



Nové metody, editace genomu

Nové metody šlechtění

„NEW PLANT-BREEDING TECHNIQUES“

odstraňují nevýhodu všech způsobů vzniku transgeneze, tj. cílí na přesné místo na molekule DNA, kde buď vyvolá mutaci, nebo umožní vložení genu

- **cisgeneze** = vkládání genu jako při transgenezi, ale jde o gen vlastního druhu, nebo druhu, se kterým se odrůda kříží
- **Introgeneze** = gen vlastního druhu, jen nové kombinace díky in vitro manipulaci funkčních genetických jednotek
- **ODM** - oligonukleotidem řízená mutageneze
- **Agro-infiltrace**
- **Reverse-breeding**
- **gene editing**, tj. editace, **úprava genů** (Zinc-finger, TALEN, CRISPR)

Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development.

Holme IB¹, Wendt T, Holm PB.

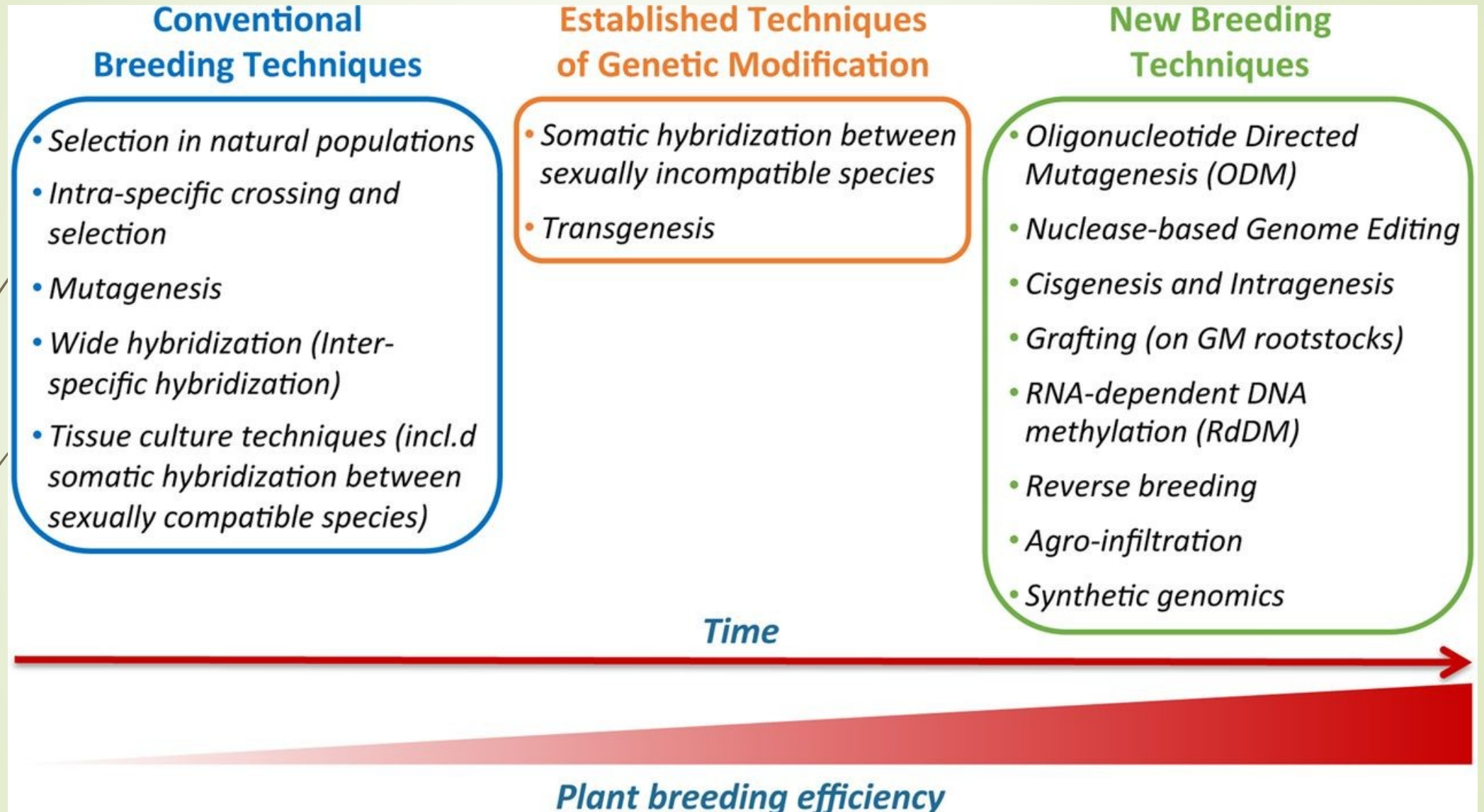
⊕ Author information

Abstract

One of the major concerns of the general public about transgenic crops relates to the mixing of genetic materials between species that cannot hybridize by natural means. To meet this concern, the two transformation concepts cisgenesis and intragenesis were developed as alternatives to transgenesis. Both concepts imply that plants must only be transformed with genetic material derived from the species itself or from closely related species capable of sexual hybridization. Furthermore, foreign sequences such as selection genes and vector-backbone sequences should be absent. Intragenesis differs from cisgenesis by allowing use of new gene combinations created by in vitro rearrangements of functional genetic elements. Several surveys show higher public acceptance of intragenic/cisgenic crops compared to transgenic crops. Thus, although the intragenic and cisgenic concepts were introduced internationally only 9 and 7 years ago, several different traits in a variety of crops have currently been modified according to these concepts. Five of these crops are now in field trials and two have pending applications for deregulation. Currently, intragenic/cisgenic plants are regulated as transgenic plants worldwide. However, as the gene pool exploited by intragenesis and cisgenesis are identical to the gene pool available for conventional breeding, less comprehensive regulatory measures are expected. The regulation of intragenic/cisgenic crops is presently under evaluation in the EU and in the US regulators are considering if a subgroup of these crops should be exempted from regulation. It is accordingly possible that the intragenic/cisgenic route will be of major significance for future plant breeding.


PMID: 23421562 DOI: [10.1111/pbi.12055](https://doi.org/10.1111/pbi.12055)

[Indexed for MEDLINE] [Free full text](#)





Příklady cisgeneze

- **brambor Amflora**, u nás již pěstovaný, byl připraven vložením jednoho vlastního genu v opačné sekvenci. Tím se vyřadil gen pro syntézu amylosy, takže škrob se skládá pouze z amylopektinu
 - **brambor necitlivý na hnilobu** byl vyšlechtěn díky genu přenesenému z jeho peruánského divokého příbuzného
- 

Amflora – GM brambor

- běžné brambory produkují směs škrobů amylopektinu a amyulózy
- Amflora produkuje čistý amylopektin
- použití v potravinách se nepředpokládá
- u technických aplikací – v papírenském, textilním průmyslu a u lepidel - je čistý amylopektin výhodnější, ale oddělovat tyto dvě složky škrobu je nevhodné
- vysoce kvalitní škrob Amflory optimalizuje průmyslové procesy:
 - papíru dává vyšší lesk
 - prodlužuje dobu, v průběhu které mohou být lepidla zpracována
- snižuje se tím spotřeba energie, přísad a surovin (voda)

Amflora – GM brambor



- Ludwigshafen, Německo - 2. březen 2010 – Evropská komise povolila Amfloru, geneticky modifikovanou bramboru firmy BASF s optimalizovaným obsahem škrobu, pro komerční použití v Evropě
- žádost o schválení Amflory byla ve Švédsku podána již v roce 1996.
- Odrůda této brambory tak mohla být používána pro výrobu průmyslového škrobu.
- Evropská agentura pro bezpečnost potravin (EFSA) při několika příležitostech v průběhu schvalovacího procesu opakovaně **zdůraznila bezpečnost** Amflory pro lidi, zvířata a životní prostředí.

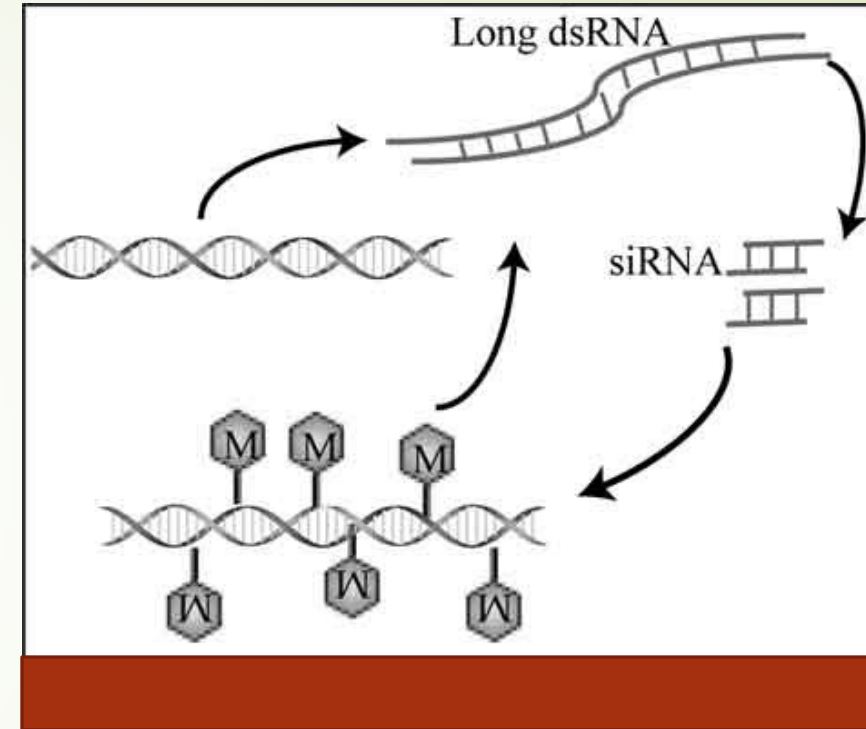
Amflora v ČR

- první sklizeň **26.10. 2010** (150 ha polí)
- 3 zemědělské podniky a zároveň vlastníci škrobárny v Hodíškově v kraji Vysočina
- celkem mělo být vyrobeno cca 1.000 tun škrobu.
- 98% amylopektinu (místo původních 80% amylopektinu: 20% amyulózy)
- pěstování Amflory se nijak neliší od klasických agronomických postupů
- Staženo z evropského trhu 2012
- 2013 EU zrušila schválení Amflory pro pěstování v EU



Cílená metylace promotoru

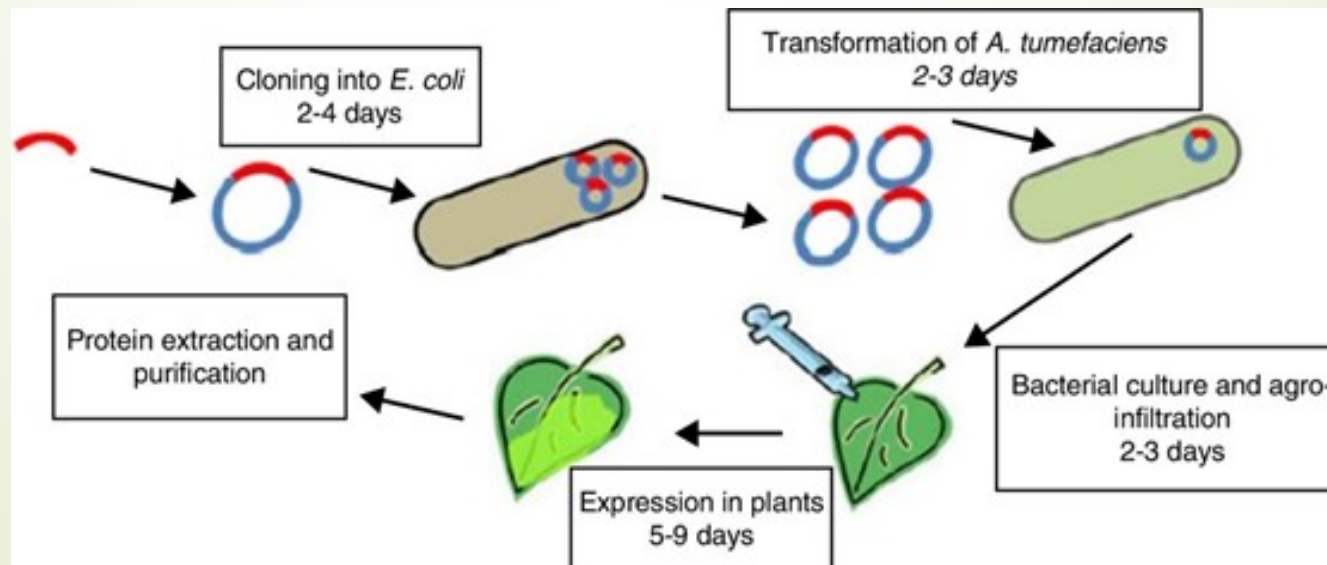
- metoda **RdDM** (na RNA závislá metylace DNA) umožňuje umlčet nežádoucí gen - spočívá ve „vypnutí genu“ navázáním methyl-skupin na promotor příslušného genu, tedy na regulační úsek, který „spouští„ expresi genu (epigenetický proces)
- Cílenou metylaci vyvolá RNA se sekvencí odpovídající promotoru, který má být „uspán“. Aby v buňce vznikla, je do ní vložen syntetický gen s příslušnou sekvencí, který požadovanou RNA kóduje. Přechodným stupněm je tedy transgenní rostlina.
- Metylovaný nefunkční promotor se dědí, kdežto transgen se odstraní.
- Potomstvo má tak „uspaný“ nežádoucí gen, ale **není transgenní**.



siRNA - small interfering RNA

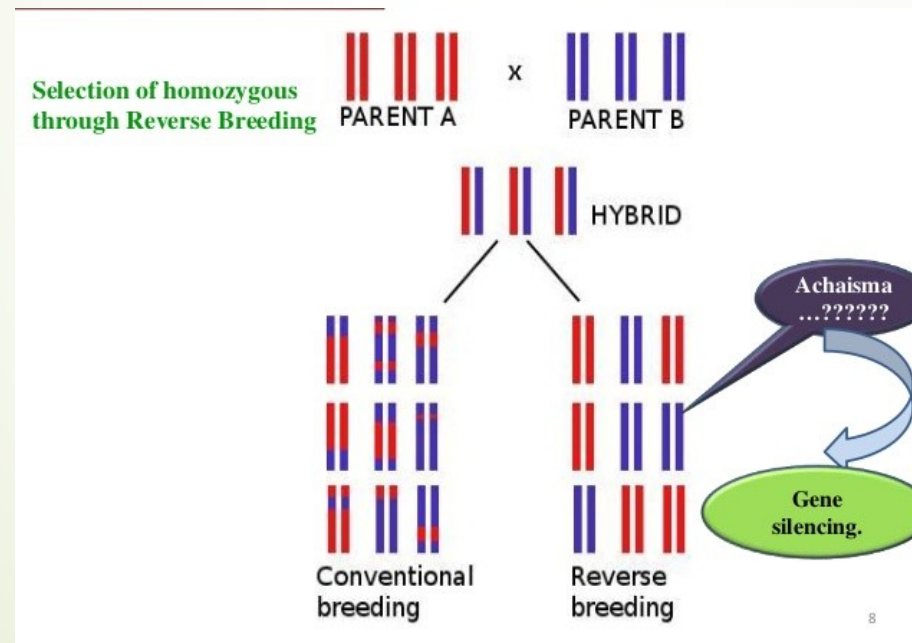
Agro-infiltrace

- ▶ přímá aplikace suspenze Agrobacteria do rostlinných pletiv (např. listů) pomocí injekční stříkačky nebo pomocí vakua (do listu nebo celé rostliny)
- ▶ Suspenze Agrobacteria proniká přes stomata do mezibuněčných prostor
- ▶ Aplikace: tvorba protilátek, vakcíny, produkce proteinů,... vhodná metoda pro průmyslové využití



Reverse-breeding

- zahrnuje dva nezbytné kroky: **suprese crossoverové rekombinace** v selektované rostlině následovaná **regenerací dvojitých haploidů** ze spór, které obsahují nerekombinantní chromosomy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784905/>)





Metoda roubování (grafting)

- vhodná všude tam, kde transgenem vnesené vlastnosti jsou výhodné pro kořeny - např. necitlivost na choroby nebo kořenové škůdce a roubování se vyplatí (u révy, broskví, jabloní apod.)
- vyloučí se tím **šíření transgenu pylem a semeny**, neboť semena a plody nejsou transgenní („geneticky modifikované,“)
- takto byl připraven např. **eukalypt** rostoucí v půdě s vysokým obsahem solí. Podnož byla transgenní **halotolerantní** a na ní naroubován běžný eukalypt.

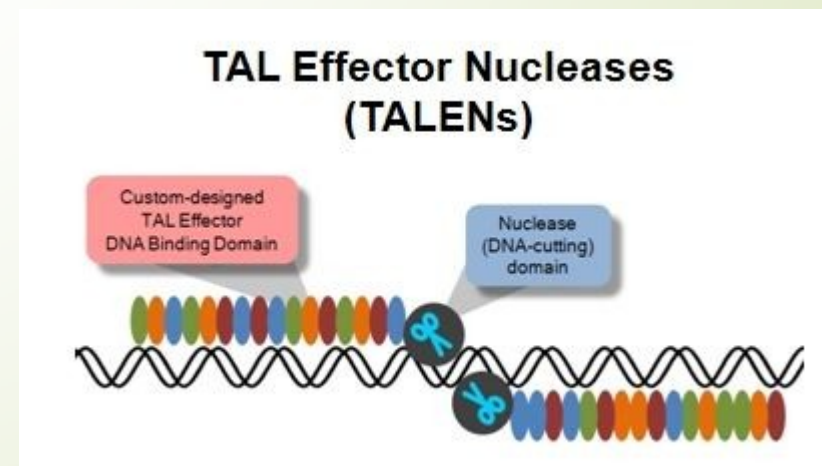
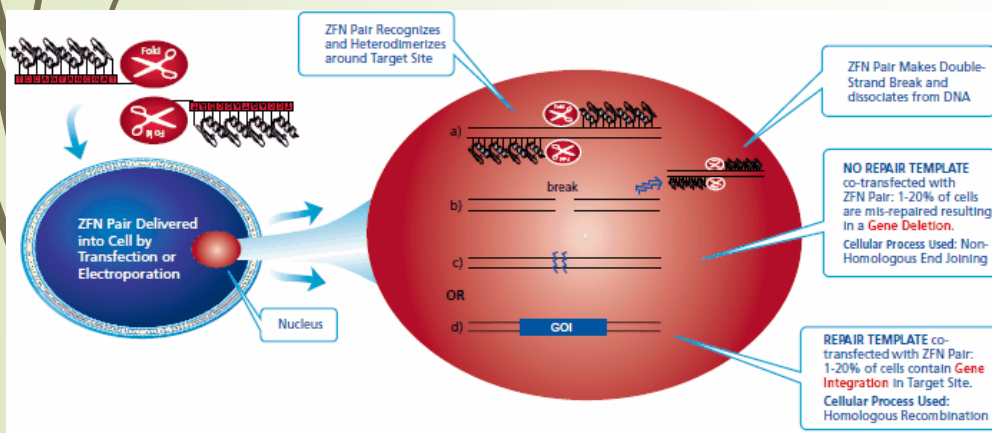


Úprava genů – ODM (oligonucleotide directed mutagenesis)

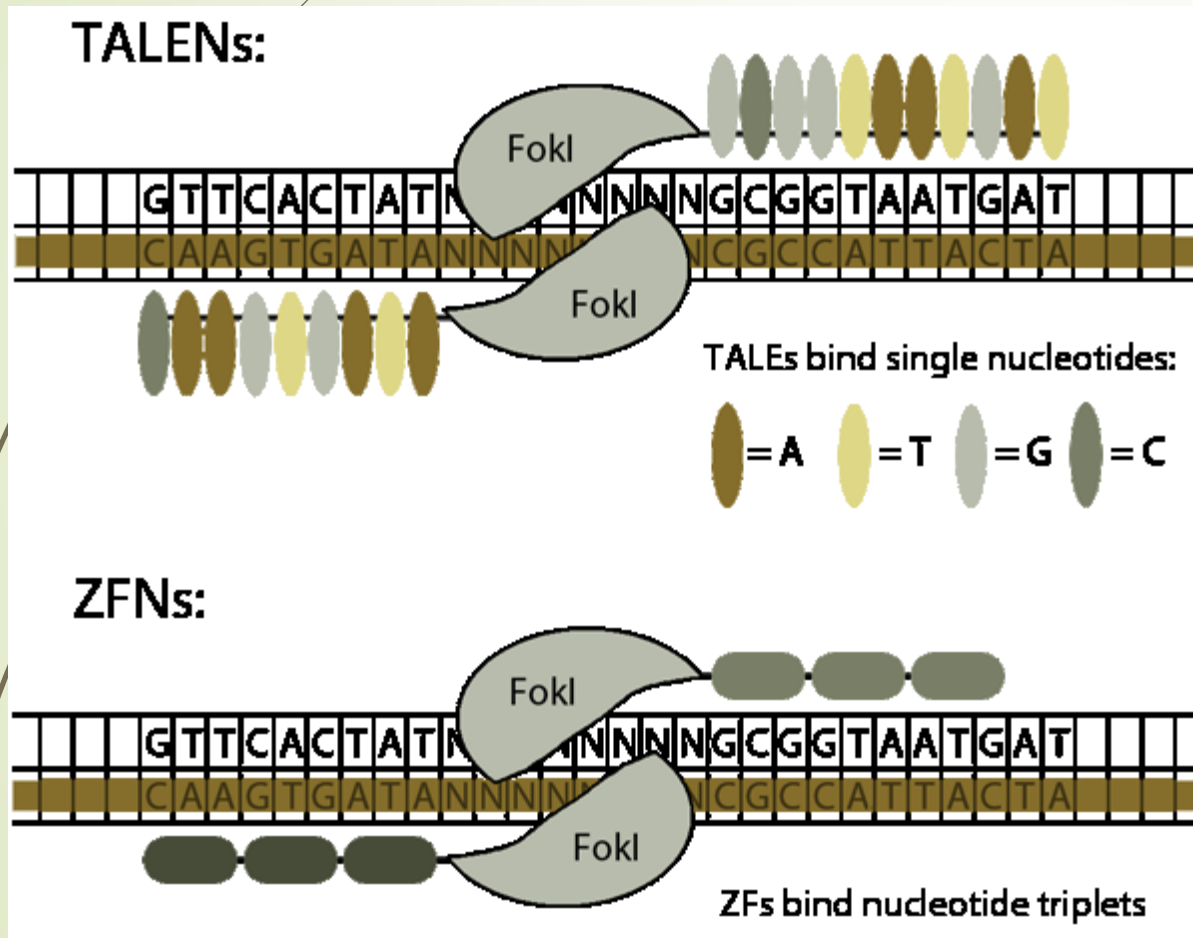
- nedochází k vnesení cizorodých genů, ale pouze ke **změně několika nukleotidů** v rostlinné DNA
- 2015 - firma Cibus (USA) - herbicidně tolerantní řepka v USA a Kanadě (změna jediné báze, vyskytuje se u divokých příbuzných)
 - riziko: možnost potenciální nechtěné změny v genech
- nejasná legislativa v EU (také ostatní nové metody)

Zinc finger nucleases (ZFN) a Transcription activator-like effector nucleases (TALEN)

- Restrikční enzymy, které dokáží rozřezat specifické úseky DNA
- Indukují DSB – double-strand breaks
- přirozená oprava DSB v buňkách pomocí
 - **NHEJ** (Non-homologous end joining) – spojení volných konců, ikdyž se sekvence málo nebo vůbec nepřekrývají, porušení genu
 - **HDR** (Homology Directed Repair) – vložení nebo změna specificky
- **Deaktivace** genu nebo **vložení nového** genu



TALEN vs. ZFN



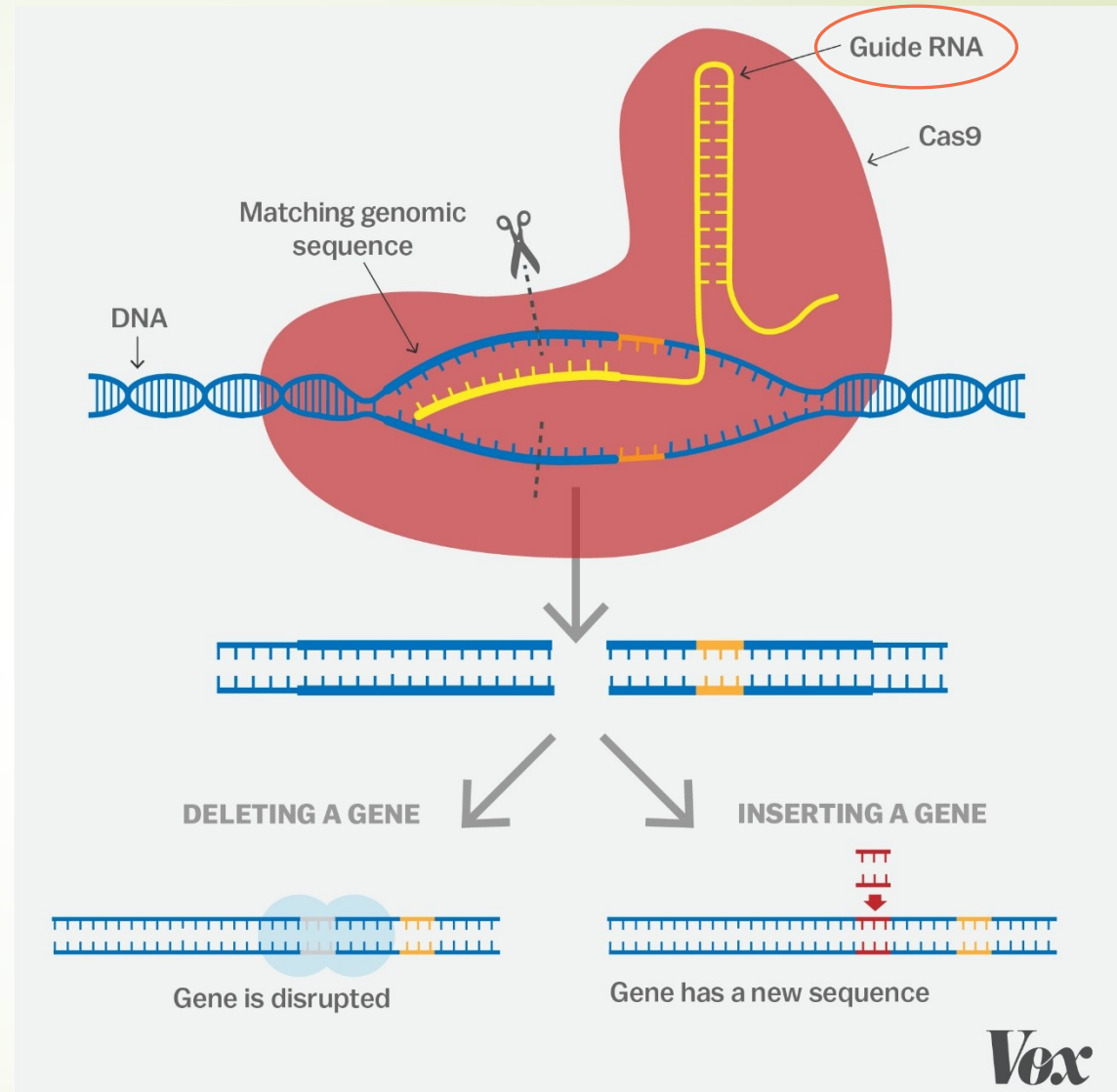
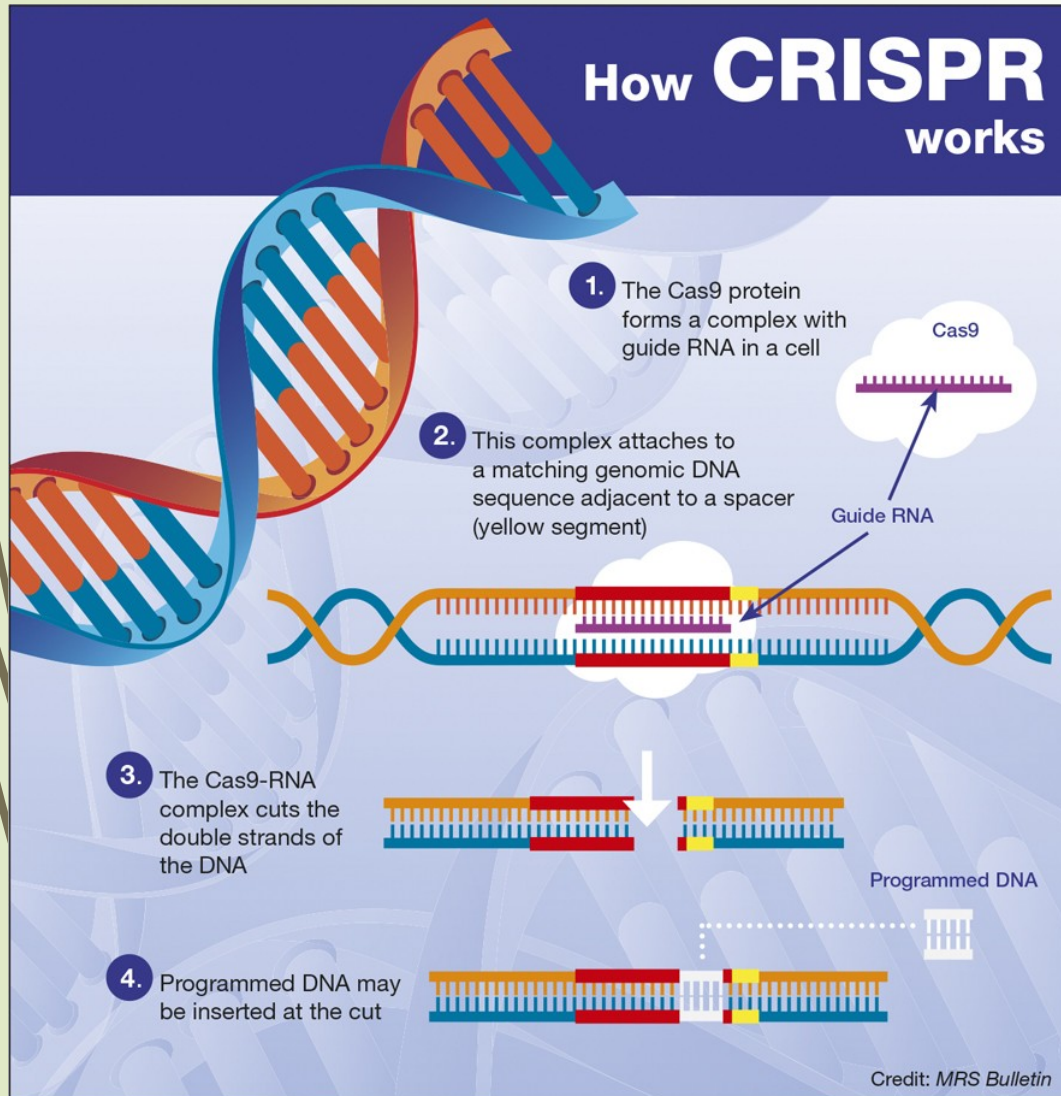
- „cílení“ (targeting) je založeno na modulárních, proteinově založených rozeznávacích doménách
- Jeden proteinový monomer se váže na jeden nukleotid = vysoká specificita (TALEN)



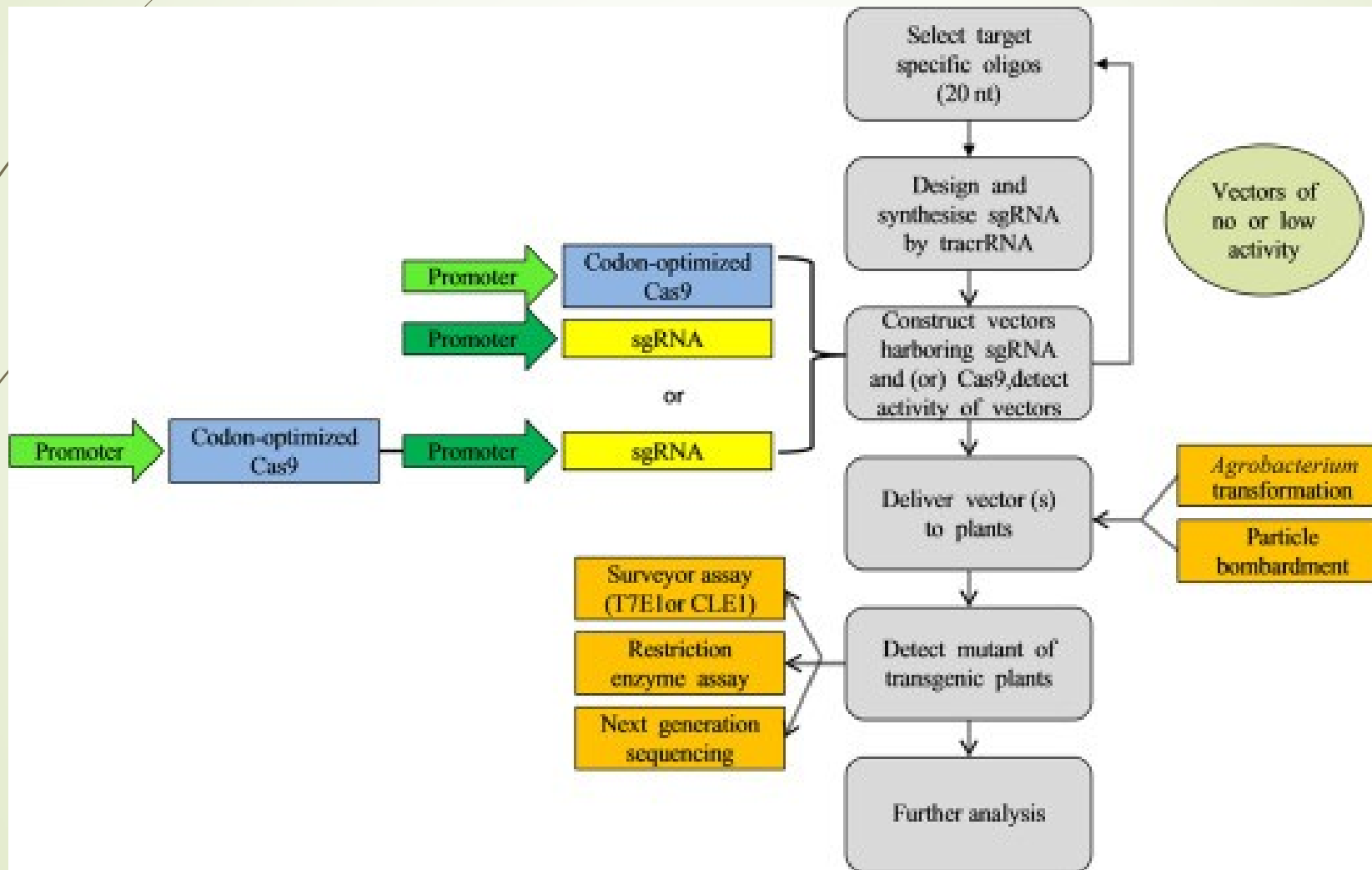
CRISPR/Cas9

- ▶ segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic
(**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats)
- ▶ jsou to úseky prokaryotické DNA obsahující krátké repetice nukleotidů. Každá z repetic je následována krátkými segmenty tzv. spacer DNA, získanými při předchozích setkáních s příslušnými bakteriálními viry nebo plazmidy.
- ▶ prokaryotický imunitní systém, zajišťující rezistenci vůči cizím genetickým elementům, jako jsou plazmidy nebo fágy
- ▶ Cas9 je nukleáza, enzym, specializovaný pro stříhání DNA
- ▶ gRNA je naváděcí RNA se sekvencí nukleotidů odpovídající sekvenci na DNA, kterou chceme upravit

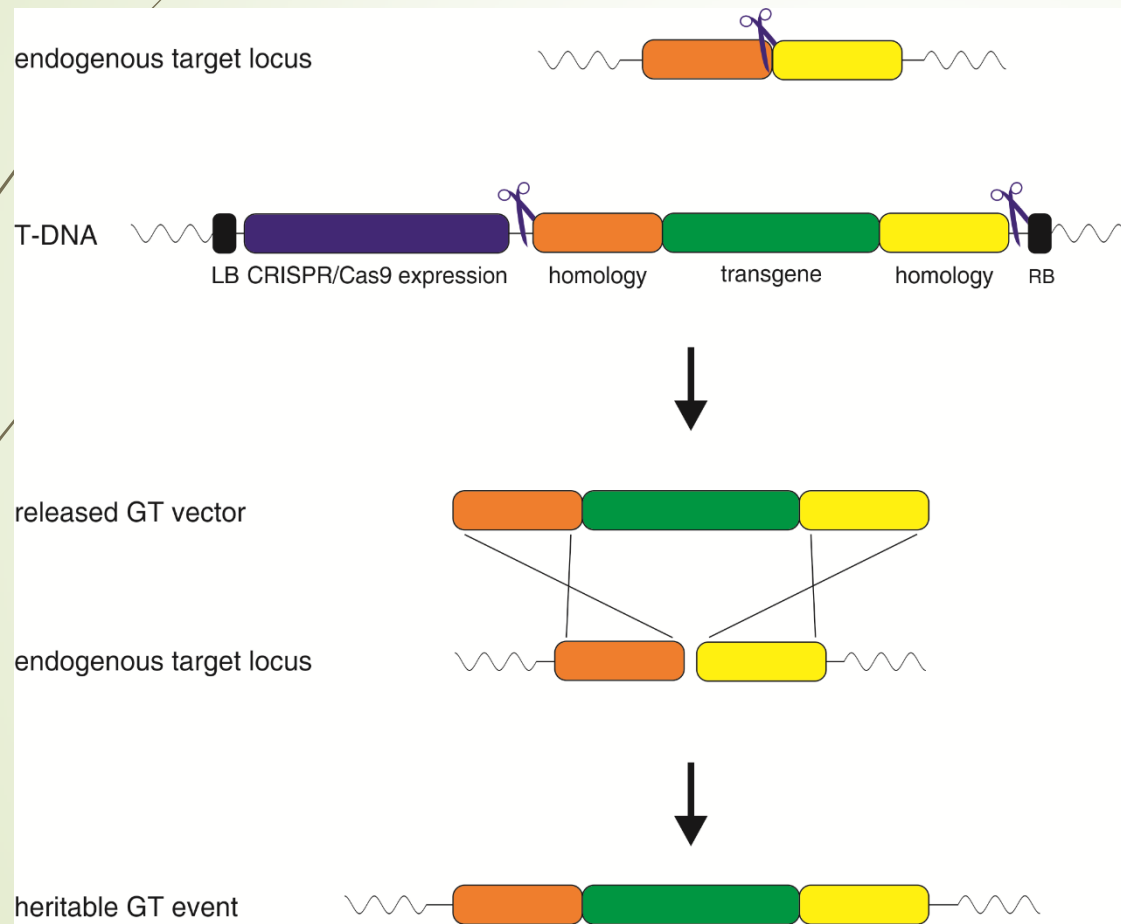
CRISPR/Cas9



Základní postup pro editování genu pomocí CRISPR/Cas9 v rostlinách



In planta gene targeting



Principle of the in planta gene targeting system. Upon expression of the stably transformed CRISPR/Cas nuclease, three DSBs are introduced: one is formed in the desired target locus, activating it for homologous recombination (HR). The other two the so-called GT vector, which is located on the same T-DNA as the nuclease. The transgene on the GT vector then integrates into the activated target locus by HR, using the flanking homologies. The result is a site-specific and heritable integration of the transgene.



Waxy Corn – kukuřice vosková

- ▶ Přírodně se vyskytující mutace, gen recesivní, proto není v populaci častý
- ▶ První plodina s upraveným genomem pomocí CRISPR-cas9 (společnost DuPont Pioneer, USA)
- ▶ Inaktivace genu vedoucí k vysokému obsahu amylopektinu (normální kukuřice obsahuje 75% amylopektinu a 25% amylosy, delece v genu vede k obsahu 97% amylopektinu).
- ▶ Mohla by se využívat jako jídlo i pro nepotravinářské účely (lepidla)
- ▶ V dubnu 2016 v USA povoleno, protože neobsahuje cizí geny.



Novinky v oblasti NBT, www.biotrin.cz

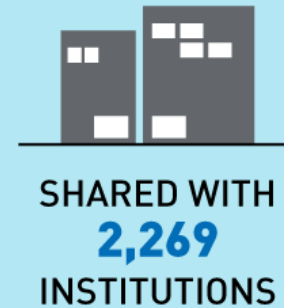
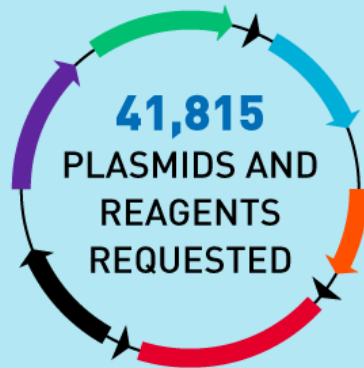
- <http://www.biotrin.cz/novinky-v-oblasti-nbt-i/> - článek 13.2.2018



Off-site effects

- ▶ Mutace uvedené do nespecifických míst s podobnou (ale ne identickou) homologií k cílovým místům
- ▶ Je obtížné je identifikovat a vyžadují sekvenaci genomu a hledání změn v místech, která se podobají sekvencí cílové gRNA

ZHANG LAB AND ADDGENE: FOUR YEARS OF SHARING CRISPR FOR RESEARCH WORLDWIDE



February 2013 – September 2017 | Source: Addgene



<https://www.broadinstitute.org/research-highlights-crispr>



CRISPR - dostupnost

- ▶ Sigma-Aldrich: CRISPR Plants:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/crisprpl?lang=en®ion=CZ>
(soubor crisprproductinfo sigma.pdf)
- ▶ www.addgene.org (nezisková organizace pro sdílení plasmidů):
<https://www.addgene.org/crispr/plant/>

