκατάστασης και προσθήκης χρωσωμάτων μεταξύ ειδών
 - Μεταλαξογένεση με χημικά και ιονίζουσες ακτινοβολίες
 - Ιστοκαλλιέργεια και κυτταροκαλλιέργεια– ευρύτερος υβριδισμός, *in vitro* γονιμοποίηση, συγχώνευση πρωτοπλαστών, σωμακλωνική παραλλακτικότητα

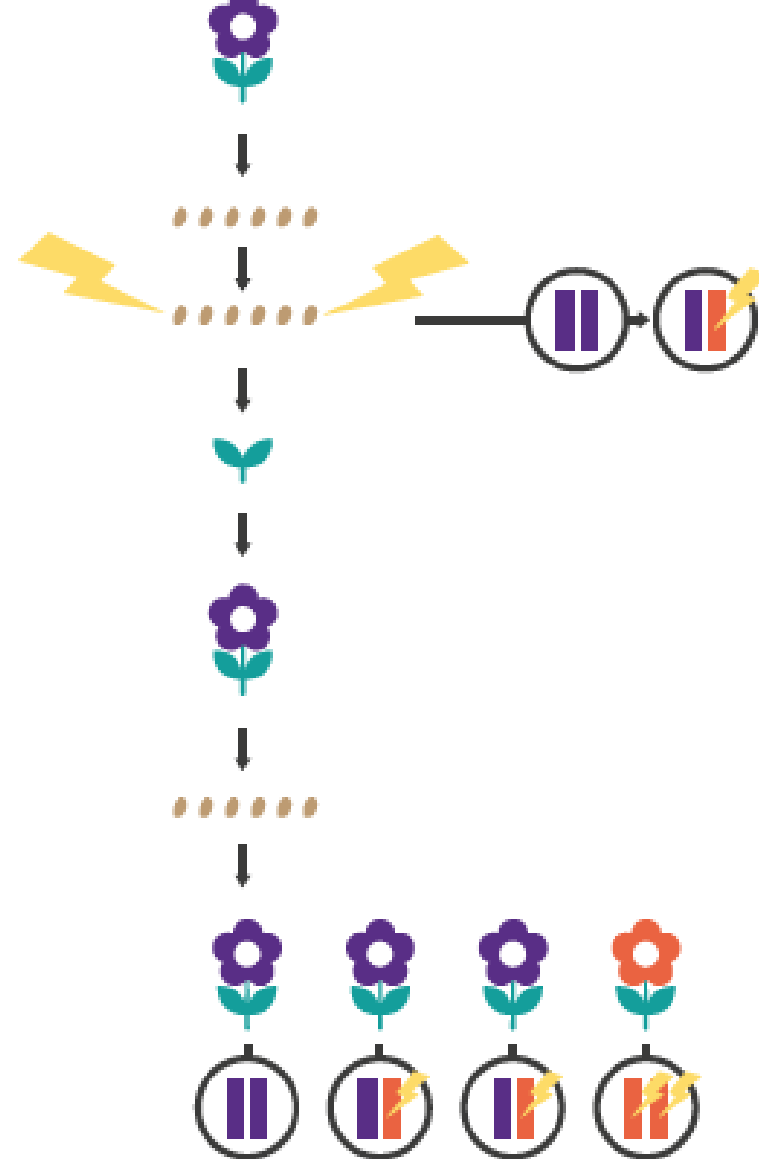


Figure 5. Schematic representation of mutation breeding. Seeds of plants with purple flowers are treated with radiation that cause mutation in the plant's DNA. In the next generation, these mutations can lead to a red flowering plant.

Η εποχή της Μοριακής Βιολογίας - Βιοτεχνολογίας

- Δύο κομβικές τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν με βάση τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας βρήκαν εφαρμογή στη βελτίωση:
 - -Μοριακοί δείκτες
 - - Γενετική μηχανική
- Ενώ η επιλογή με χρήση δεικτών έγινε δεκτή χωρίς προβλήματα, η μεταφορά ξένου DNA στα καλλιεργούμενα φυτά ήταν ένα βήμα που αμφισβητήθηκε σοβαρά (ήταν έτοιμη η κοινωνία; Εξαπατήθηκε και από ποιους; συνδεδεμένα συμφέροντα;)
- Η ανταπόκριση των υπευθύνων πολιτικών και νομοθετών ήταν να ενσωματωθούν πολύ αυστηροί κανόνες στις νομοθεσίες των κρατών σε όλο τον κόσμο
- Οι ερευνητές αναλαμβάνουν δράση και προσπαθούν να κάνουν τα ΓΤ φυτά όσο το δυνατόν πιο 'φυσικά'

Βελτιώσεις στη γενετική τροποποίηση

- Νέες τεχνικές γενετικής τροποποίησης εξελίσσονται συνεχώς
- Αμφισβήτηση για το αν οι ποικιλίες που προκύπτουν πρέπει να υπάγονται στην νομοθεσία σχετική με ΓΤΟ
- Σημαντικές προσπάθειες στην κατεύθυνση της πλήρους εξάλειψης παρουσίας ξένου DNA
- Σε πολλές περιπτώσεις αυτό έχει επιτευχθεί

Αναφαινόμενα ζητήματα

- Υπάρχει σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα για το ποιες από τις νέες τεχνικές παράγουν ΓΤΟ και ποιες όχι
- Οι νομοθέτες είναι πιο μπερδεμένοι και δεν επιθυμούν να πάρουν αποφάσεις
- Τεράστια συνδεδεμένα οικονομικά συμφέροντα
- Στην εποχή μας που η δημόσια διαβούλευση προκρίνεται σαν μέσο για να λαμβάνονται αποφάσεις, πως μπορεί η κοινωνία να συζητήσει θέματα σχετικά με μια τεχνολογία που ακόμη εξελίσσεται και ταυτόχρονα παράγει προϊόντα έτοιμα για εμπορική χρήση;

Ποιες είναι οι νέες τεχνικές βελτίωσης

Μεταλαξιγένεση

- Cisgenesis/Intragenesis
- Εμβολιασμός (Grafting)
- Αντίστροφη βελτίωση (Reverse breeding)
- Επιτάχυνση της βελτίωσης σε δενδρώδη (Fast-track breeding for trees and shrubs)
- Αγροβακτηριακή διήθηση (Agroinfiltration)
- Μεθυλίωση και αδρανοποίηση γονιδίων
- Μεταλαξιγένεση με ολιγονουκλεοτίδια (Oligonucleotide-directed mutagenesis)
- Νουκλεάσες που κόβουν στοχευόμενες θέσεις (Site-directed nucleases)

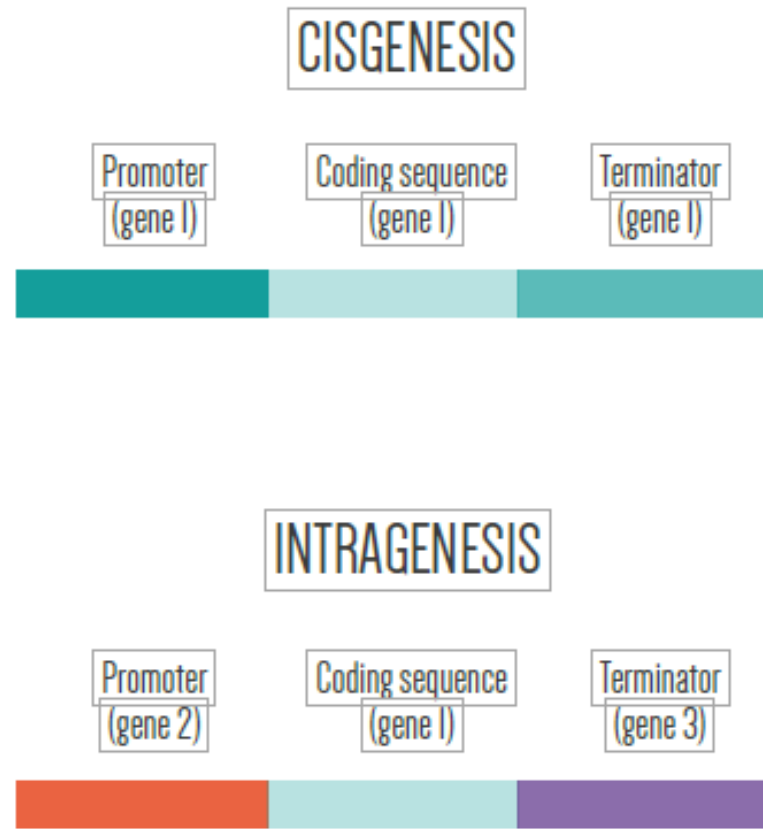
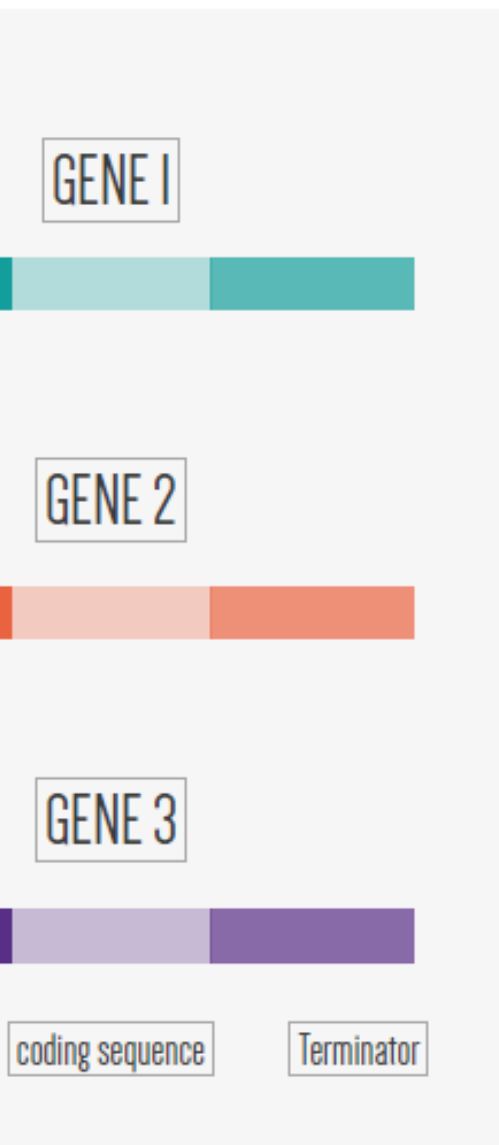
Συμβατικοί απόγονοι από ΓΤ προγόνους

Intragenics/cisgenics

- Γενετική μηχανική στα φυτά με το δικό τους DNA
- Σύνθεση φορέων μεταφοράς γονιδίων με ρυθμιστικά στοιχεία από το είδος που είναι προς τροποποίηση
- Μεταφορά γονιδίων από τη δεξαμενή γονιδίων του είδους σε επιλεγμένες elite ποικιλίες
- ΓΤΟ χωρίς 'ξένο' DNA

Cisgenesis (Ιδιο-τροποποίηση)

- Η μεταφορά γονιδίων εντός των παραδοσιακών γονιδιακών δεξαμενών που βρίσκονται στη διάθεσή των βελτιωτών.
- Δηλαδή οι βελτιωτές τροποποιούν τα φυτά με τη χρήση γονιδίων που προέρχονται από το ίδιο είδος ή στενά συγγενικά είδη/μέσα στο ίδιο γένος (intragenesis)-ενδογένεση-ενδοτροποποίηση.



Στην cisgenesis το γονίδιο έχει τον φυσικό υποκινητή του και τον τερματιστή του /δηλαδή αποτελεί ένα πλήρες αντίγραφο DNA ενός φυσικού γονιδίου

Same species
or sexually
compatible
species



Gene 1

Gene 2



Cisgenesis



Transfer of gene into
T-DNA with native
promoter and terminator
sequences



Cultivar



Cisgenic variety

Intragenesis



Transfer of gene into
T-DNA with regulatory
regions from sexually
compatible gene pool



Cultivar



Intragenic variety

Transgenesis-Διαγένεση

Η μεταφορά γονιδίων ανάμεσα σε ιδιαίτερα εκτεταμένα ταξινομικά όρια (πχ από τα βακτήρια στα φυτά).

Διαγονιδιακό φυτό το προϊόν της διαγένεσης

TABLE 1 | Applications of cisgenesis and intragenesis in woody fruit species.

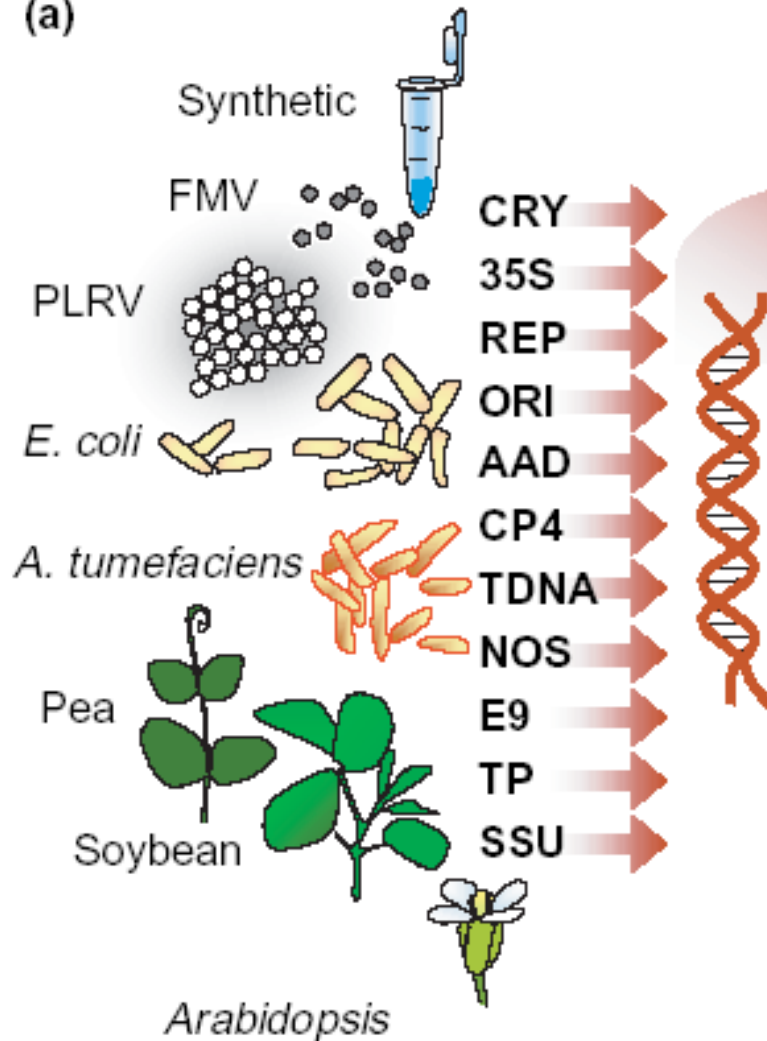
Plant species	Name of gene	Source	Trait	Achievement	References
Apple (<i>Malus domestica</i>)	<i>HcrVf2</i>	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Resistance to Apple scab (<i>Venturia inaequalis</i>)	80% reduction in fungal infection of the cisgenic lines compared with the scab-susceptible 'Gala'	Joshi et al., 2011; Vanblaere et al., 2011, 2014;
Apple (<i>Malus domestica</i>)	<i>Rvi6</i>	Apple (<i>Malus floribunda</i> 821)	Resistance to Apple scab (<i>Venturia inaequalis</i>)	Cisgenic plants had similar resistance to the <i>M. floribunda</i> control	Krens et al., 2015
Apple (<i>Malus</i> × <i>domestica</i> Borkh)	<i>Rvi6</i>	Apple (<i>Malus floribunda</i> 821)	Resistance to Apple scab (<i>Venturia inaequalis</i>) strain 104 (Race 1)	Two cisgenic lines resistant to (<i>Venturia inaequalis</i>) strain 104 (Race 1)	Wurdig et al., 2015
Apple (<i>Malus</i> × <i>domestica</i> Borkh)	<i>HcrVf2</i>	Apple cv Gala	Resistance to Apple <i>Rvi6</i> scab	Cisgenic lines containing the <i>HcrVf2</i> gene	Gessler et al., 2014
Apple (<i>Malus domestica</i>)	<i>FB_MR5</i>	Apple cv Gala Galaxy	Resistance to fire blight (<i>Erwinia amylovora</i>)	Cisgenic line C44.4.146, expressing the cisgene <i>FB_MR5</i> , with lower disease symptoms when inoculated with <i>Erwinia amylovora</i>	Kost et al., 2015
Grapevine (<i>Vitis vinifera</i> L.)	<i>WTL-1</i>	Grapevine (<i>Vitis vinifera</i>)	Resistance to Powdery mildew (<i>Erysiphe necator</i>)	Cisgenic plants showed a delay in powdery mildew disease development and decreased severity of black rot (<i>Guignardia bidwellii</i>) during field tests	Dhekney et al., 2011
Grapefruit (<i>Citrus paradisi</i>)	<i>C. clementina</i> -derived T-DNA-like region	<i>Citrus clementina</i>	Development of "foreign DNA-free" intra-/cisgenic citrus cultivars	Transformation efficiency in "Duncan" grapefruit was ~0.67%	An et al., 2013

GMO vs Intra-genic

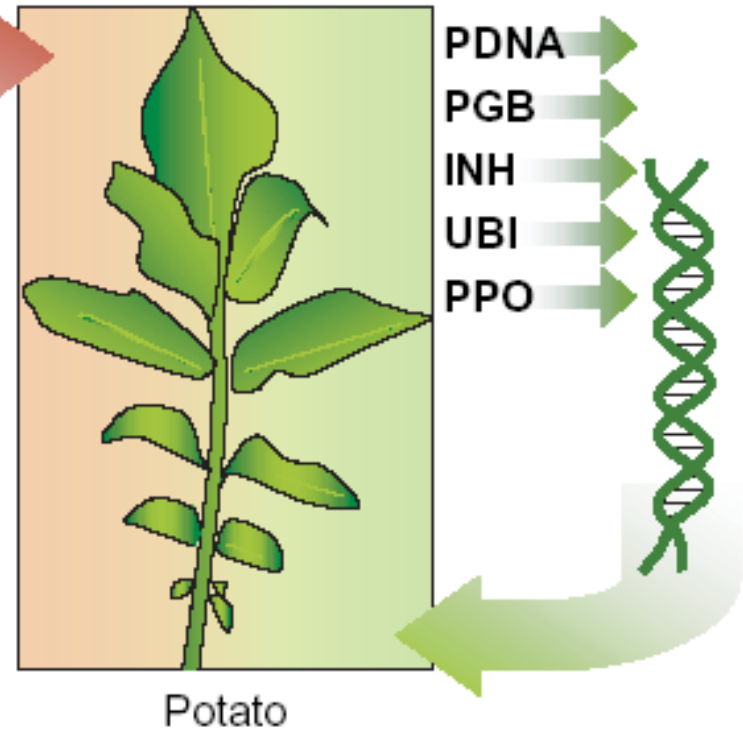
NewLeaf Plus®

PPO

(a)



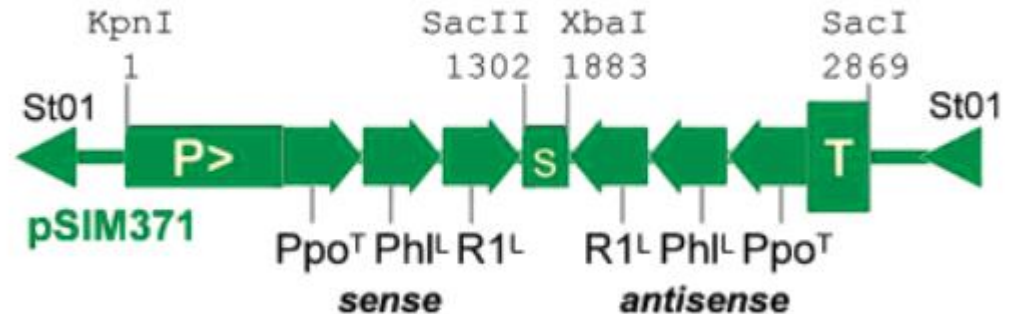
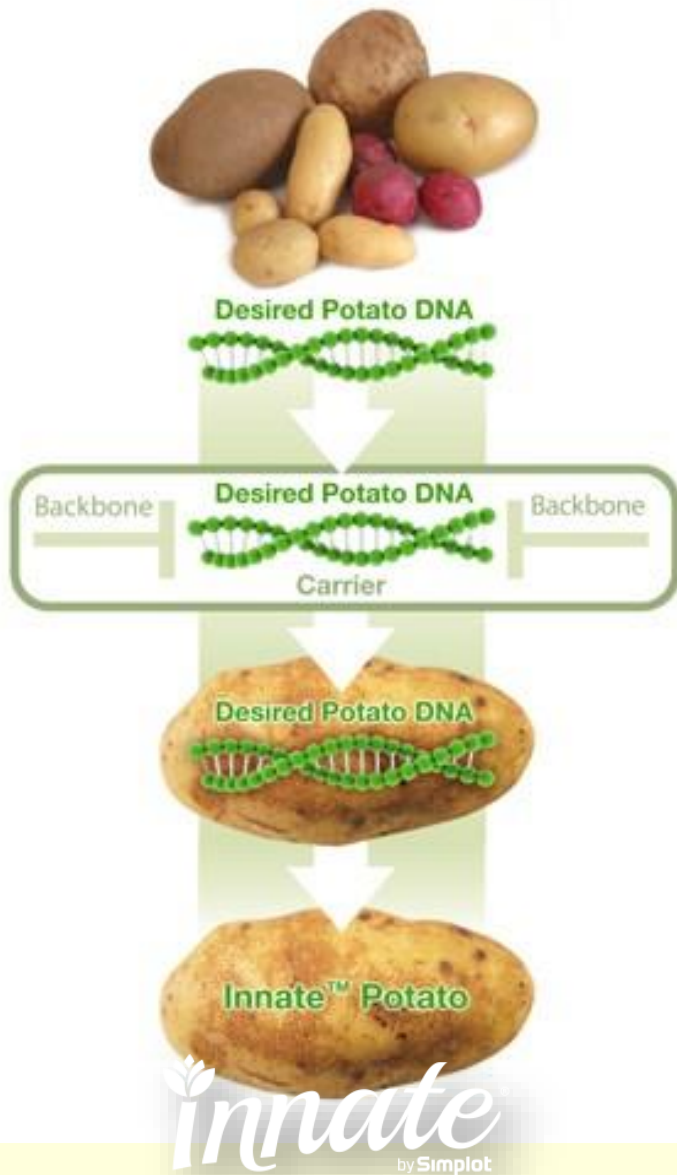
(b)



Intra-genic

Οι πατάτες Innate[®] είναι λιγότερο επιρρεπείς σε μώλωπες και μαύρες κηλίδες

Τι διαφορά έχει η τεχνική αυτή σε σχέση με τη συμβατική βελτίωση;



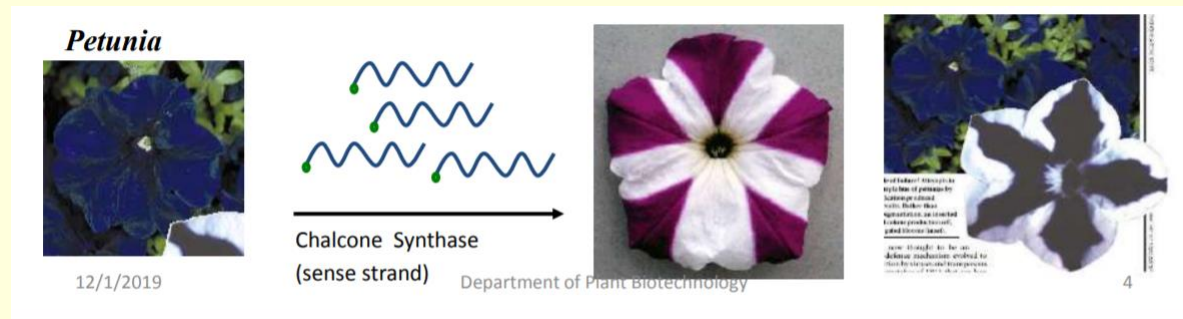
RNA-ι τεχνολογία

- Η RNA interference (RNAi) είναι μια διαδικασία μετα-μεταγραφικής σίγασης (Post Transcription Gene Silencing) (PTGS) γονιδίου κατά την οποία δίκλωνο RNA (dsRNA) προκαλεί αποδόμηση μιας αλληλουχίας-στόχου mRNA.
- Είναι ένα φαινόμενο επιλεκτικής αποσιώπησης γονιδίου (**gene knock-down**).

RNA-ι τεχνολογία

- Ο φυσικός ρόλος του RNAi είναι η προστασία από ιούς και η ενδογενής ρύθμιση γονιδίων σε φυτά

- Το RNAi φαινόμενο πρωτοανακαλύφθηκε σε διαγονιδιακά φυτά πετούνιας (*Petunia hybrida* L.) (Naroli et al. 1990)
- Απροσδόκητα, προήλθαν διαγονιδιακά φυτά που παρήγαγαν λευκά ή χιμαιρικά άνθη αντί για σκούρα μοβ άνθη λόγω της αποσιώπησης των ενδογενών ομόλογων γονιδίων και αυτό το φαινόμενο ορίστηκε ως «συν-καταστολή».
- Co-suppression



- Υπάρχουν δύο κύριες διαδρομές RNAi:
- 1. μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs) που δημιουργούνται μέσω επεξεργασίας μεγαλύτερου dsRNA και
- 2. microRNAs (miRNAs) που δημιουργούνται μέσω επεξεργασίας του stem-loop 19 προδρόμων μορίων

Κύρια συστατικά της διαδικασίας RNAi για τη δημιουργία siRNA

- 1. Dicer
- 2. small Interfering RNA (siRNA)
- 3. RNA-Induced Silencing Complex (RISC)
- 4. RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP)

RNAi: διαδικασία δύο φάσεων

- **Έναρξη**
 - - Δημιουργία ώριμου siRNA ή miRNA
- **Εκτέλεση**
 - - Αποσιώπηση του γονιδίου στόχου
 - - ή αναστολή της μετάφρασης

Signal amplification and spreading phase

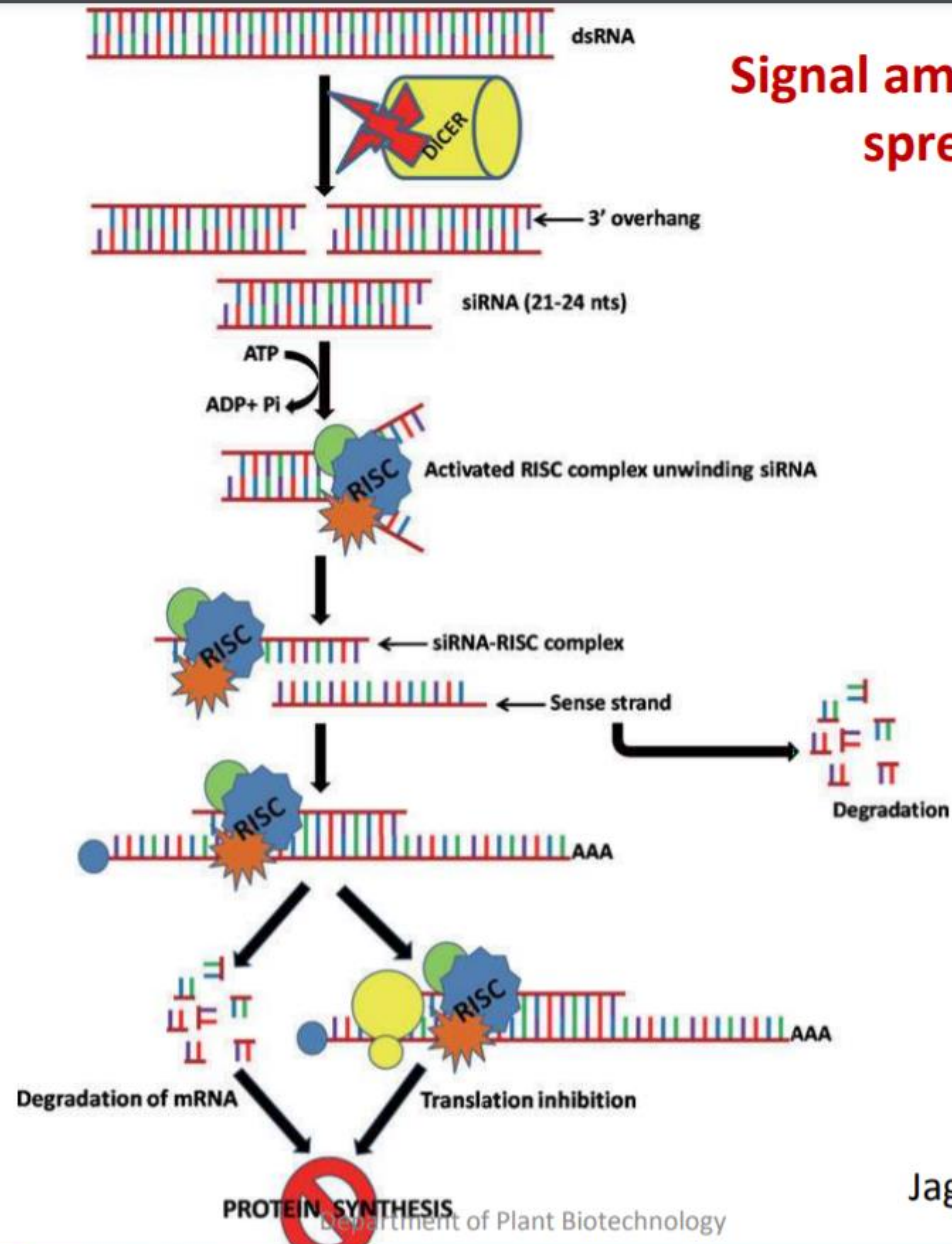
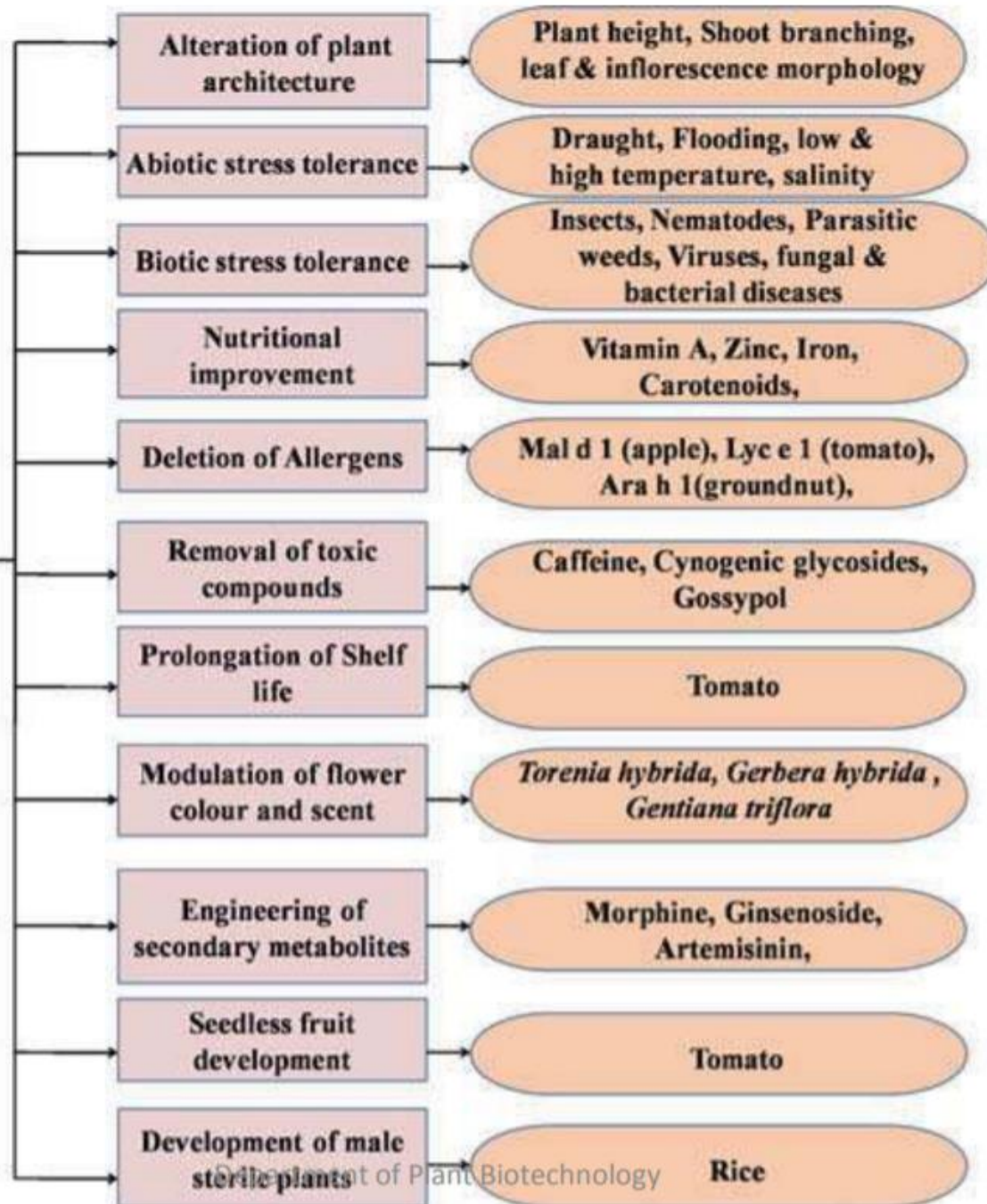


TABLE 2 | Applications of RNA interference in woody fruit species.

Plant species	Name of gene	Source	Trait	Achievement	References
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	PRSV-CP	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	Resistance to PRSV	Transgenic papaya resistant to <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	Gonsalves, 1998, 2006
Plum (<i>Prunus domestica</i> L.)	PPV-CP	<i>plum pox virus</i> (PPV)	Resistance to Sharka (PPV)	Transgenic plum clone Honeysweet resistant to sharka disease	Scorza et al., 1994, 2001, 2013
Sweet orange (<i>Citrus sinensis</i>)	CPsV-CP	<i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV)	Resistance to CPsV	Transgenic sweet orange plants resistant to CPsV	Reyes et al., 2011
Grapefruit (<i>Citrus paradisi</i>)	CTV	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	Resistance to CTV	Transgenic grapefruit lines resistant to CTV	Febres et al., 2008
Apple (<i>Malus domestica</i>)	MdMLO19	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Resistance to powdery mildew (<i>Podosphaera leucotricha</i>)	Transgenic apple lines resistant to powdery mildew	Pessina et al., 2016
Apple (<i>Malus domestica</i>)	<i>iaaM</i> and <i>ipt</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistance to crown gall formation	Transgenic apple lines resistant to crown gall formation on tree roots	Viss et al., 2003
Pear (<i>P. communis</i> L.)	MdTFL1	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Early flowering induction	Silencing of <i>PcTFL1-1</i> and <i>PcTFL1-2</i> genes in transgenic pear with consequent early flowering phenotype	Freiman et al., 2012
Apple (<i>Malus domestica</i>)	MdGA20-ox	Apple (<i>Malus domestica</i>)	The obtainment of dwarf varieties	Transgenic apple lines with reduced height, shorter internode length, and higher number of nodes	Zhao et al., 2016
Apple (<i>Malus domestica</i>)	MdAG-like genes: MdMADS15 and MdMADS22	Apple (<i>Malus domestica</i>)	The reduction of fertility and the increase of Floral Attractiveness	Trees with polypetalous flowers. Reduced male and female fertility of flowers	Klocko et al., 2016
Apple (<i>Malus domestica</i>)	<i>Endo-polygalacturonase1</i> (PG1)	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Improve post-harvest fruit quality	Increased post-harvest fruit quality	Atkinson et al., 2012

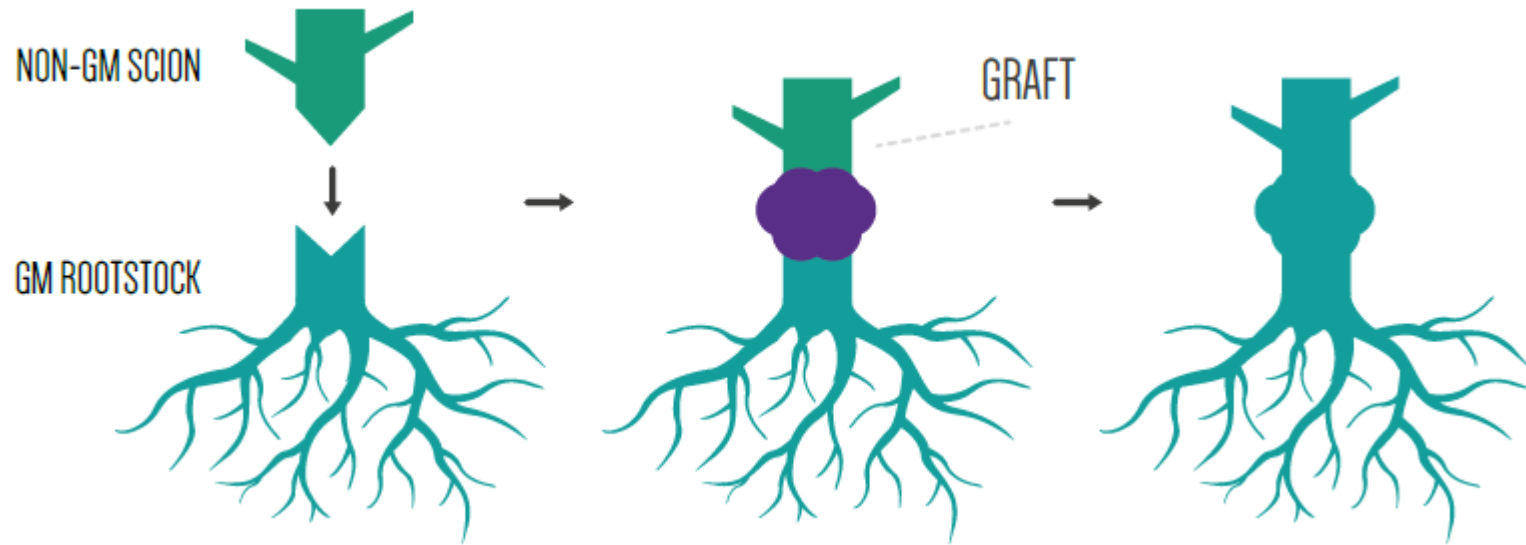
Applications of RNAi



Trait	Target Gene	Host	Application
Enhanced nutrient content	Lyc	Tomato	Increased concentration of lycopene (carotenoid antioxidant)
	DET1	Tomato	Higher flavonoid and beta-carotene contents
	SBEII	Wheat, Sweet potato, Maize	Increased levels of amylose for glycemic management and digestive health
	FAD2	Canola, Peanut, Cotton	Increased oleic acid content
	SAD1	Cotton	Increased stearic acid content
	ZLKR/SDH	Maize	Lysine-fortified maize
Reduced production of lachrymatory factor synthase	lachrymatory factor synthase gene	Onion	"Tearless" onion

<https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/34/default.asp>

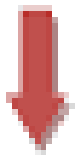
Εμβολιασμός σε ΓΤ υποκείμενα (transgrafting)



- Συμβατικά (όχι ΓΤ) εμβόλια σε ΓΤ υποκείμενα
 - - αντοχή σε ασθένειες των ριζών για δένδρα και στα οποία τα εμβόλια δεν είναι ΓΤ– τι είναι τα φρούτα;
 - - όταν τα διαγονίδια του υποκειμένου παράγουν ρυθμιστικά micro-RNAs που μετακινούνται από τη ρίζα στο εμβόλιο και επάγουν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων;



Non GM scion



Graft site



GM rootstock

Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection

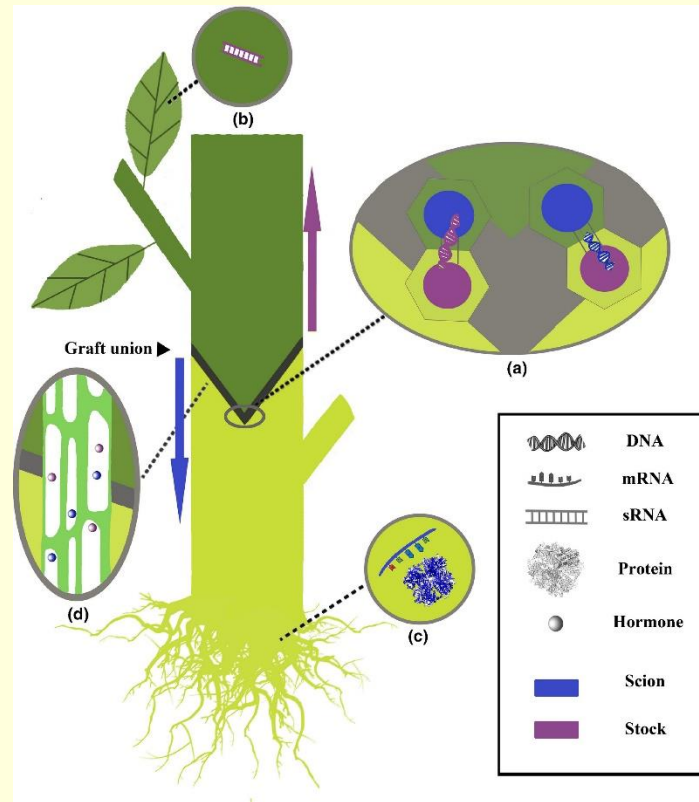


TABLE 3 | Applications of trans-grafting in woody fruit species.

Plant species	Name of gene	Source	Trait	Achievement	References
Apple (<i>Malus domestica</i>)	<i>rolB</i>	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Control of scion vigor and reduce plant height	<i>rolB</i> transgenic rootstocks significantly reduced vegetative growth including tree height regardless of scion cultivar	Welander and Zhu, 2000; Smolka et al., 2010
Grapevine (<i>Vitis vinifera</i> L.)	<i>Shiva-1</i> lytic peptide	Grapevine (<i>Vitis vinifera</i>)	To control Pierce's disease (PD) (<i>Xylella fastidiosa</i>)	Non-transgenic scion resistant to PD	Dutt et al., 2007
Sweet cherry (<i>Prunus avium</i>)	<i>PNRSV</i>	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)	Resistance to PNRSV in non-transgenic scions	Non-transgenic scion of sweet cherry grafted onto the transgenic rootstock showed resistance to PNRSV caused by the transportation (rootstock-to-scion) of hpRNA-derived siRNAs	Song et al., 2013; Zhao and Song, 2014



Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of *Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus* are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection

Συμβατικοί απόγονοι από ΓΤ προγόνους

- Συμβατικοί απόγονοι σε διασπώμενη γενιά από φυτά ετερόζυγα για το διαγονίδιο
- Αυτά τα συμβατικά φυτά θεωρούνται ΓΤ στη νομοθεσία πολλών χωρών συμπεριλαμβανομένων της ΕΕ και της Νέας Ζηλανδίας
- Πως το κρίνουμε από επιστημονική σκοπιά;

Συμβατικοί απόγονοι από ΓΤ προγόνους

Συμβατικοί απόγονοι σε διασπώμενη γενιά από φυτά ετερόζυγα για το διαγονίδιο

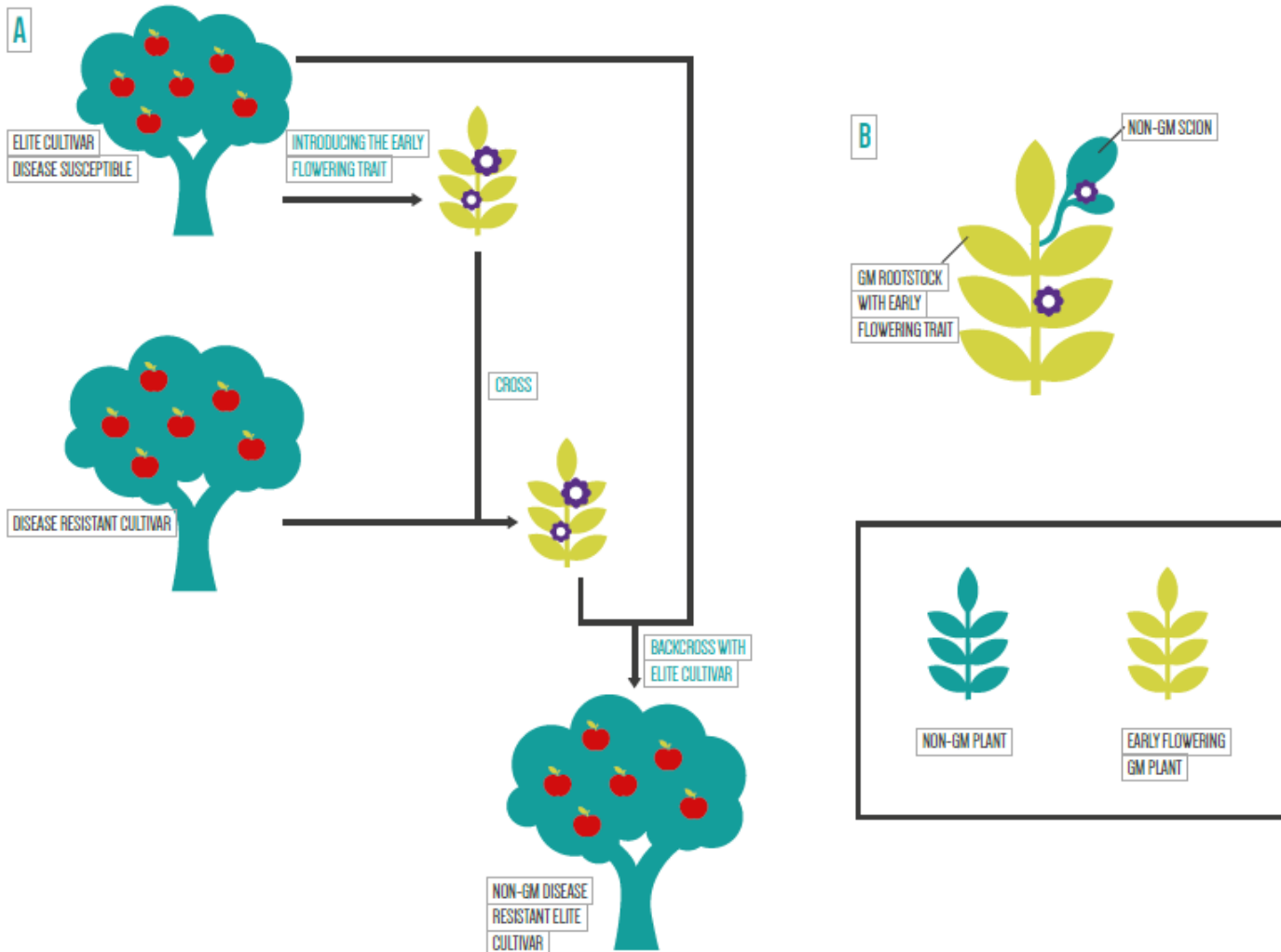
Αυτά τα συμβατικά φυτά θεωρούνται ΓΤ στη νομοθεσία πολλών χωρών συμπεριλαμβανομένων της ΕΕ και της Νέας Ζηλανδίας

Πως το κρίνουμε από επιστημονική σκοπιά;

Fast-track breeding

- A) Μια ευαίσθητη σε ασθένειες ελίτ ποικιλία τροποποιείται γενετικά για να ανθίσει νωρίς (αντιπροσωπεύεται από ανοιχτά πράσινα φυτά). Αυτό το νεαρό ΓΤ δέντρο θα διασταυρωθεί με μια μη ΓΤ ανθεκτική σε ασθένεια ποικιλία (τα μη ΓΤ φυτά αντιπροσωπεύονται σε σκούρο πράσινο). Ο γενετικά τροποποιημένος απόγονος (ανοιχτό πράσινο) μπορεί στη συνέχεια να διασταυρωθεί με την αρχική ελίτ ποικιλία για να συνδυάσει όσο το δυνατόν περισσότερα επιθυμητά χαρακτηριστικά και να αφαιρεθεί ξανά το γονίδιο πρώιμης ανθοφορίας. Το τελικό προϊόν είναι επομένως ένα μη ΓΤ δέντρο που συνδυάζει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά της ελίτ ποικιλίας μαζί με το χαρακτηριστικό ανθεκτικότητας στις ασθένειες.

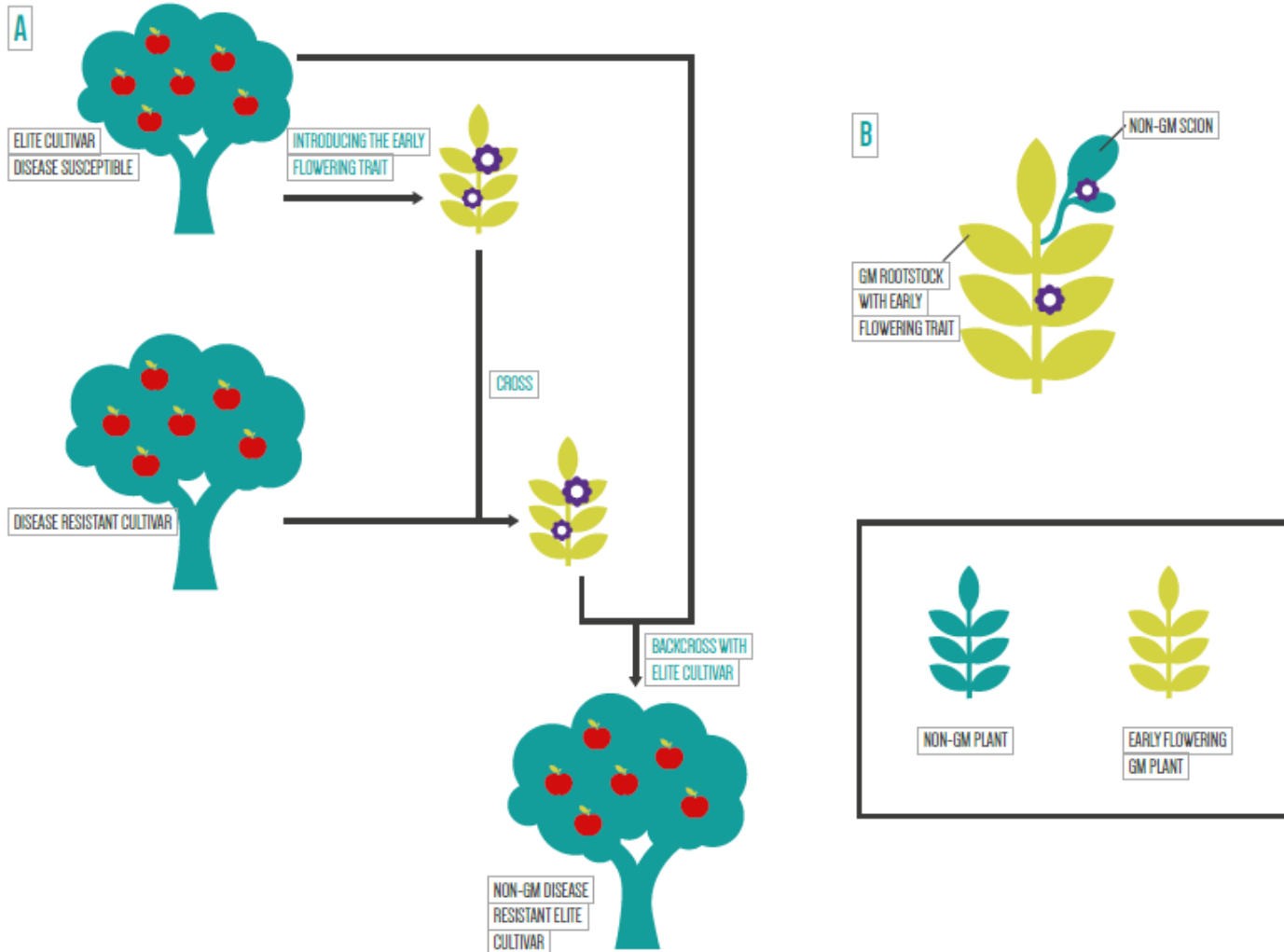
1. Επιταχυνόμενη βελτίωση

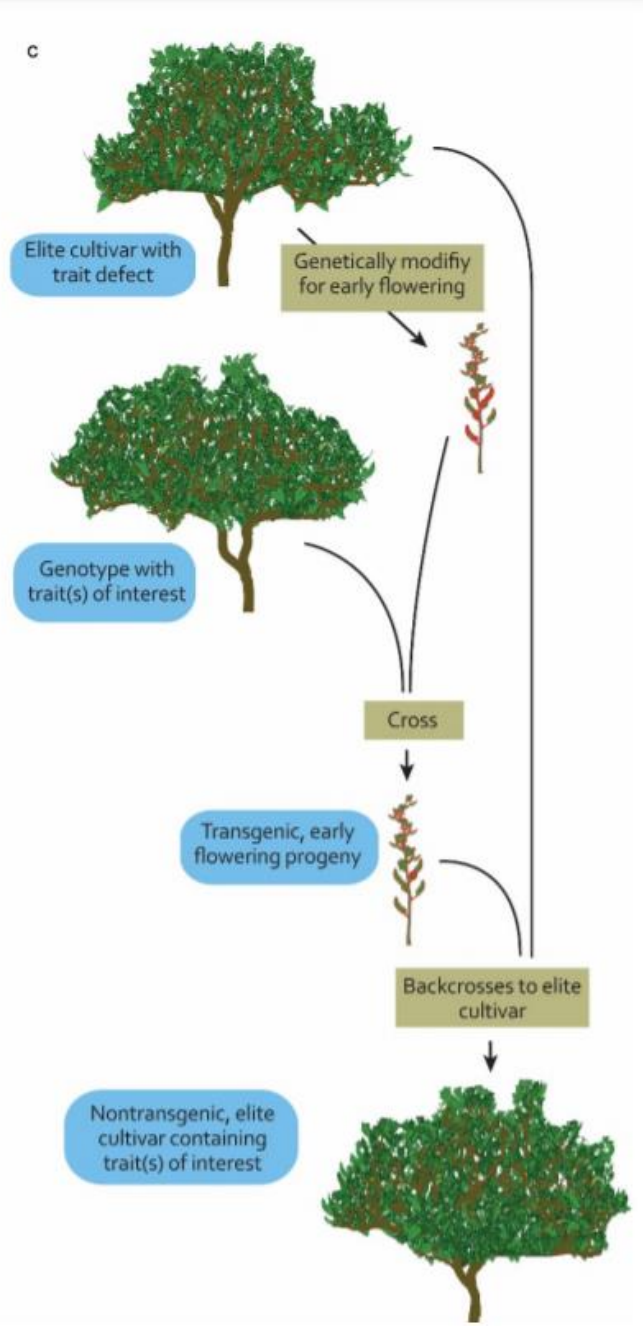
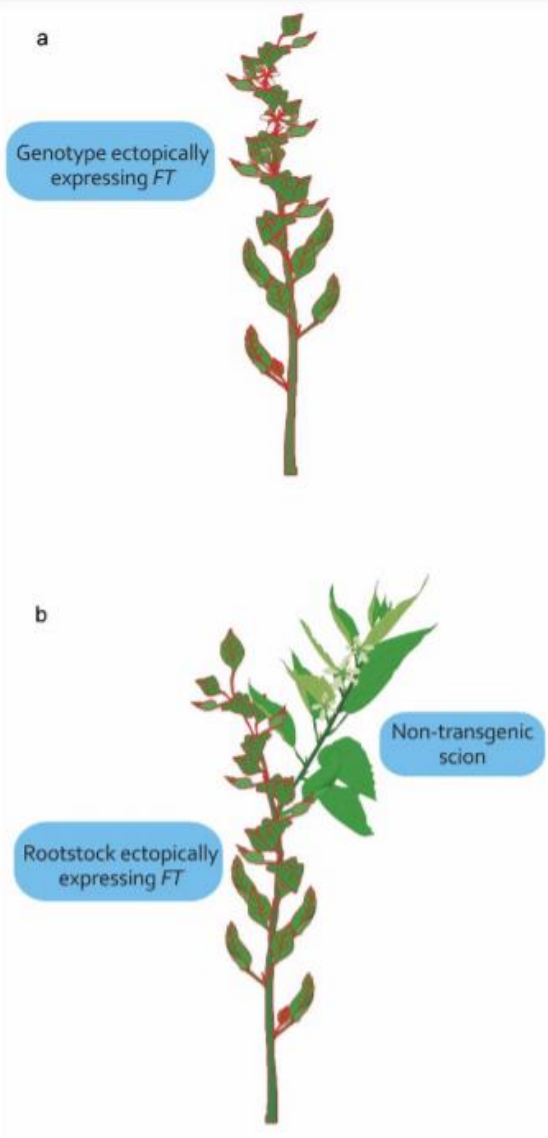


Fast-track breeding

- Β) Αντί να αναπτύξουμε μια GM ελίτ ποικιλία, ένα κλαδί της ελίτ ποικιλίας μπορεί να εμβολιαστεί σε ένα ΓΤ δέντρο που εκφράζει το γονίδιο πρόωρης ανθοφορίας. Οι πρωτεΐνες που προκαλούν ανθοφορία από το ΓΤ υποκείμενο θα μεταφερθούν σε ολόκληρο το εμβόλιο με αποτέλεσμα την πρόωρη ανθοφορία του. Τα ληφθέντα άνθη μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως δωρητές γύρης για περαιτέρω διασταυρώσεις

1. Επιταχυνόμενη βελτίωση





RESEARCH ARTICLE

Open Access

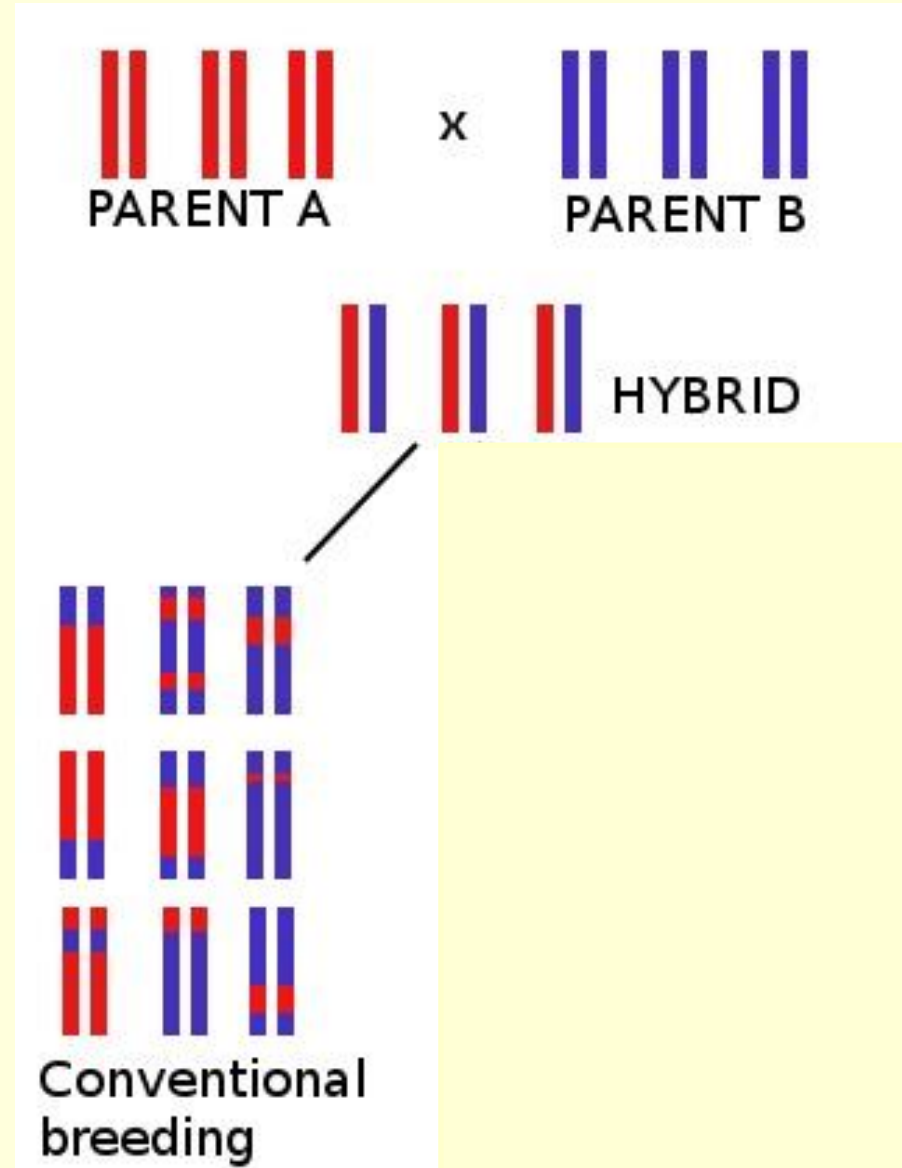


Fast-track breeding system to introduce CTV resistance of trifoliolate orange into citrus germplasm, by integrating early flowering transgenic plants with marker-assisted selection

Tomoko Endo^{1*}, Hiroshi Fujii¹, Mitsuo Omura² and Takehiko Shimada^{1*}

2. Αντίστροφη βελτίωση

- Όταν το διαγονίδιο αναστέλλει το φυσιολογικό ανασυνδυασμό στη μείωση
- Είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για να σπάσει ή να διατηρήσει ομάδες σύνδεσης (συγκληρονομούμενα γονίδια)



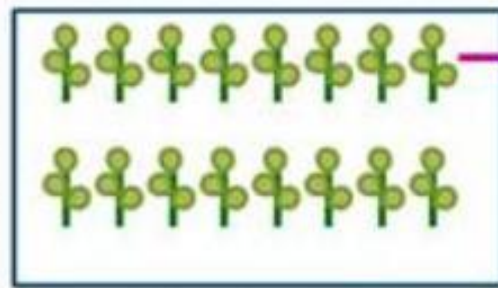
Reverse breeding

- Οι ποικιλίες- υβρίδια παράγονται επιλέγοντας και διασταυρώνοντας τις γονικές καθαρές σειρές για την αξιολόγηση της υβριδικής απόδοσης. Η αντίστροφη βελτίωση επιτρέπει το αντίθετο: επιλογή μη χαρακτηρισμένων ετεροζυγωτικών υβριδίων και δημιουργία γονικών καθαρών σειρών από αυτά.

Reverse breeding

- Με αυτόν τον τρόπο, οι επιλεγμένοι ετεροζυγώτες μπορούν να αναπαραχθούν ως υβρίδια F1, αυξάνοντας σημαντικά τον αριθμό των υβριδίων που μπορούν να ελεγχθούν σε προγράμματα βελτίωσης. Το κλειδί για την αντίστροφη βελτίωση είναι η καταστολή των μειωτικών ανασυνσυσμαμών σε ένα υβριδικό φυτό για να εξασφαλιστεί η μεταφορά των μη ανασυνδυασμένων χρωμοσωμάτων σε απλοειδείς γαμέτες.

Reverse Breeding vs. Traditional Breeding



Heterozygous
Heterogeneous
Population

Superior heterozygous plant of
unknown parentage

Engineered Meiosis

Reverse Breeding

Development of
parental lines

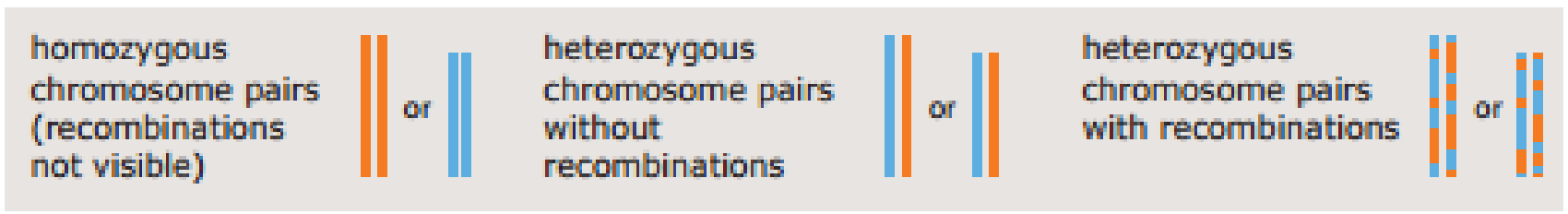
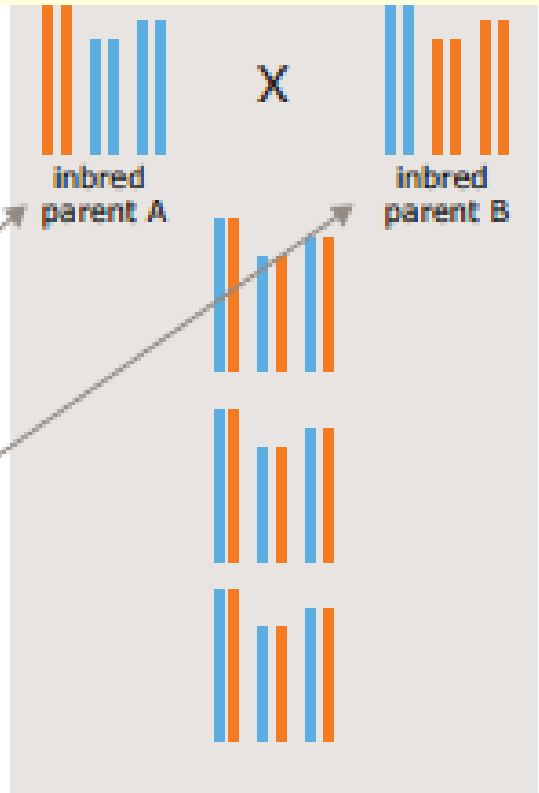
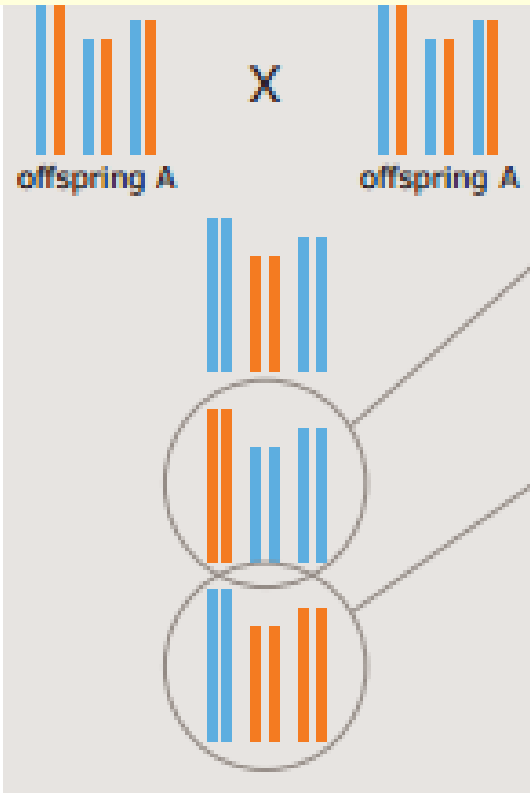
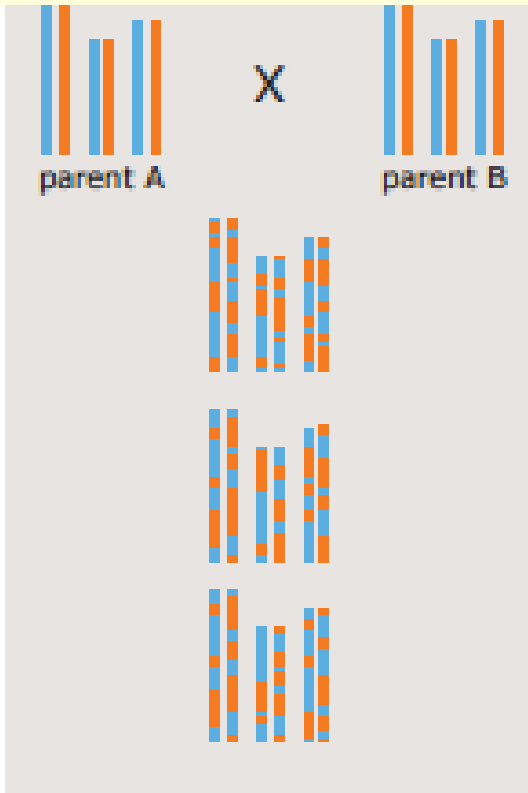
P₁

P₂

Traditional Breeding



Subsequently, the
obtained
homozygous lines
are hybridised, in
order to
reconstitute the
original genetic
composition of the
selected
heterozygous
plants.



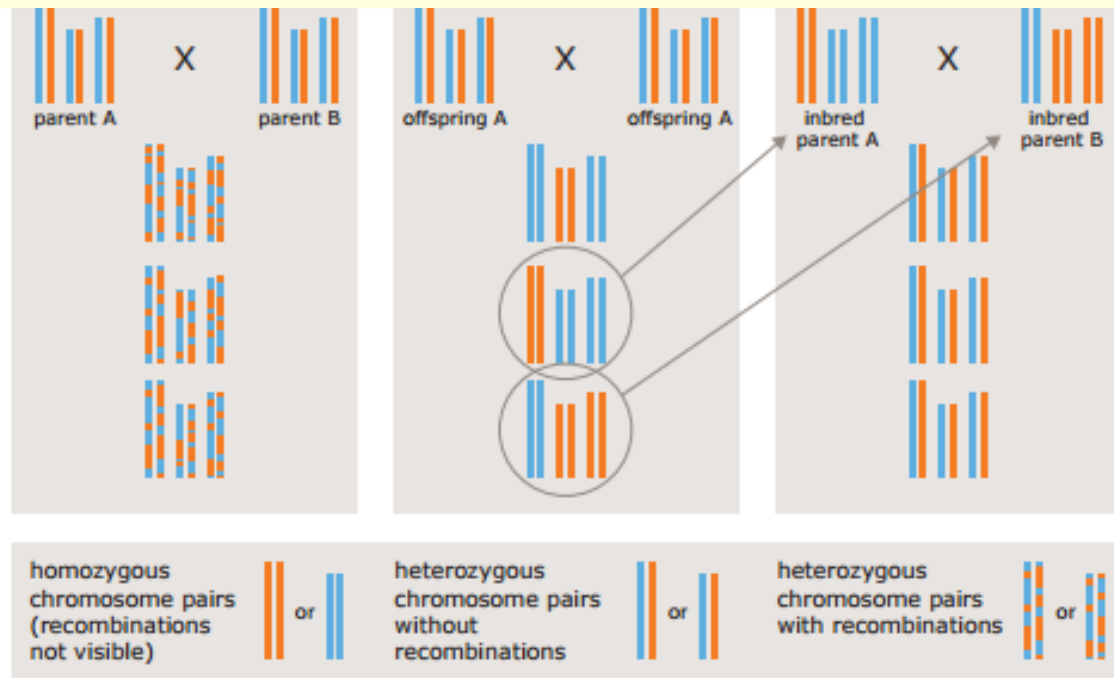


Figure 5 Schematic overview of final outcome of different breeding approaches. During conventional breeding recombination of chromosome pairs results in reshuffling of genetic material and unique combination of genetic variation will be lost. In reverse breeding a selected heterozygous offspring plant is crossed with itself, while chromosomal recombination is suppressed by a transgene and results therefore in lines with homozygous chromosome pairs. The haploidization step, this is producing plants in which only one chromosome of each chromosome pairs is present, and the subsequent doubling of these chromosomes again, so that doubled-haploid plants with homozygous chromosome pairs are produced, are not shown here (explanation of homozygous vs heterozygous chromosome pairs is shown at the bottom box). For hybrid variety production, parental lines in which the genetic variation of the chromosome pairs complements each other are selected from the reverse breeding program. Crossing such lines will result in uniform offspring hybrid plants (seeds), which are genetically similar to the plants with which the reverse breeding was started with.



*Exchange of
1 chromosome*



*Original F1 hybrid obtained
from the same parents*



Figure 8. Schematic representation of reverse breeding. Using GM technology an extra DNA fragment that will prevent crossing over of homologous chromosomes is incorporated in the DNA of a F1 hybrid (yellow dot). During the formation of gametes (e.g. pollen) the number of chromosomes is halved so that there is only 1 copy of every chromosome. The DNA of those gametes is subsequently doubled so that every chromosome gets an identical copy. Finally new plants are regenerated out of the doubled gametes. Some of the



*Original F1 hybrid obtained
from different parents*



resulting plants are genetically identical to the original parents of the F1 hybrid (represented by number 2 and 3), other plants (1 and 4) differ from the original parent but can be used to produce the same F1 hybrid. Reverse breeding also allows the production of new combinations (e.g. between 1 and 2). In this case the F1-hybrid is genetically identical to 1 of the parents except for 1 chromosome. Important to note is that only those plants having yellow dots in the above scheme are GM plants.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect



RESEARCH ARTICLE

Development and application of marker-assisted reverse breeding using hybrid maize germplasm



GUAN Yi-Xin^{1, 2, 3*}, WANG Bao-hua^{1*}, FENG Yan¹, LI Ping^{1, 3}

¹ Scientific Observing and Experimental Station of Maize in Plain Area of Southern Region, Ministry of Agriculture/School of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226019, P.R.China

² Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130102, P.R.China

³ Nantong Xinhe Bio-Technology Co., Ltd., Nantong 226010, P.R.China

3. RNA-dependent DNA methylation (RdDM)

- Η RdDM επάγει τη μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (TGS) στοχευμένων γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης του υποκινητή.
- Η επίτευξη στοχευμένης RdDM, γίνεται με εισαγωγή γονιδίου που κωδικοποιεί RNA που είναι ομόλογο με περιοχή του υποκινητή του προς σίγηση γονιδίου.
- Η μεταγραφή αυτών των γονιδίων οδηγεί σε παραγωγή δίκλωνων RNAs (dsRNAs), τα οποία, μετά από επεξεργασία από ειδικά ένζυμα, επάγουν μεθυλίωση των αλληλουχιών-στόχων του υποκινητή αναστέλλοντας έτσι την μεταγραφή του γονιδίου στόχου.

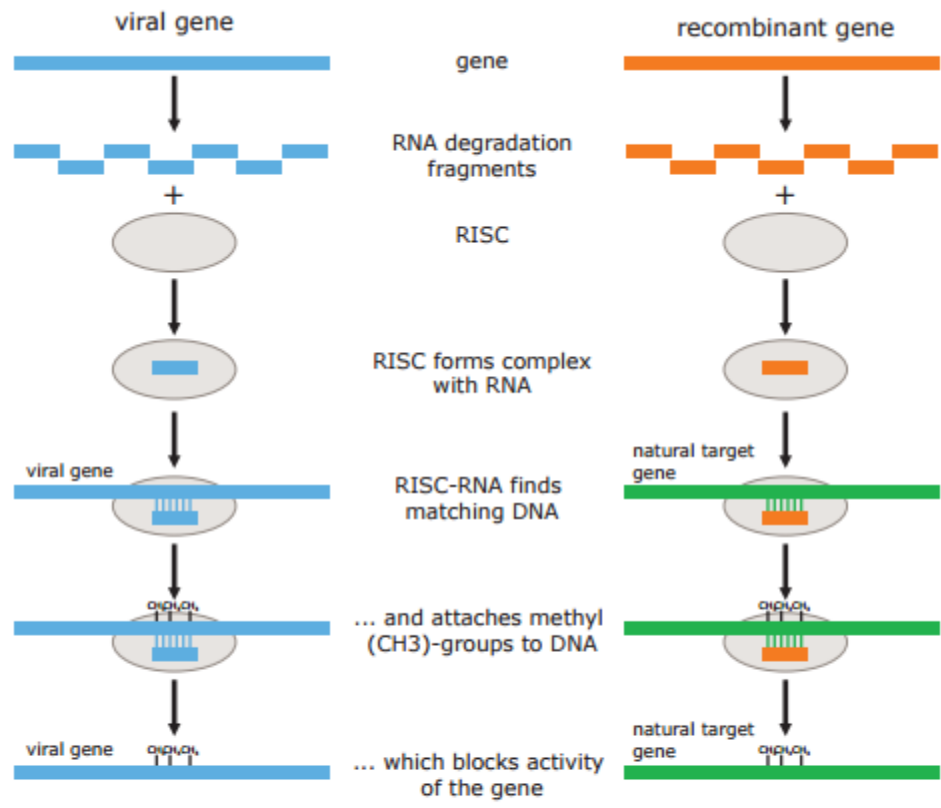
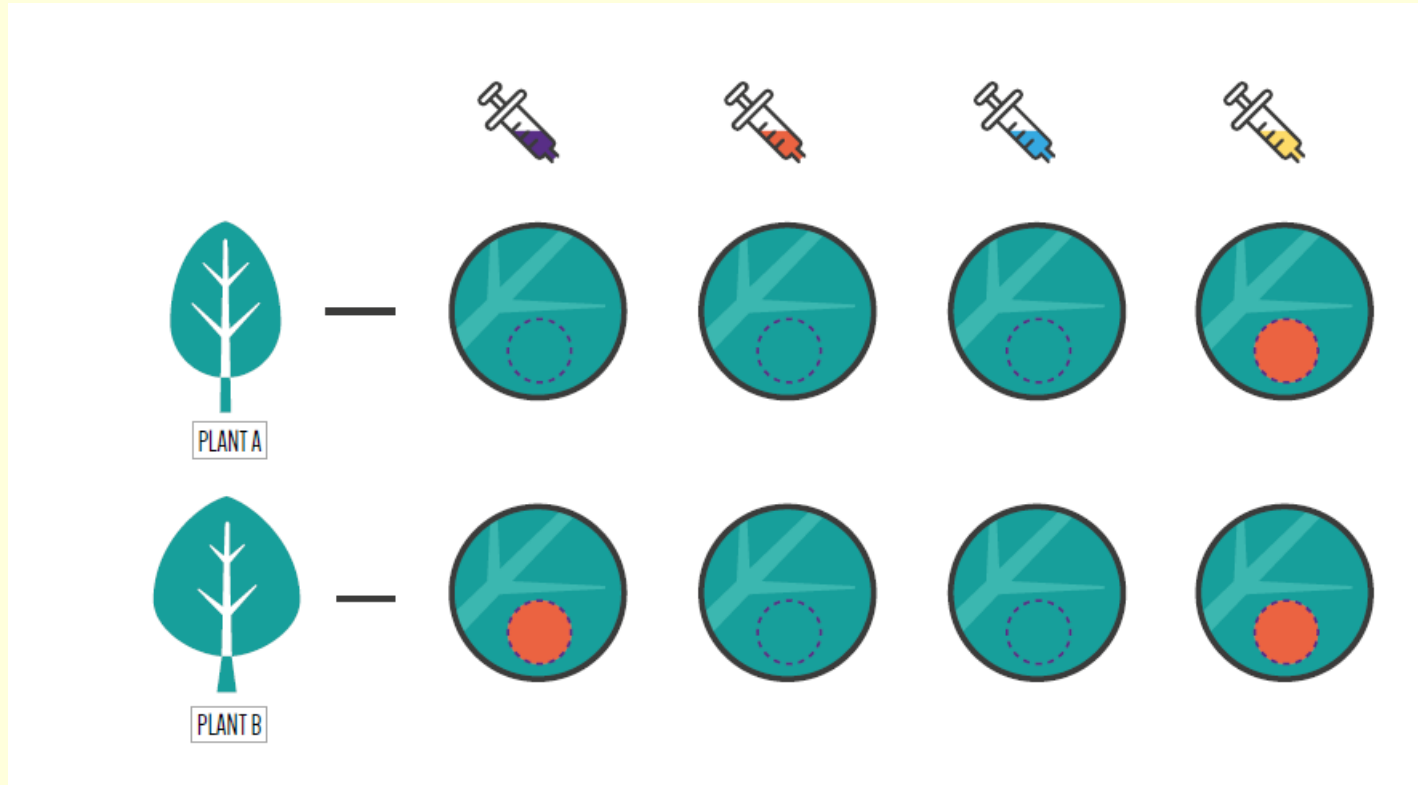


Figure 4 Simplified graphical representation of RdDM. On the left side the natural defence system leading to methylation of a viral gene is shown. On the right side recombinant-derived RNA molecules guide the RISC to its natural counterpart resulting in DNA methylation and subsequent block of gene activity. The recombinant gene is containing fragments of the natural gene to be targeted.

4. Agroinfiltration



Agrobacterium

- Σχηματική αναπαράσταση Διάφορα στελέχη Agrobacterium (μωβ, πορτοκαλί, μπλε, κίτρινο) που περιέχουν τις γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή διαφορετικών τελεστών, εγχέονται σε φύλλα. Τοπικά, το Agrobacterium μεταφέρει αυτές τις γενετικές πληροφορίες σε ορισμένα φυτικά κύτταρα που στη συνέχεια παράγουν τους αντίστοιχους τελεστές. Εάν αυτοί οι τελεστές αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες αντοχής του φυτού, παρατηρείται υπερευαισθησία (κόκκινος κύκλος).

Στοχευμένη επεξεργασία γονιδιώματος (Genome editing)

- Επιτρέπει την εισαγωγή στοχευμένης αλλαγής στο γονιδίωμα
- Επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους:
 - Νουκλεάσες που στοχεύουν συγκεκριμένη αλληλουχία (Site-directed nucleases – SDNs)
 - Μεταλλαξιγένεση που κατευθύνεται από ολογονουκλεοτίδια για αλλαγή σε συγκεκριμένη θέση (Oligonucleotide-directed mutagenesis – ODGM)
 - Συνδυασμένη εφαρμογή νουκλεασών και ολιγονουκλεοτιδίων-τεχνολογία RTDS™ Rapid Trait Development System

1. Site-directed Nucleases - SDN

1.0 Περιοριστικά ένζυμα

1.1 Μεγανουκλεάσες

1.2 Zink fingers

1.3 TALENs

1.4 CRISPR/Cas9

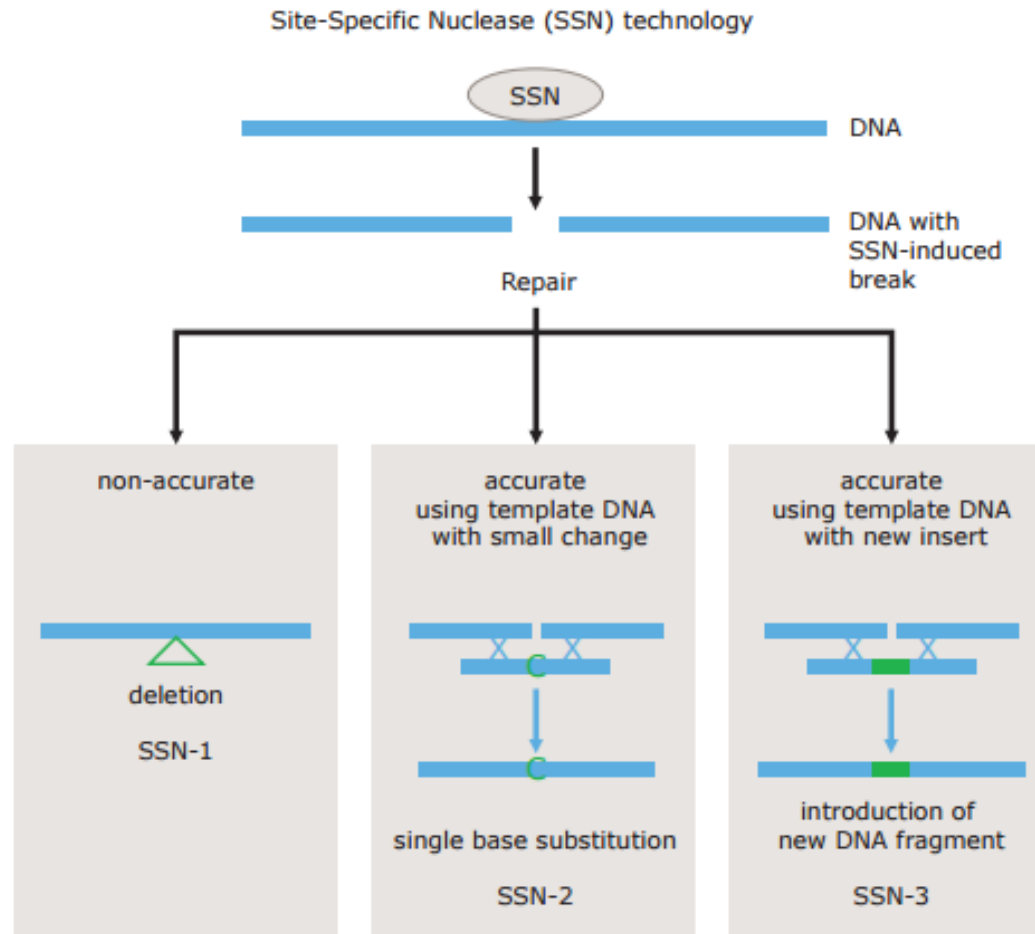
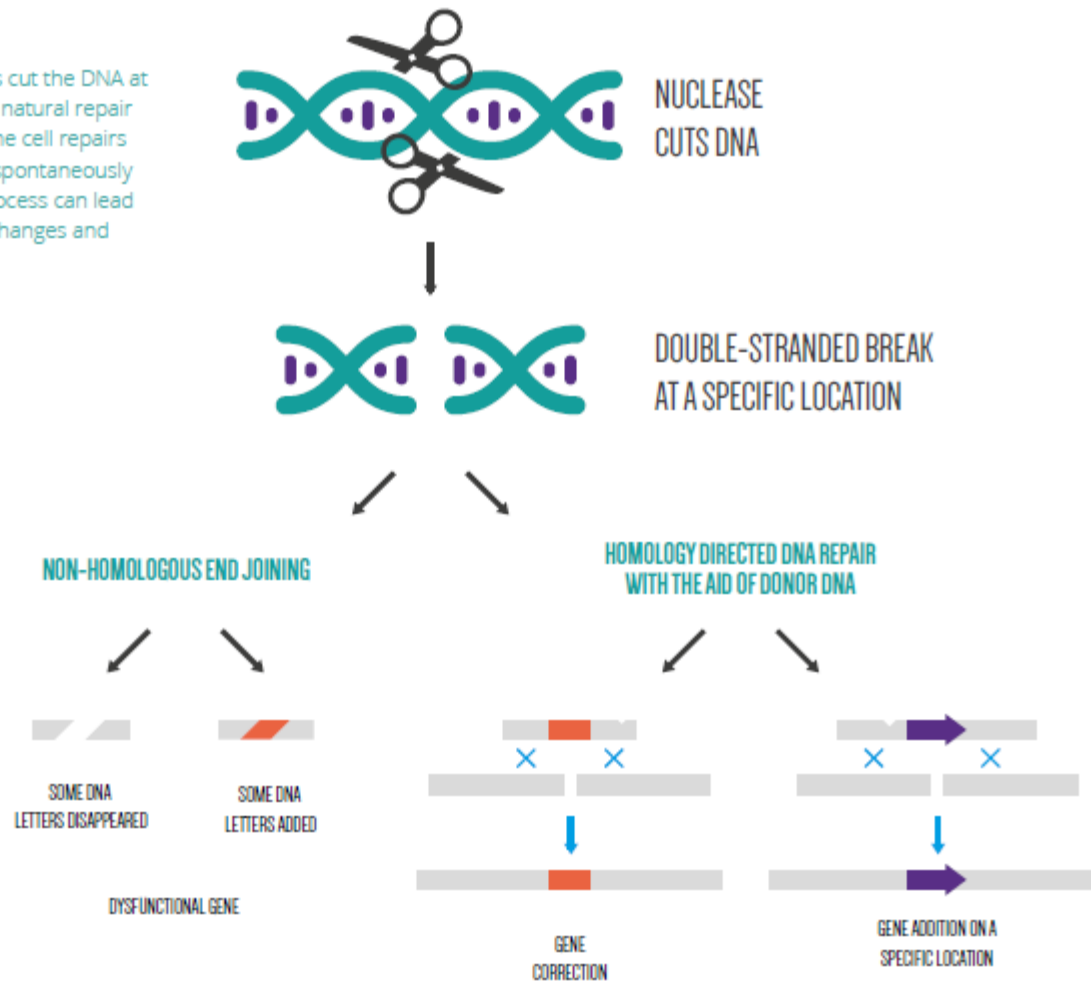


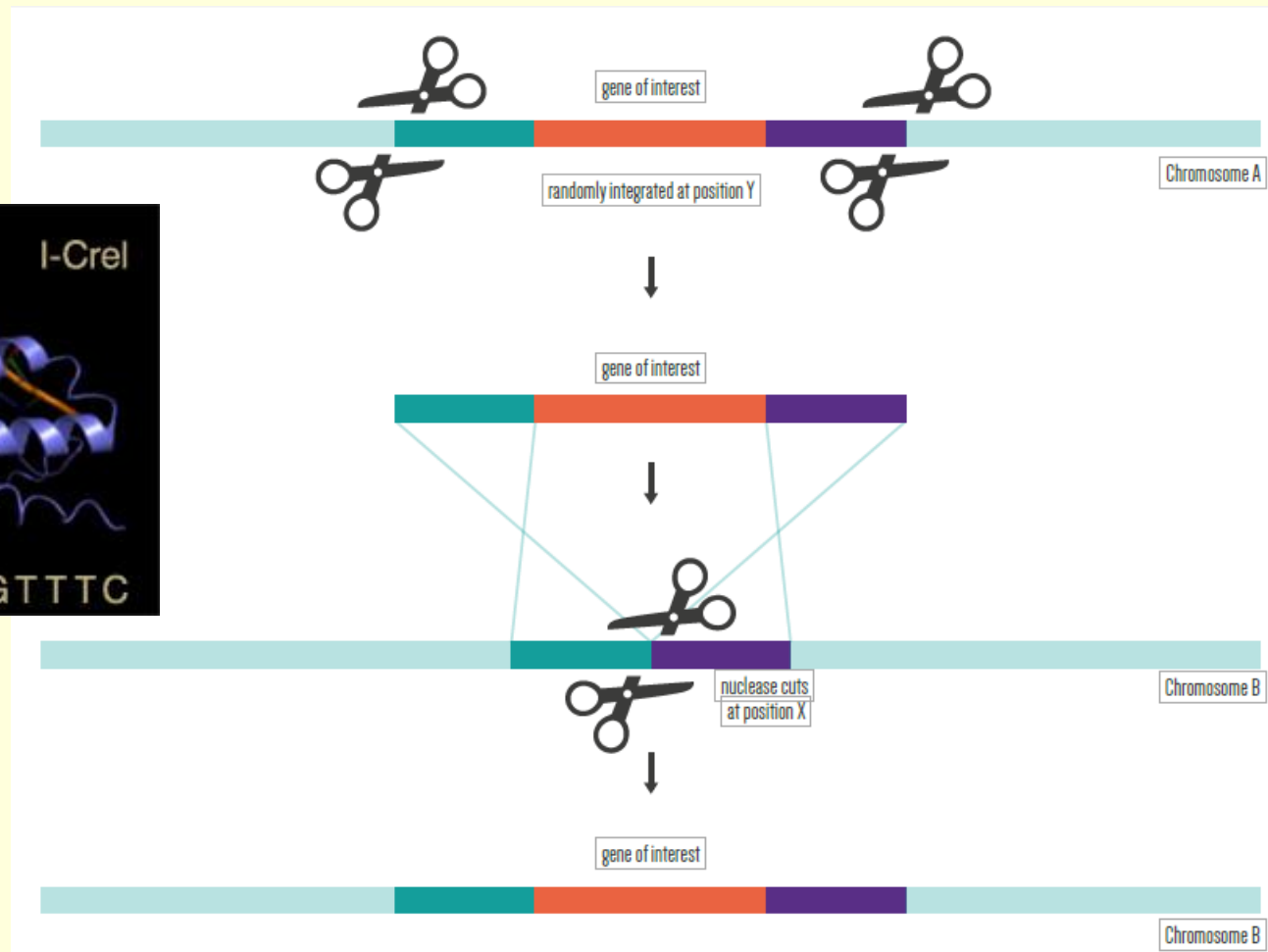
Figure 3 Outline of Sequence-Specific Nuclease technology SSN-1, SSN-2 and SSN-3. Note that the SSN is engineered such as to cause a break at an exact predefined location in the DNA.

Figure 12. Nucleases cut the DNA at a specific place. The natural repair mechanism within the cell repairs the cut. Errors that spontaneously occur during this process can lead to interesting DNA changes and thus new traits.



1.1 Μεγανουκλεάσες

Είναι μια κατηγορία από σπάνιες ενδονουκλεάσες που κωδικοποιούνται σε ιντρόνια και αναγνωρίζουν περιοχές του DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία 12-40 βάσεις όπου δημιουργούν σπάσιμο και εισαγωγή ενός ιντρονίου.



Genome editing (Επεξεργασία γονιδιώματος)

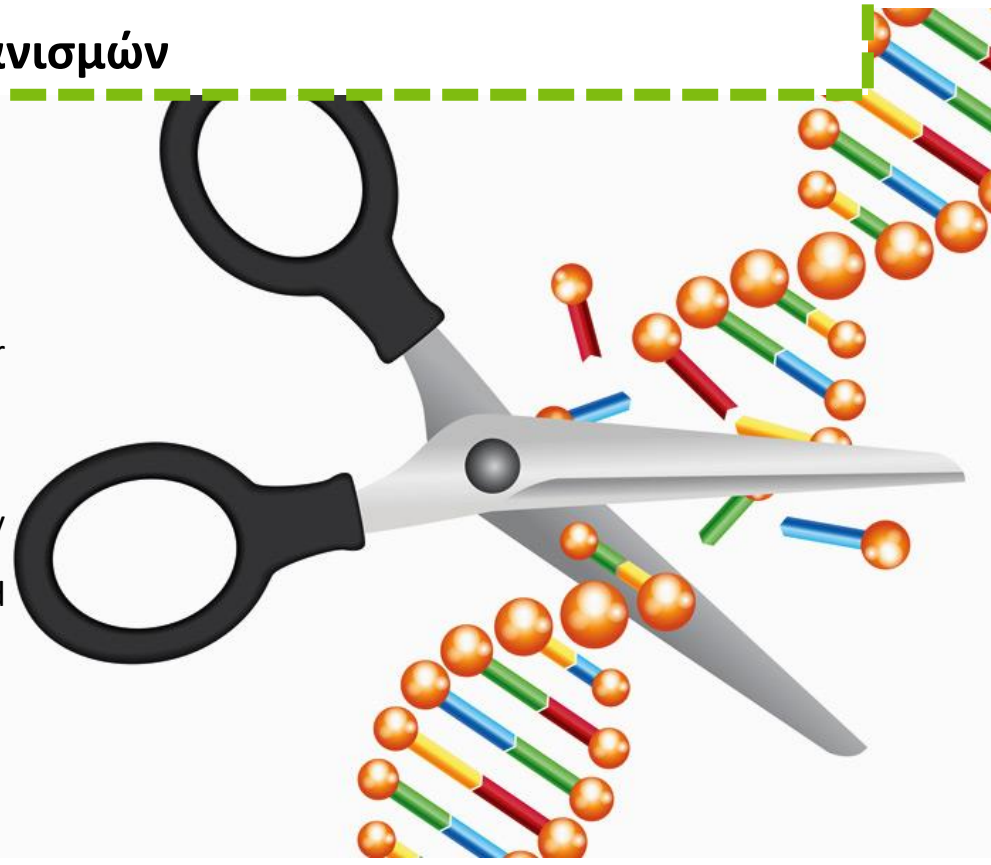
- Η μεταβολή της αλληλουχίας του DNA "in situ"
- Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση
 - Knock-outs
 - Σημειακές μεταλλάξεις
 - Εισαγωγές γονιδίων ή "επιθέματα προσγείωσης χαρακτηριστικών« (trait landing pads)
- Ιδανικά δεν αφήνει αποτύπωμα διαγονιδίων
- **Is genome engineering plant breeding, genetic engineering or both?**

Genome Editing (Επεξεργασία γονιδιώματος)

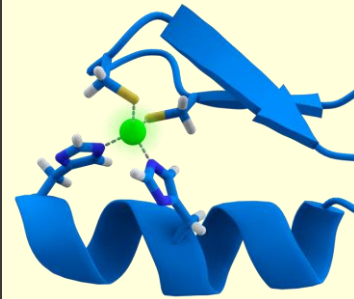
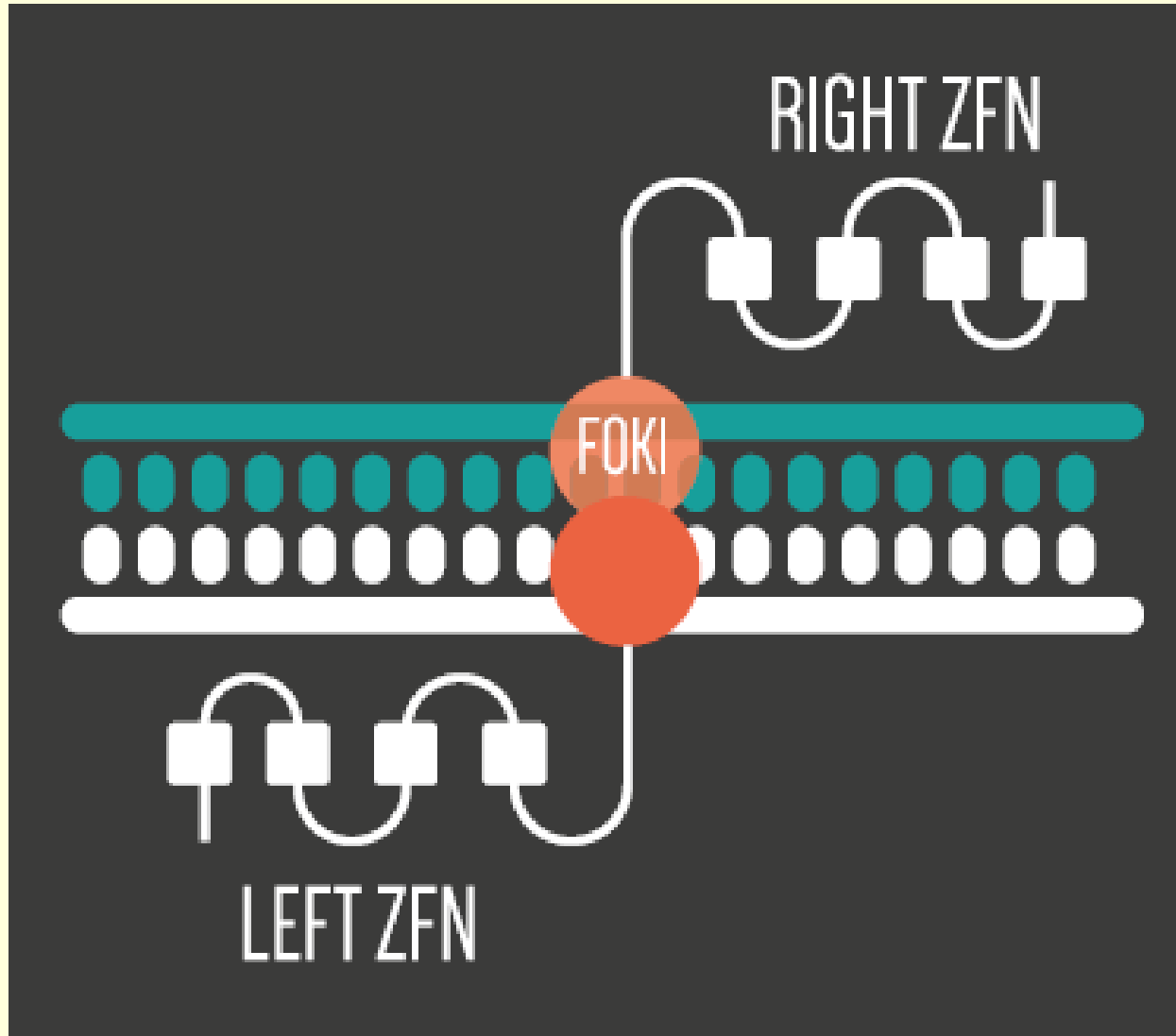
Στοχευμένες παρεμβάσεις στο μοριακό επίπεδο του DNA, που μεταβάλλουν σκόπιμα τα δομικά ή λειτουργικά χαρακτηριστικά των οργανισμών

Site-Directed Nucleases (SDN):

- ✓ **Zinc Finger**
- ✓ **TALENs** (transcription activator-like effector nucleases)
- ✓ **CRISPR/Cas9 systems** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - associated protein-9 nuclease (Cas9))
- ✓ ...



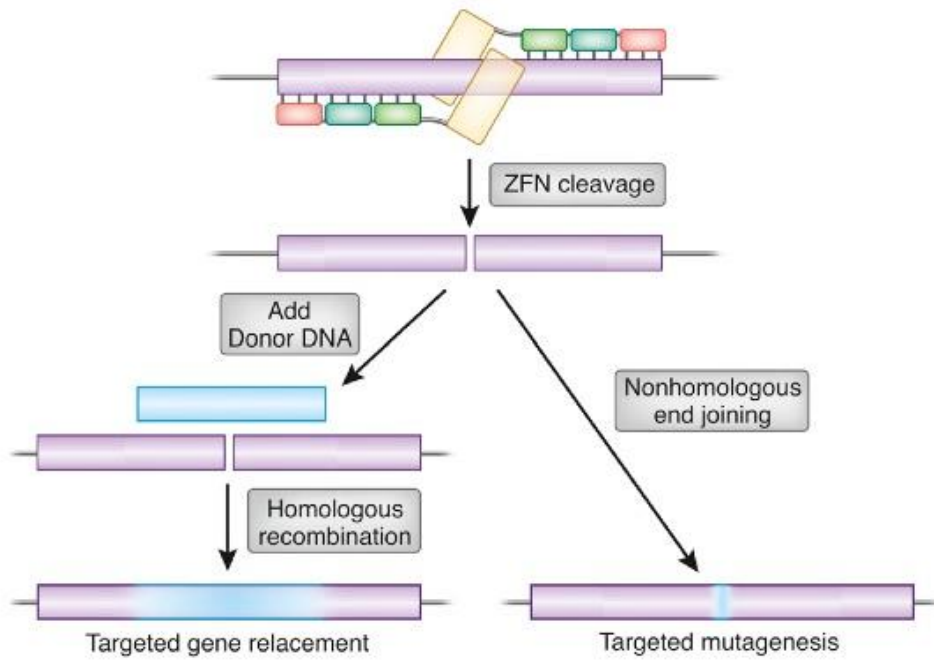
1.2 Zink fingers



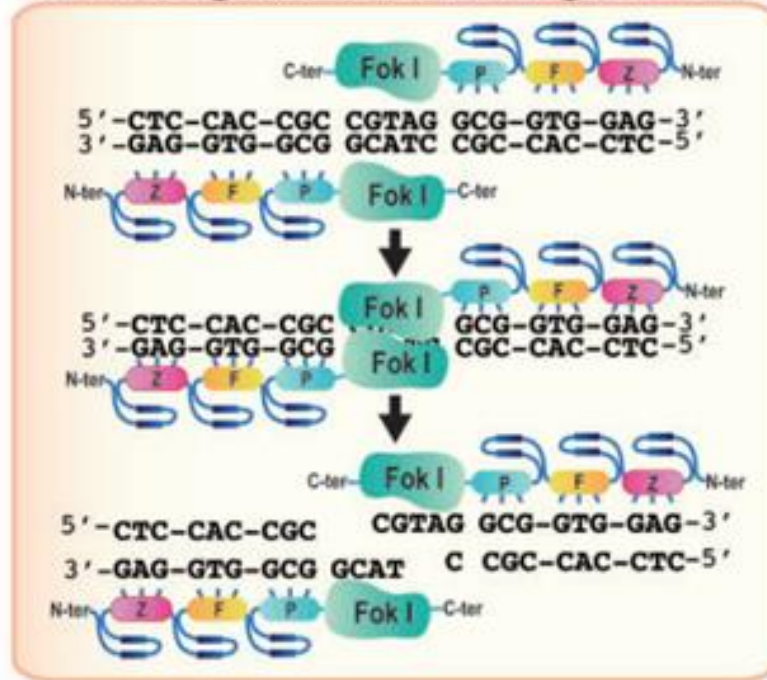
ZingFingerNucleases

- Οι ZFNs είναι πρωτεΐνες που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να κόβουν σε συγκεκριμένο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- Αποτελούνται από μια περιοχή "δακτύλου ψευδαργύρου" (αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA στο γονιδίωμα του φυτού) και μια νουκλεάση που κόβει το δίκλωνο DNA.
- Το σκεπτικό για την ανάπτυξη της τεχνολογίας ZFN για την βελτίωση των φυτών είναι η δημιουργία ενός εργαλείου που επιτρέπει την εισαγωγή ειδικών για τη θέση μεταλλάξεων στο γονιδίωμα των φυτών ή την επιλεκτική ενσωμάτωση γονιδίων.

ZFG



A ZFN recognition and cleavage of DNA



Fok I

α -helix
 β -sheet
 Zinc Finger

Table 1

Reported instances of successful ZFN-induced gene targeting

Organism	Latin name	Method	TM	TGR	References
Animals					
Fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	Heat-shock induction	+	+	Bibikova et al. (2002, 2003) , Beumer et al. (2006)
		Embryo injection	+	+	Beumer et al. (2008)
Nematode	<i>C. elegans</i>	Gonad injection	+		Morton et al. (2006)
Silkworm	<i>Bombyx mori</i>	Embryo injection	+		Takasu et al. (2010)
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	Zygote injection	+		Meng et al. (2008) , Dovon et al. (2008) , Foley et al. (2009)
Sea urchin	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	Embryo injection	+		Ochiai et al. (2010)
Frog	<i>Xenopus tropicalis</i>	Embryo injection	+		Young et al. (2011)
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	Zygote injection	+	+	Geurts et al. (2009) , Mashimo et al. (2010)
Mouse	<i>Mus musculus</i>	Zygote injection	+	+	Meyer et al. (2010) , Carberv et al. (2010) , Cui et al. (2011)
Plants					
Cress	<i>A. thaliana</i>	Agrobacterium	+		Carberv et al. (2010) , Cui et al. (2011) , Lloyd et al. (2005) , Zhang et al. (2010) , Osakabe et al. (2010) , De
Tobacco	<i>Nicotiana</i> sp.	Protoplasts	+	+	Wright et al. (2005) , Townsend et al. (2009)
		Agrobacterium	+	+	Cai et al. (2009)
		Viral delivery	+		Marton et al. (2010)
Maize	<i>Zea mays</i>	Cell culture	+	+	Shukla et al. (2009)
Petunia	<i>Petunia</i> sp.	Viral delivery	+		Marton et al. (2010)
Mammalian cells in culture					
Human	<i>Homo sapiens</i>	DNA transformation	+	+	Porteus and Baltimore (2003) , Umov et al. (2005) , Alwin et al. (2005) , Perez et al. (2008) , Hockemeyer et al. (2009) , Kim et al. (2009)
		Viral delivery	+	+	Lombardo et al. (2007)
Mouse	<i>M. musculus</i>	DNA transformation	+	+	Goldberg et al. (2010) , Connelly et al. (2010)
Hamster	<i>Cricetulus griseus</i>	DNA transformation	+	+	Santiago et al. (2008) , Liu et al. (2010) , Cost et al. (2010)
Pig	<i>Sus domestica</i>	DNA transformation	+		Watanabe et al. (2010)

TM refers to targeted mutagenesis by nonhomologous end joining TGR is targeted gene replacement by homologous recombination. In addition to the examples shown here, I have heard reliable, but unpublished, references is not exhaustive but provides guidance to key publications

Quick overview around Zinc Fingers and TALENs

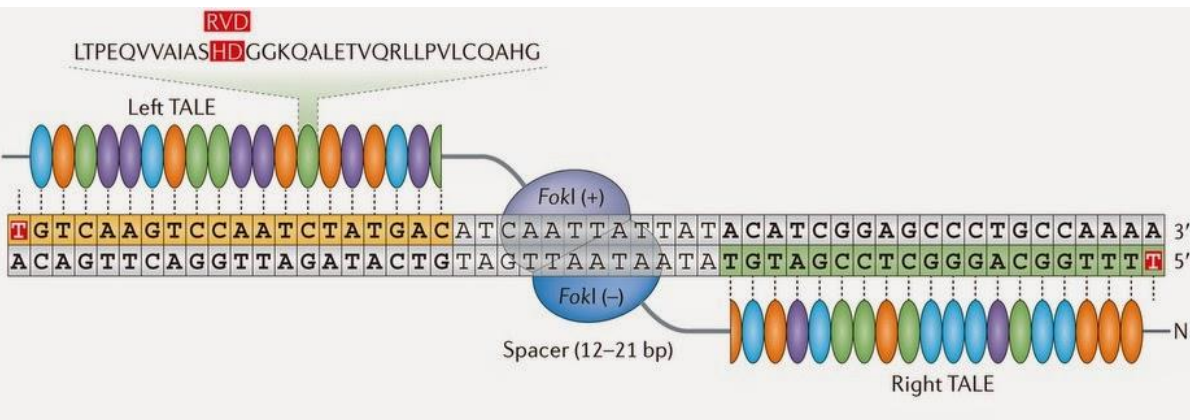
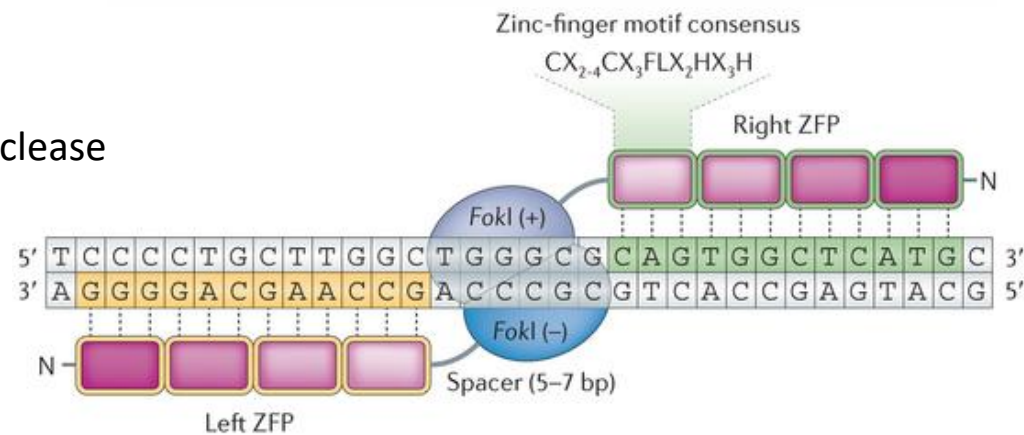
Zinc Fingers Nucleases (ZFNs):

- ❖ DNA-binding zinc-finger motifs + an endonuclease

FokI

- ❖ Each module recognizes a nucleotide triplet

- ❖ FokI endonuclease functions as a dimer

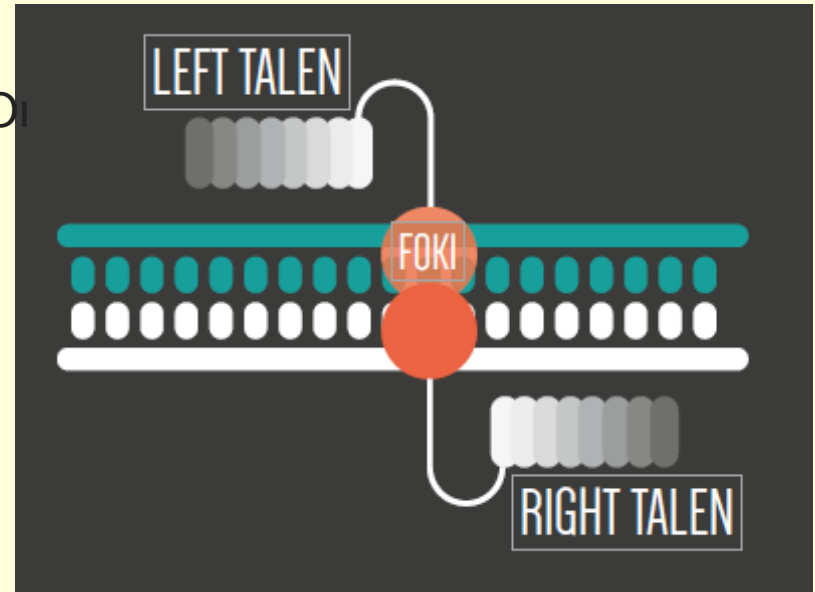


TALENs:

- ❖ DNA-binding domain (amino acids repeats) + FokI endonuclease
- ❖ Each amino acid recognizes one nucleotide of the target DNA sequence
- ❖ FokI functions as a dimer

1.3 TALENs

Σχεδόν όλες οι τεχνικές βελτίωσης βασίζονται σε συστήματα που υπάρχουν στη φύση, συμπεριλαμβανομένης της τεχνολογίας TALEN. Οι TAL-effectors είναι πρωτεΐνες δέσμησης DNA που προέρχονται από βακτήρια του γένους *Xanthomonas*. Αυτά τα βακτήρια προκαλούν αρκετές ασθένειες των φυτών. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης του φυτού από το βακτήριο, τα βακτήρια εγχέουν τελεστές TAL στα φυτικά κύτταρα.



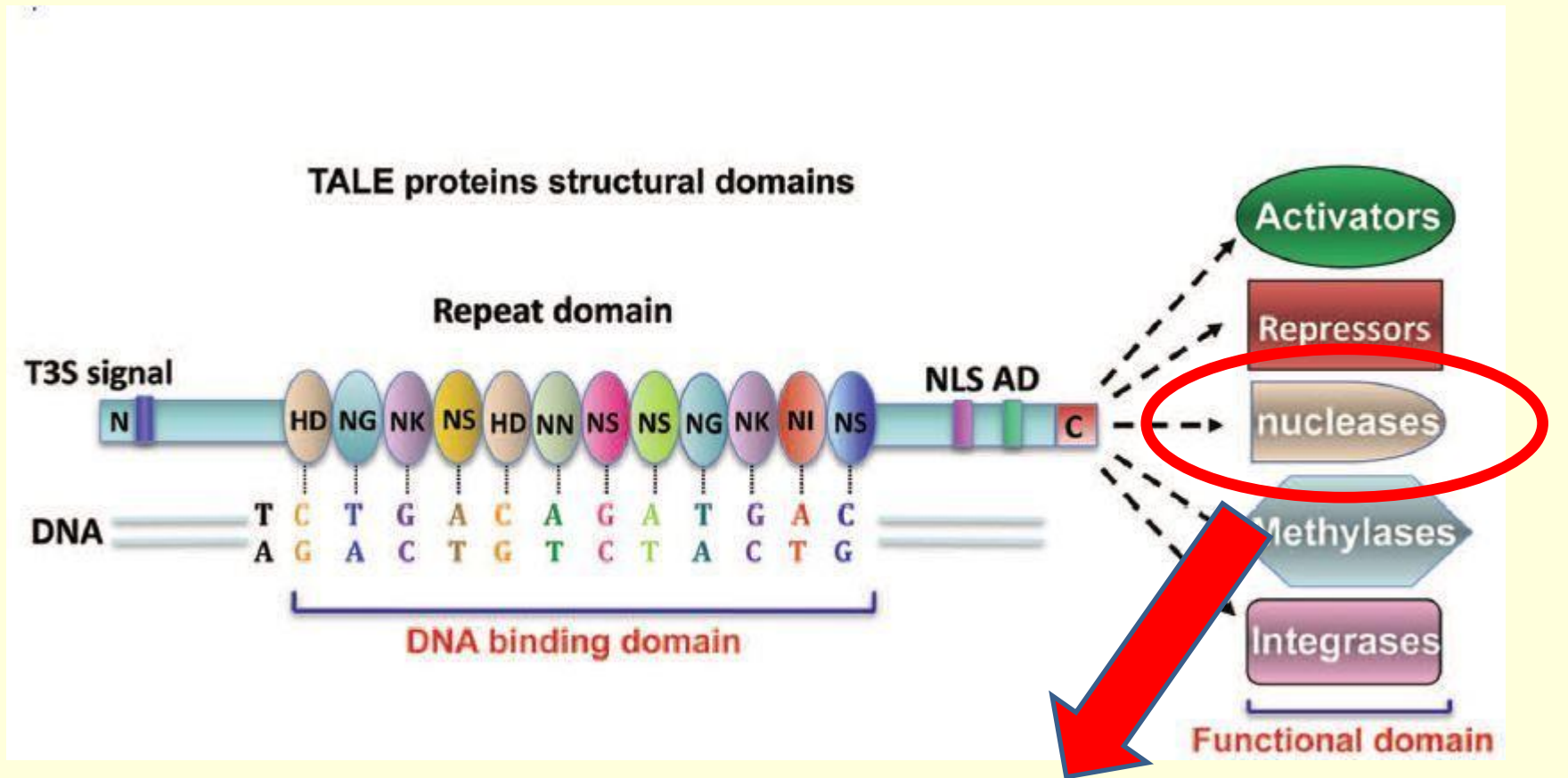
transcription activator-like effector nucleases

TALENS

-

Οι τελεστές TAL μεταφέρονται έπειτα στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων για να δεσμευτούν στο DNA του φυτού και ειδικότερα στους υποκινητές ορισμένων γονιδίων. Αυτή η δέσμευση ενεργοποιεί τη δραστηριότητα των γονιδίων των φυτών που ωφελούν τη μόλυνση από τα βακτηρίδια. Επομένως, ο *Xanthomonas* χρησιμοποιεί τελεστές TAL για να αυξήσει την ευαισθησία του φυτού. Είναι ενδιαφέρον ότι η αλληλουχία αναγνώρισης DNA των τελεστών TAL μπορεί να ρυθμιστεί για να αναπτυχθούν τελεστές TAL που μπορούν να αναγνωρίσουν σχεδόν όλες τις αλληλουχίες DNA.

Transcription activator – like effectors (TALEs)



Transcription activator – like effector nucleases (TALENs)

Συνοψίζοντας...

Hybrid Meganuclease



ZFN

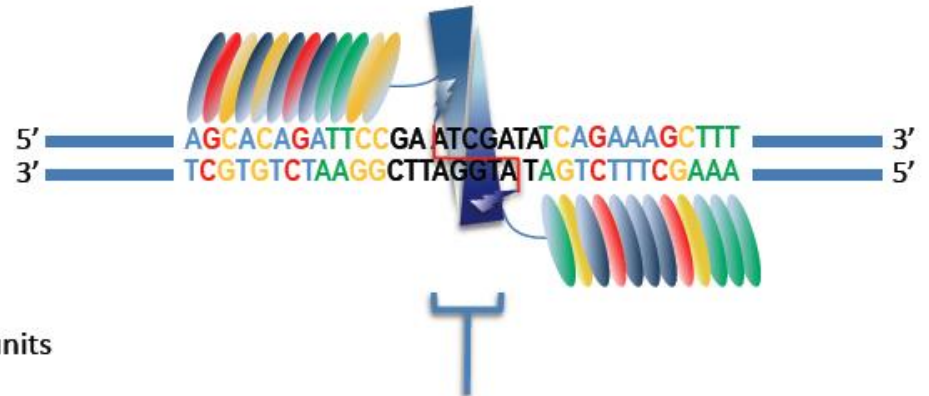


Zinc finger domains

TALEN



TALE subunits



active FokI catalytic subunit heterodimer

1.3 CRISPR/Cas

In CRISPR/Cas, **CRISPR** stands for **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats** and **Cas** for **CRISPR-associated**.

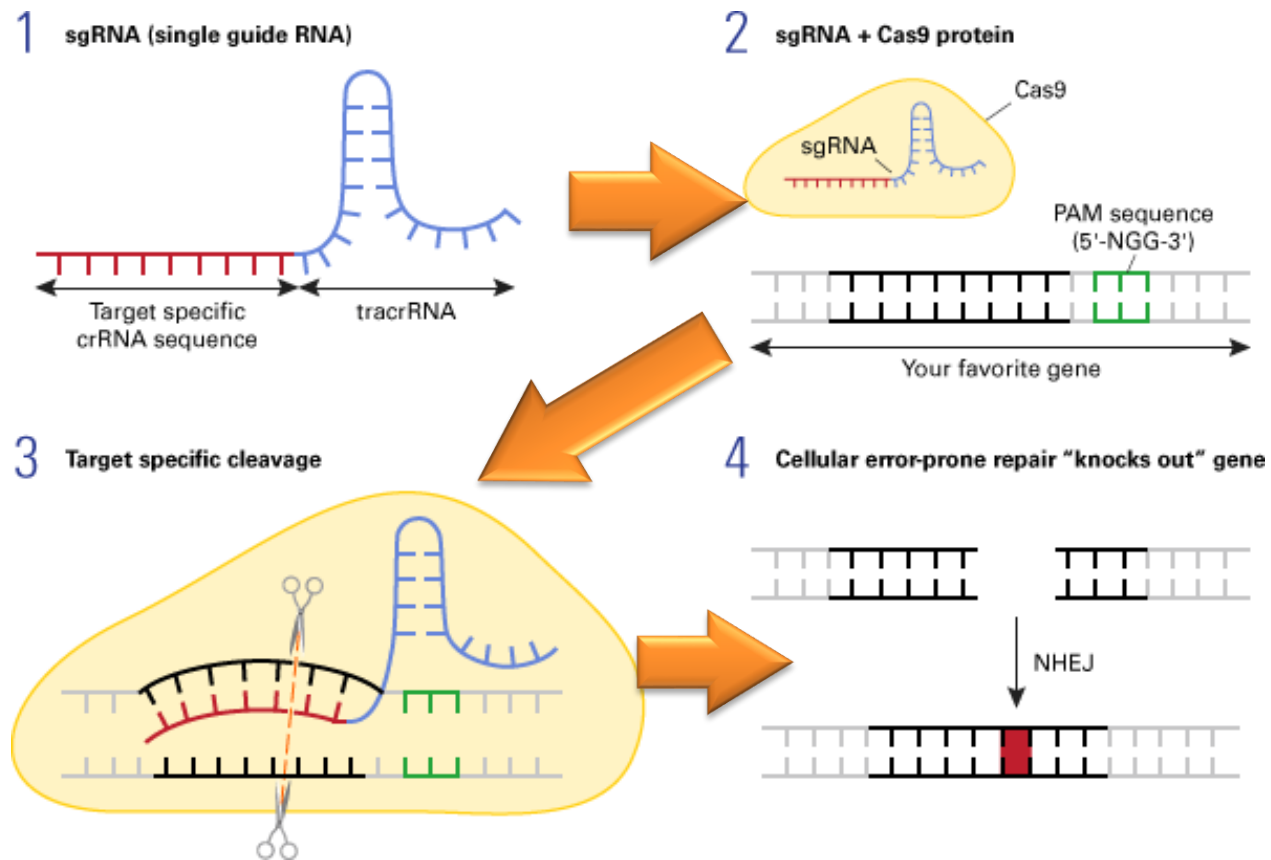
Όταν τα βακτήρια μολύνονται με ιό, τα μόρια RNA του του βακτηριακού συστήματος CRISPR / Cas δεσμεύονται στο RNA του ιού. Αυτός ο δεσμός καλεί τις βακτηριακές νουκλεάσες να κόψουν το μικρό RNA και έτσι να καταστρέψει τον ιό. Στο σύστημα CRISPR / Cas είναι επομένως το βακτηριακό Μόρια RNA που καθορίζουν την ακρίβεια του των νουκλεασών Cas



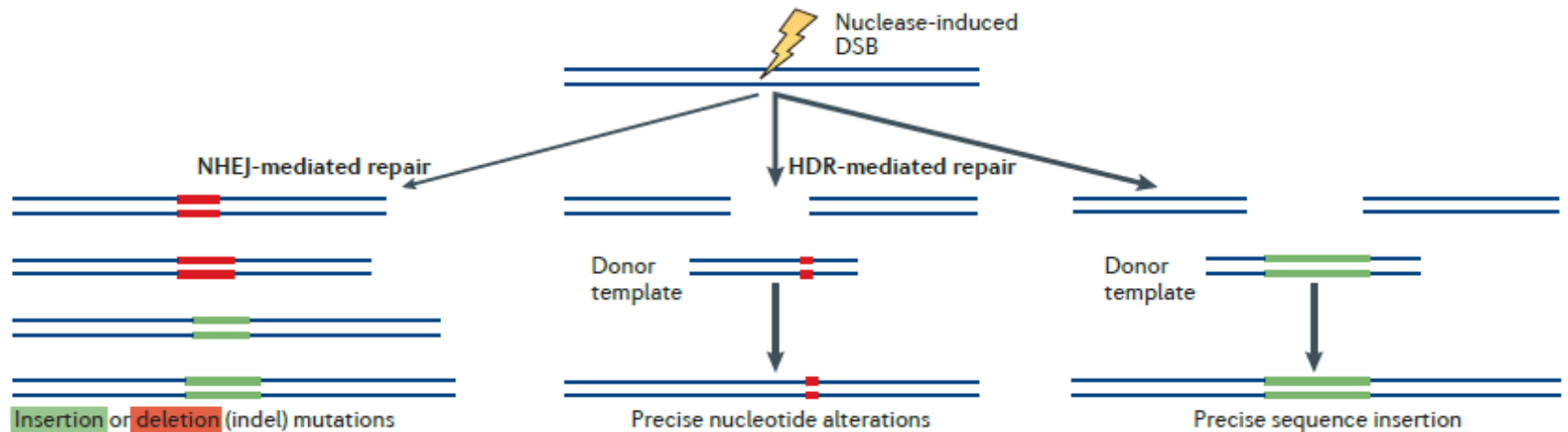
Genome Editing: CRISPR/Cas9 System



- ❖ Ενιαίο οδηγό RNA (sgRNA) δεσμευμένο σε μια νουκλεάση
- ❖ Το σύμπλεγμα περνά μέσα από το DNA μέχρι να βρει μια συμπληρωματική αλυσίδα
- ❖ Μια αλλαγή διαμορφωσης ενεργοποιεί την νουκλεάση
- ❖ Το δίκλωνο DNA κόβεται
- ❖ Το DNA επιδιορθώνεται στο κύτταρο



DNA Repair Mechanisms



DNA repair mechanisms, during which genome modifications occur:

❖ Non-Homologous End Joining (NHEJ)

Produces a small insertion or deletion (without the use of exogenous DNA)

❖ Homology-Directed Repair (HDR)

Can introduce a desired DNA sequence or gene into a targeted site

Μία μετάλλαξη στο γονιδίωμα προκαλείται με επεξεργασία, διαγραφή, εισαγωγή ή αντικατάσταση γονιδίων

Επεξεργασία γονιδιώματος για την δημιουργία βελτιωμένων φυτών

Η βελτίωση φυτών, έχει συμβάλει τεράστια στην αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων αλλά ...

Υπάρχουν περιορισμοί...

Υπερ:

- ❖ Ακριβής κατά την εισαγωγή του επιθυμητού χαρακτηριστικού
- ❖ Γρήγορη στην απόκτηση του τελικού προϊόντος
- ❖ Μπορεί να αυξήσει την παραγωγικότητα και την ποιότητα των καλλιεργειών (π.χ. παραγωγή ανθεκτικών φυτών, κ.λπ.)



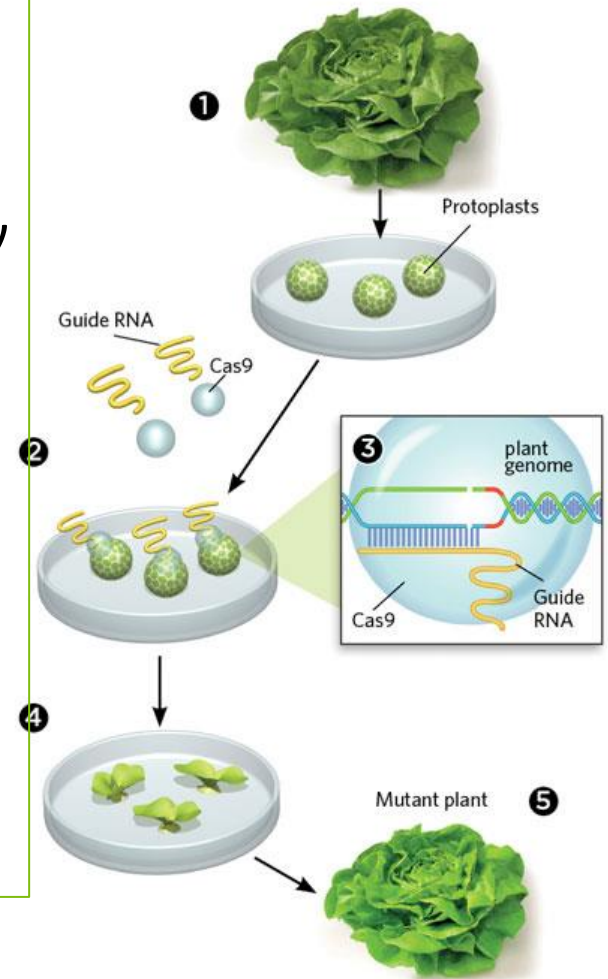
Genome Editing

Κατά:

- ❖ Η τυχαία φύση των παρεμβολών γονιδίων μπορεί να έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα
- ❖ Δεν ενδείκνυνται για την πραγματοποίηση μεγάλων συντονισμένων αλλαγών (π.χ. προσθήκη ολόκληρης μεταβολικής οδού)
- ❖ Υψηλά ρυθμιζόμενη

Genome editing to breed better plants

- ❖ Τροποποίηση καθοδηγούμενη από τη συγκεκριμένη θέση-στόχο για ένα νέο προϊόν
- ❖ Μείωση χρόνου παραγωγής προϊόντος
- ❖ Μείωση του αριθμού των εμπλεκόμενων φυτών
- ❖ Εισαγωγή μακρύτερων ακολουθιών DNA



Εφαρμογές

- ❖ Έρευνα (π.χ. διευκρίνιση της λειτουργίας γονιδίου)
- ❖ Εξαλειψη των ανεπιθύμητων προϊόντων που επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα, την αποθήκευση και την επεξεργασία των τροφίμων
- ❖ Συσσώρευση μεταβολιτών αξίας (eg: λιπαρά οξέα)
- ❖ Παράλληλη δημιουργία μεταλλάξεων σε πολλά μέλη της οικογένειας γονιδίων
- ❖ Δημιουργία ποικιλιών ανθεκτικών σε επιβλαβείς οργανισμούς και ασθένειες (π.χ ανθεκτικότητα ρυζιού σε *Xanthomonas oryzae*)



Take home message...

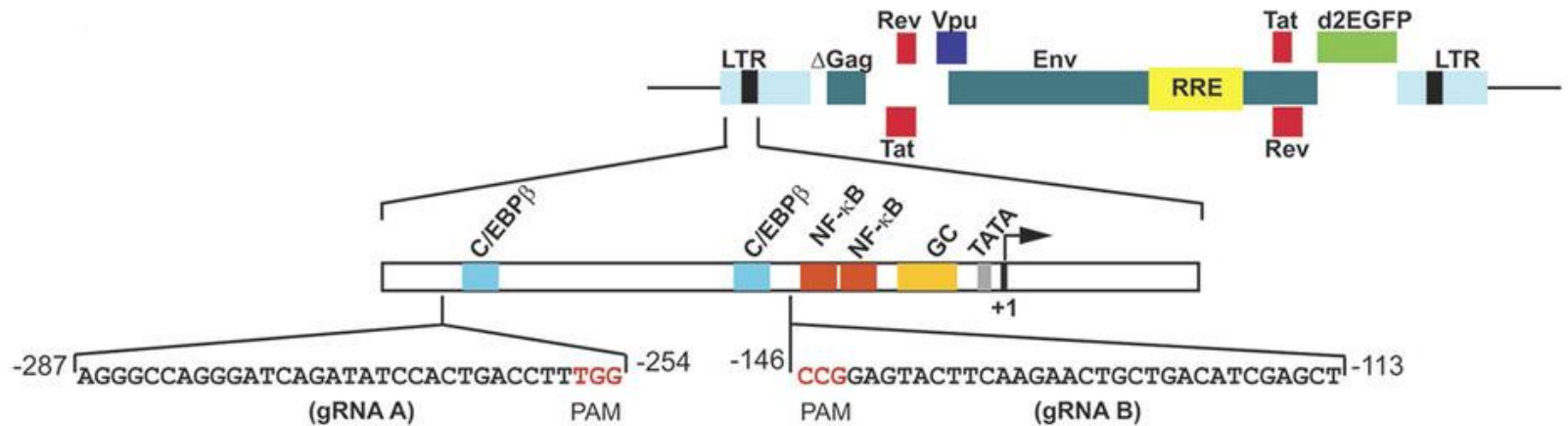


Η επεξεργασία γονιδιώματος έχει πολλές δυνατότητες να παράγει βελτιωμένα φυτά, αλλά αυτό το δυναμικό μπορεί να μεγιστοποιηθεί μόνο όταν συνδυάζεται με γνώση και εμπειρία

Potential



CRISPR/Cas9 used to remove entire HIV-1 genome from infected T-cells



Εφαρμογές στα φυτά

Nagamangala K et al. **Looking forward to genetically edited fruit crops.** Trends Biotechnol. 2014 Aug 12. pii: S0167-7799(14)00147-4.

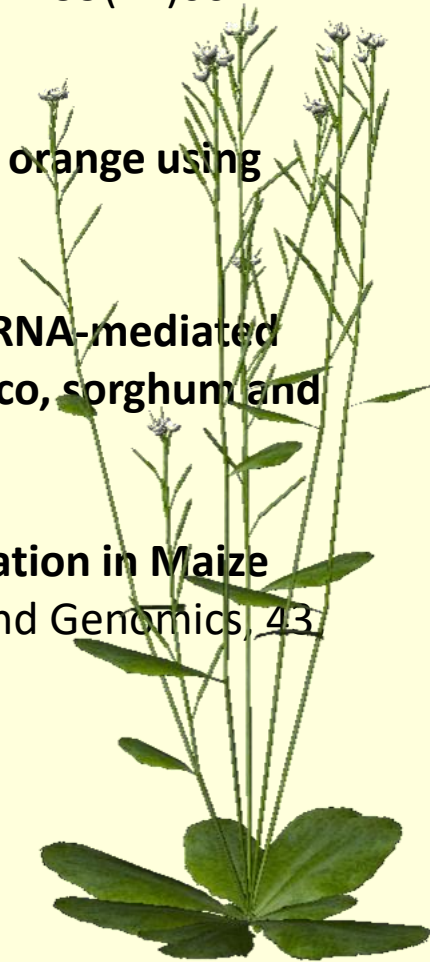


Jia H, Wang N. **Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA.** PLoS One. 2014 Apr 7;9(4):e93806.

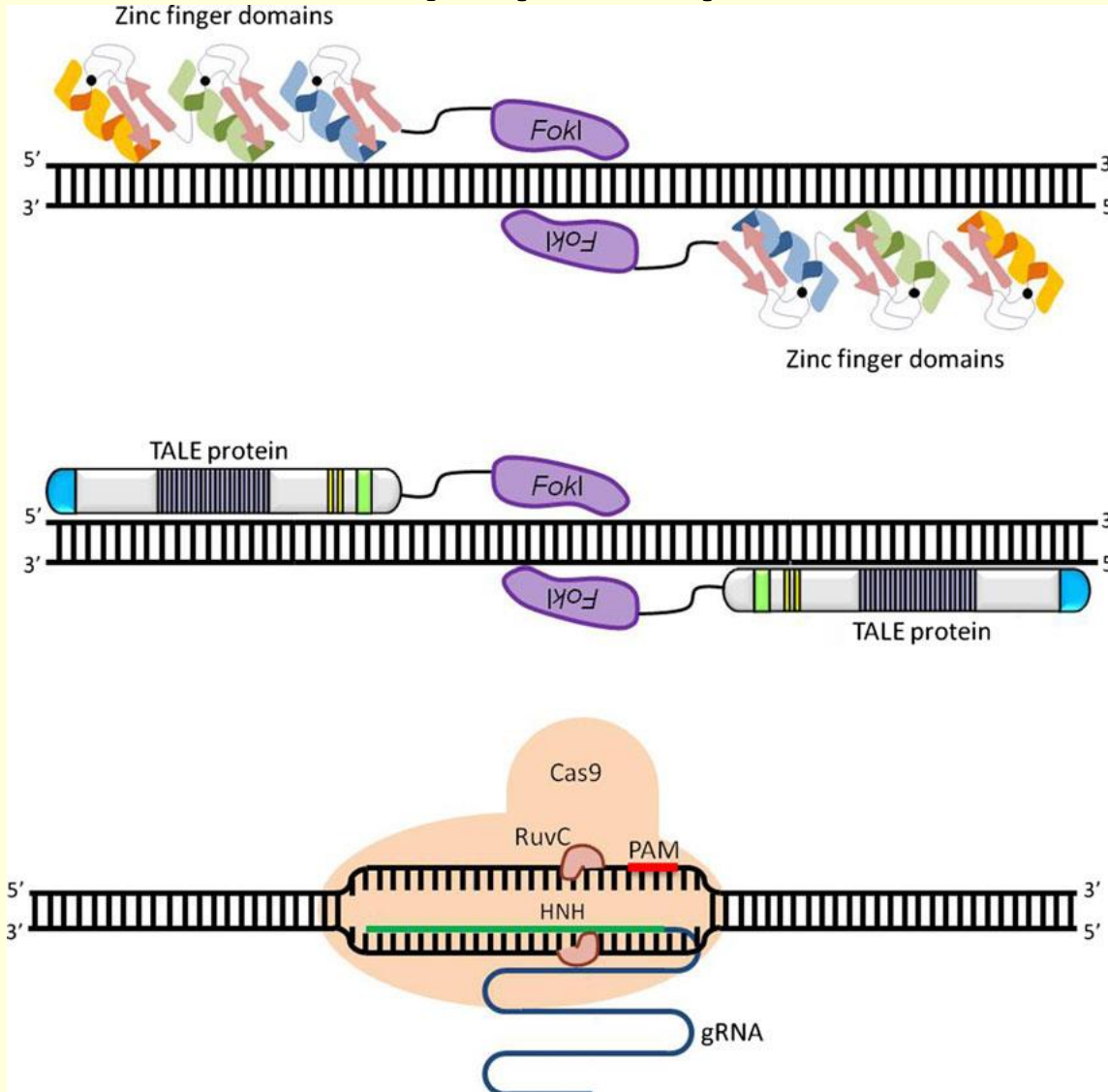


Jiang W. *et al.* **Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice.** *Nucleic Acids Res.* 2013 Nov 1;41(20):e188.

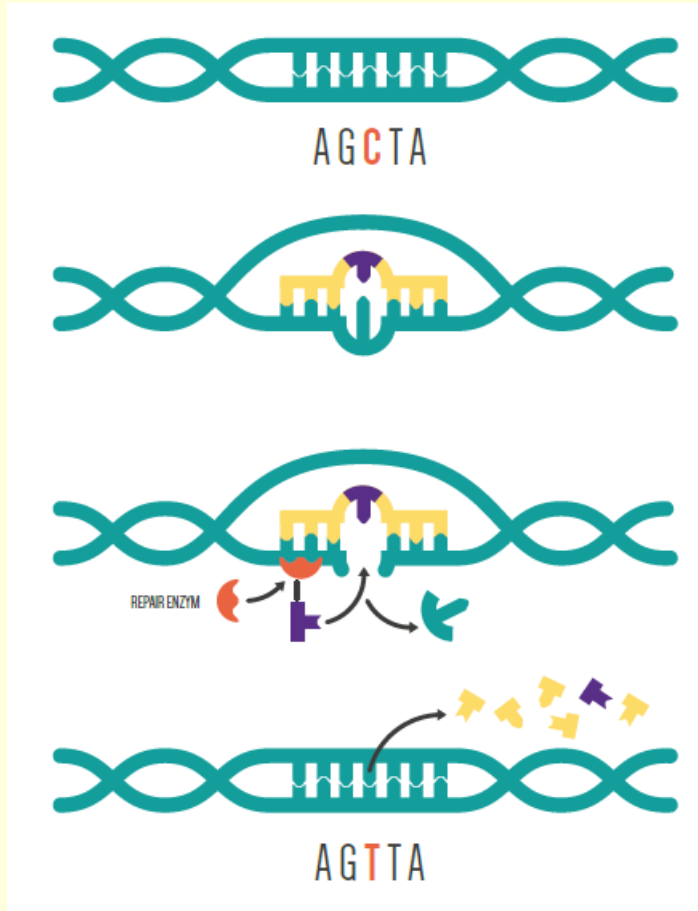
Feng, C et. Al. **Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System,** *Journal of Genetics and Genomics*, 43, 37-43, January 2016



Σύγκριση

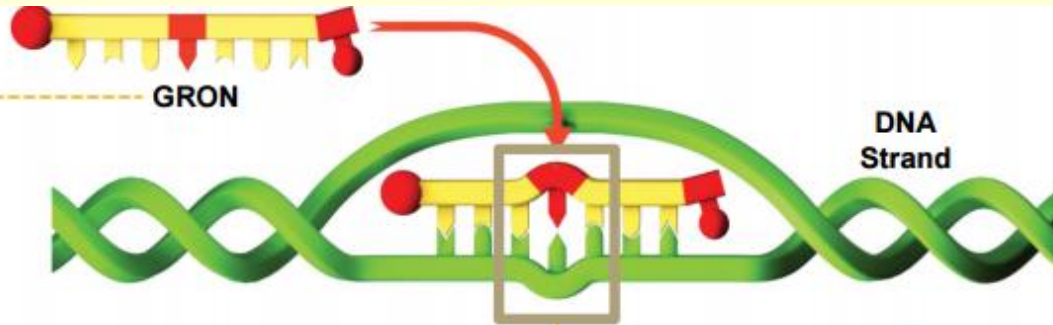


2. Oligonucleotide-directed 1. mutagenesis



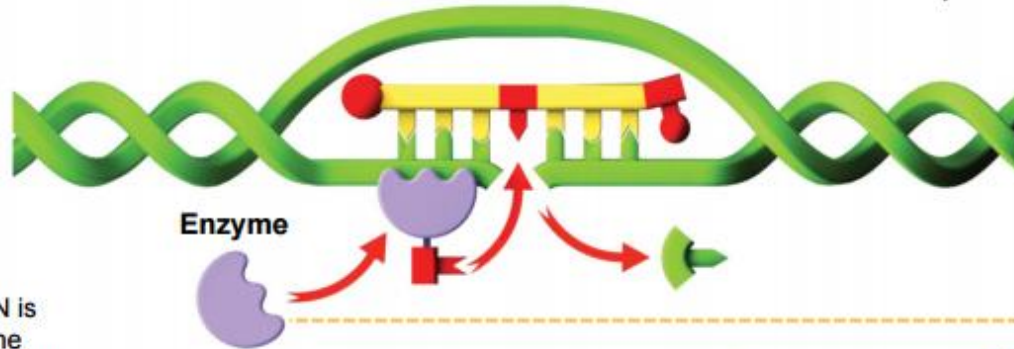
- Τα oligονουκλεοτίδια δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα
- Επάγουν ένα μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA που επιτυγχάνει τις επιθυμητές αλλαγές
- Γίνονται όλο και πιο σημαντικό εργαλείο όσο πιο πολλά γονιδιώματα αλληλουχούνται
- Πιο ακριβής και στοχευμένη μέθοδος από τις κλασσικές επαγωγές μεταλλάξεων

Cibus Rapid Trait Development System - RTDS



1 A Gene Repair Oligonucleotide (GRON) is paired with the plant DNA sequence. The pairing only occurs at the gene target region.

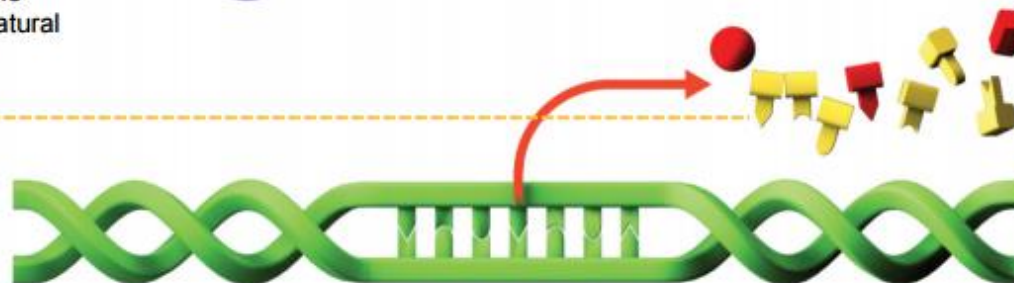
2 The GRON creates a mismatch with the plant DNA sequence.



3 The plant's native DNA repair enzymes recognize the mismatch and repair the plant's DNA using the GRON as a template.

4 Following the repair, the GRON is removed and the cell digests the GRON. This is all part of the natural process of cell division and multiplication.

5 RTDS is complete and the targeted gene has been repaired.

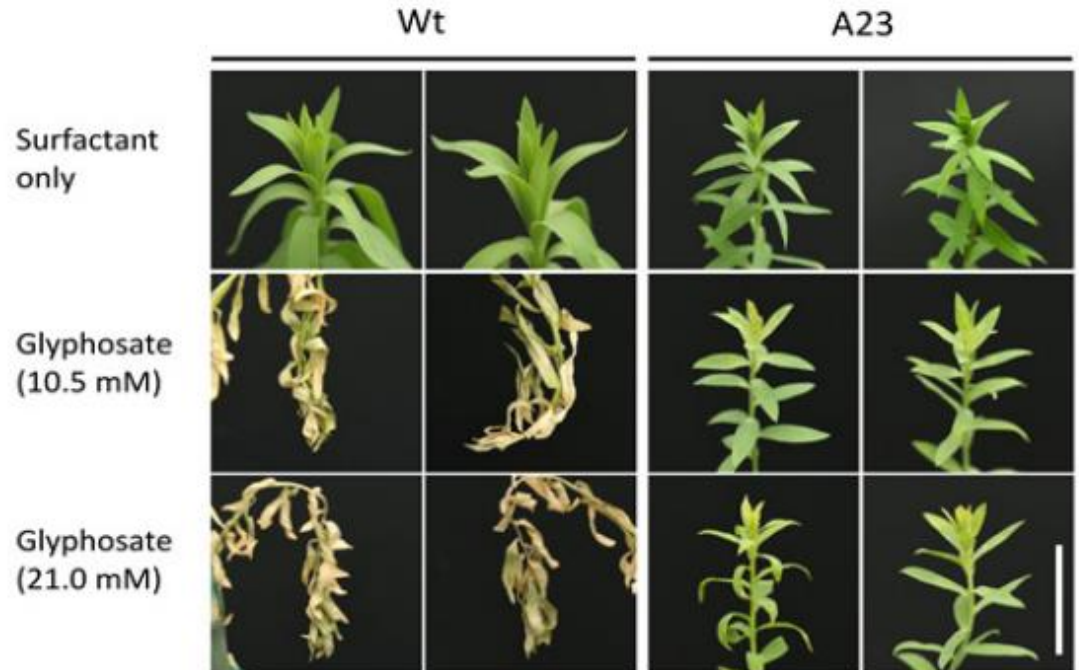
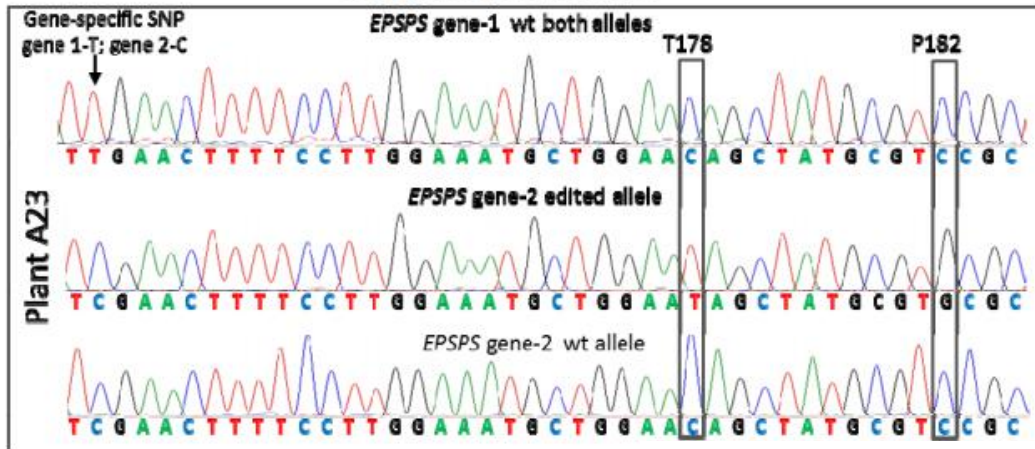




Canola ανθεκτική στο ζιζανιοκτόνο σουλφουλουρία (στοχευμένη αλλαγή στο γονίδιο ALS) είναι στο εμπόριο σαν συμβατική (ΌΧΙ ΓΤ) ποικιλία στις ΗΠΑ από το 2014 (3% της καλλιεργούμενης έκταση με canola). Εν' αναμονή στην ΕΕ.

Λινάρι ανθεκτικό στο glyphosate

Sequence confirmation



Breakthrough Technologies

Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants^[OPEN]

Noel J. Sauer, Javier Narváez-Vásquez, Jerry Mozoruk, Ryan B. Miller, Zachary J. Warburg, Melody J. Woodward, Yohannes A. Mihiret, Tracey A. Lincoln, Rosa E. Segami, Steven L. Sanders, Keith A. Walker, Peter R. Beetham, Christian R. Schöpke, and Greg F.W. Gocal*

Cibus, San Diego, California 92121

Plant Physiology, April 2016, Vol. 170, pp. 1917–1928

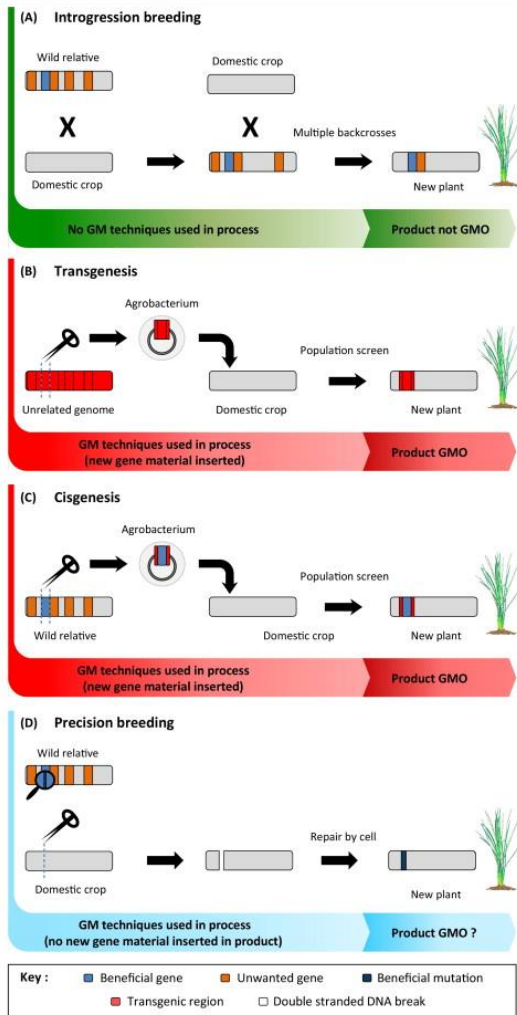
ΥΠΕΡ-ΚΑΤΑ

- Καινοτόμες βελτιώσεις σε ήδη δοκιμασμένες τεχνικές
- Μεγάλες δυνατότητες δημιουργίας γενετικής παραλλακτικότητας
- Τα προϊόντα σε πολλές περιπτώσεις δεν διακρίνονται από αυτά της κλασικής βελτίωσης
- Αυξάνουν την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια στη βελτίωση
- Μεγαλύτερη γνώση και κατανόηση των ιδιοτήτων του παραγόμενου τελικού προϊόντος
- Προσαρμογή σε ευρύ φάσμα καλλιεργειών (συμπεριλαμβανομένων των δενρωδών, των λαχανικών κ.λ.π.) και όλων των εμπλεκόμενων φορέων (δημόσιοι, ιδιωτικοί, μικροί, μεγάλοι)

ΑΛΛΑ

- Ακόμα η αποδοτικότητα των μεθόδων είναι χαμηλή- απαιτούνται περισσότερες έρευνες και βελτιώσεις
- Αναγνώριση και τροποποίηση θέσεων μη-στόχων
- Οι διαθέσιμες μέθοδοι αναγέννησης και γενετικής τροποποίησης δεν καλύπτουν όλα τα είδη
- Κόστος εγγραφής ποικιλιών: μικρό αν δεν καταταχθούν στα ΓΤ, αλλά πολύ μεγάλο αν θεωρηθούν ΓΤ

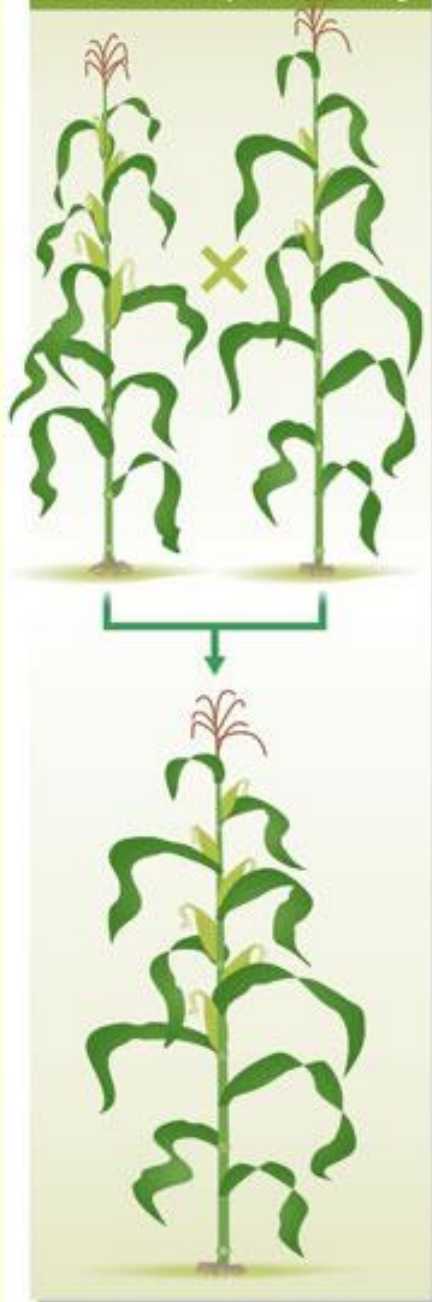
Επιπτώσεις και νέα ζητήματα για συζήτηση



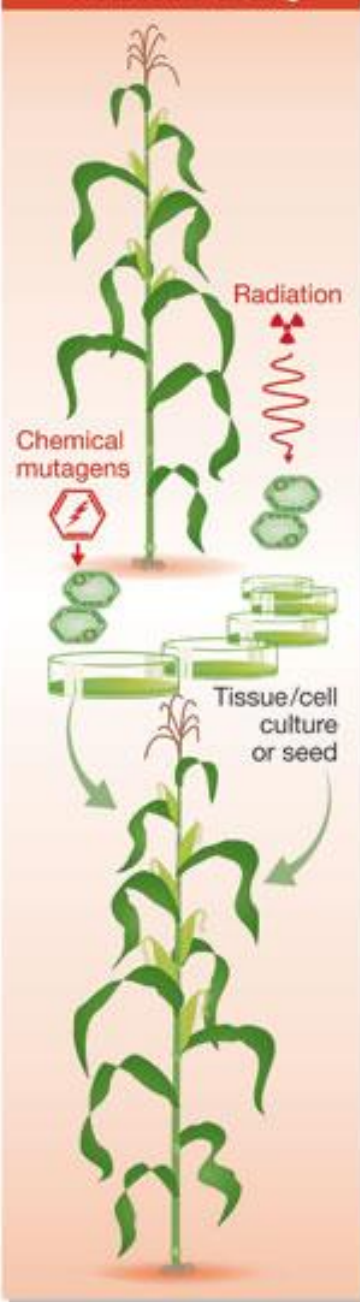
TRENDS in Plant Science

- Ένας σαφής βιολογικός διαχωρισμός μεταξύ κλασικής βελτίωσης και ΓΤ είναι δυσδιάκριτος
- Δημιουργείται μια διαβάθμιση μεταξύ κλασικής βελτίωσης και ΓΤ
- Είναι θέμα ερμηνείας κατά πόσον οι νέες τεχνικές εμπίπτουν στη νομοθεσία περὶ ΓΤΟ
- Ο ορισμός του ΓΤΟ διαφέρει μεταξύ κρατών
- Η εφαρμογή της νομοθεσίας είναι δύσκολη όταν η ποικιλία που προκύπτει δεν διακρίνεται από αυτή της κλασικής βελτίωσης

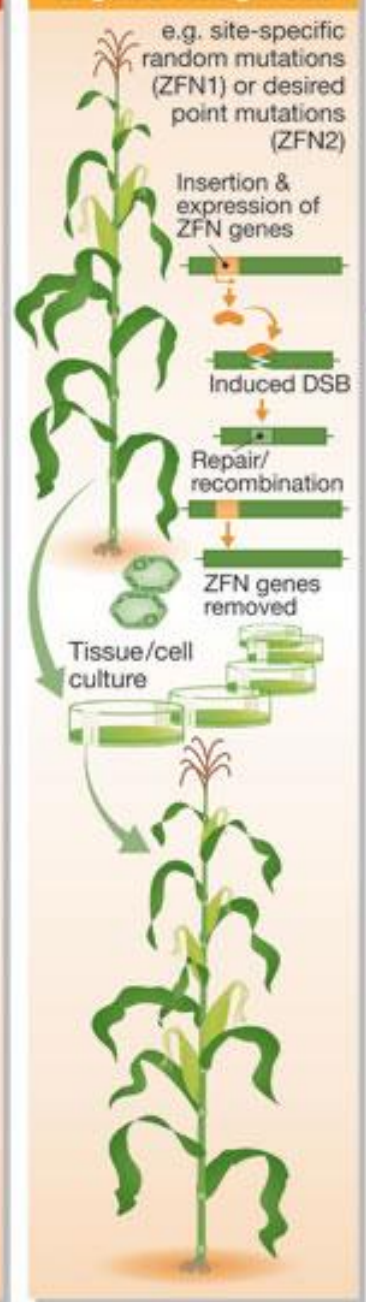
Conventional plant breeding



Mutation breeding



Targeted mutagenesis



Transgenesis



Cisgenesis





ΠΡΟΣΟΧΗ: Έρχονται τα νέα μεταλλαγμένα!



Αφού είπαμε ξεκάθαρα "Όχι" στα μεταλλαγμένα στην Ευρώπη, οι εταιρείες αγροχημικών όπως η Monsanto "μαγειρεύουν" έναν άλλο τρόπο να τα φέρουν πάλι στο πιάτο μας: τα νέα μεταλλαγμένα. Προσπαθούν να παρακάμψουν τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης με το επιχείρημα ότι οι νέοι αυτοί οργανισμοί, που παράγονται με μία ποικιλία νέων τεχνικών, στην πραγματικότητα δεν είναι μεταλλαγμένοι. Αν οι εταιρείες τα καταφέρουν, θα καταλήξουν σύντομα στα χωράφια και στα πιάτα μας, χωρίς κανέναν έλεγχο ασφαλείας ή σήμανση. Χωρίς να έχουμε πια κανέναν τρόπο να τα σταματήσουμε. Στην πραγματικότητα, ούτε που θα το ξέρουμε!

Νέα μεταλλαγμένα; Ευχαριστώ, δεν θα πάρω!

Απαιτήσε από τον Έλληνα υπουργό κύριο Αποστόλου και τους υπόλοιπους Ευρωπαίους υπουργούς, την πλήρη εφαρμογή ισχυρών νόμων που προστατεύουν την υγεία και το περιβάλλον από τα μεταλλαγμένα και δεν παρακάμπτουν τη νομοθεσία για χάρη του κέρδους που υπόσχονται οι μεγάλες πολυεθνικές.

Στόχος: 50.000 | Μέχρι τώρα έχουν υπογράψει:

25,471

Email (*)
Όνομα (*)
Επίθετο (*)
Τηλέφωνο

