

Gén technológia a mezőgazdaságban

Mészáros Klára

Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont

Milyen elvárásoknak kell megfelelni az új fajtáknak?

➤ Környezeti adaptáció:

Abiotikus stressz rezisztencia

Biotikus stressz rezisztencia

➤ Termőképesség

➤ Beltartalmi elvárások

Mennyiségi tulajdonságok



Hagyományos keresztezéses növénynevelés

➤ **A genetikai variációk felkutatása:**

Nemzetközi együttműködés, alapanyag csere: egzotikus források

Saját törzsek és fajták

Génbank: tájfajták, régi fajták. Vad és természetesen rokon fajok

➤ **Szülők kiválasztása:**

Fajta előállítás: Adaptábilis törzsek kiválasztása

Forrás előállítás: Extrém genotípusok kiválasztása

➤ **Új genetikai variáció létrehozása:** az utódok között a transzgresszív segregáció vizsgálata, új tulajdonságokat hordozó genotípusok szelektálása

Szaporodásbiológia
Genetikai

Növénytermesztés új feladatai

- Növénytermesztés hatékonyságának és a termésbiztonság növelése
 - speciális termesztési rendszerek biztosítása (herbicidek tolerancia)
 - biotikus stressz tolerancia növelése
 - környezeti adaptáció és abiotikus stressz tolerancia javítása. Fagyállóság, hő- és szárazságtűrés javítása
 - Víz (WUE) és nitrogén hasznosítás (NUE) javítása,
- Funkcionális élelmiszer alapanyag előállítására alkalmas növényfajta
- Bioenergetikai célra alkalmas növények nemesítése
- Technológiai rendszerekre adaptált és/vagy nemesített fajták (gyógyszer alapanyag, oltóanyag)
 - sejt fermentorokban
 - szántóföldi növénytermesztésben



Hagyományos nemesítés korlátai

- Keresztezhetőség határai
- Genetikai kapcsoltság hátrányos tulajdonsággal
- Több évtizedig tartó nemesítés
- A termesztett növények és tenyésztett állatok csak azokkal a tulajdonságokkal rendelkeznek melyek génjeikben kódoltak.

Új módszerek keresése: BIOTECHNOLÓGIA

Növényi biotechnológia fő területei

➤ **Molekuláris biológiai technikák:**

Strukturális és funkcionális genom analízis

Genetikai térképek

Genom szekvenálás:

Arabidopsis thaliana 800 millió nukleotid

Kukorica 3,9 milliárd nukleotid

Búza 17,0 milliárd nukleotid

Gén expressziós vizsgálatok



<http://www.illumina.com>

Bead Array
leolvasó
(SNP-re)

Génazonosítás céljai

- Alap kutatás
 - Biológiai folyamatok megértése
- Alkalmazott kutatás

Növénynemesítés támogatása:

Molekuláris ujjlenyomat készítése

Markerszelekció (MAS):

Génpiramidálás

BC a rekurrens szülői tulajdonság szelektálásának felgyorsítása

Fenotípusosan ritkán vizsgálható tulajdonság esetén

QTL-analízis

Pedigree analízis

Gén azonosítás főbb módszerei

➤ Marker kapcsoltsági térképek

- Két szülői térképező populációk
- Széles genetikai bázist képviselő fajtakör

➤ Jelölt gén megközelítése

- Genom pozíció függő stratégiák: **pozicionális klónozás, deléciós vonalak**
- Összehasonlító genomikai stratégiák: modell növények
- Mesterséges genetikai variáció (indukált mutációs populációk)
- Szekvencia összehasonlítások

➤ Gén expressziós mintázatok elemzése:

- cDNS-könyvtár készítés
- DNS microarray Differential Display
- Transzkriptom szekvenálás



Genomok és genemböngészők + szekvenciaelemzés

Szekvenciaelemzés

- Genomok, kromoszómák és böngészők
- Primertervezés

A gén értelme – gén ontológiai (GO)

Funkcionális annotáció: *in silico* predikció (homológia alapján), génexpresszió (korreláció alapján), fehérje-fehérje interakció („guilty by association”) – közvetett módszerek

➤ Fehérje vagy nukleinsav:

Reprodukálható

Kereshető

➤ Három főszótár: (GO domain)

Biológiai folyamatok

Molekuláris funkciók

Sejtszerkezet

Növényi biotechnológia fő területei

➤ Molekuláris biológiai technikák:

Strukturális és funkcionális genom analízis

Genetikai térképek

Genom szekvenálás:

Arabidopsis thaliana 800 millió nukleotid

Kukorica 3,9 milliárd nukleotid

Búza 17,0 milliárd nukleotid

Gén expressziós vizsgálatok



<http://www.illumina.com>

**Bead Array
leolvasó
(SNP-re)**

➤ Transzgénikus technikák vagy GÉNTECHNOLÓGIA

Géntechnológia

- Géntechnológia: a sejtmagban vagy a sejtorganellumokban (mitokondrium, plasztiszok) meglévő genetikai program megváltoztatása molekuláris genetikai módszerekkel.
- Genetikai transzformáció: idegen származású DNS bevitele a növényi genomba hagyományos szexuális út kikerülésével, génátviteli módszerek alkalmazásával.
- Transzgénikus vagy genetikailag módosított (GM) élőlény: a genomjába idegen származású gén bejuttatása géntechnológiai módszerrel, amely a genomba integrálódik, működik és öröklődik. Ezáltal a GM élőlény idegen származású fehérjét termelnek.
- Ciszgénikus növény: saját vagy rokon fajból származó gén bejuttatása géntechnológiai módszerrel.

Növények génikai transzformációja

Vektorok: riporter, szelekciós, hasznos, a beépüléshez és működéshez szükséges szekvenciák

Transzformációs technika:

Közvetlen:

A DNS-t közvetlenül juttatjuk be a befogadó szervezet sejtjeibe

Közvetett:

A DNS bejuttatása közvetítő organizmusok segítségével történik

Transzformálható fajták:

Célpont: sejt, protoplaszt, szövet, növény

Hatékony *in vitro* regenerációs rendszer



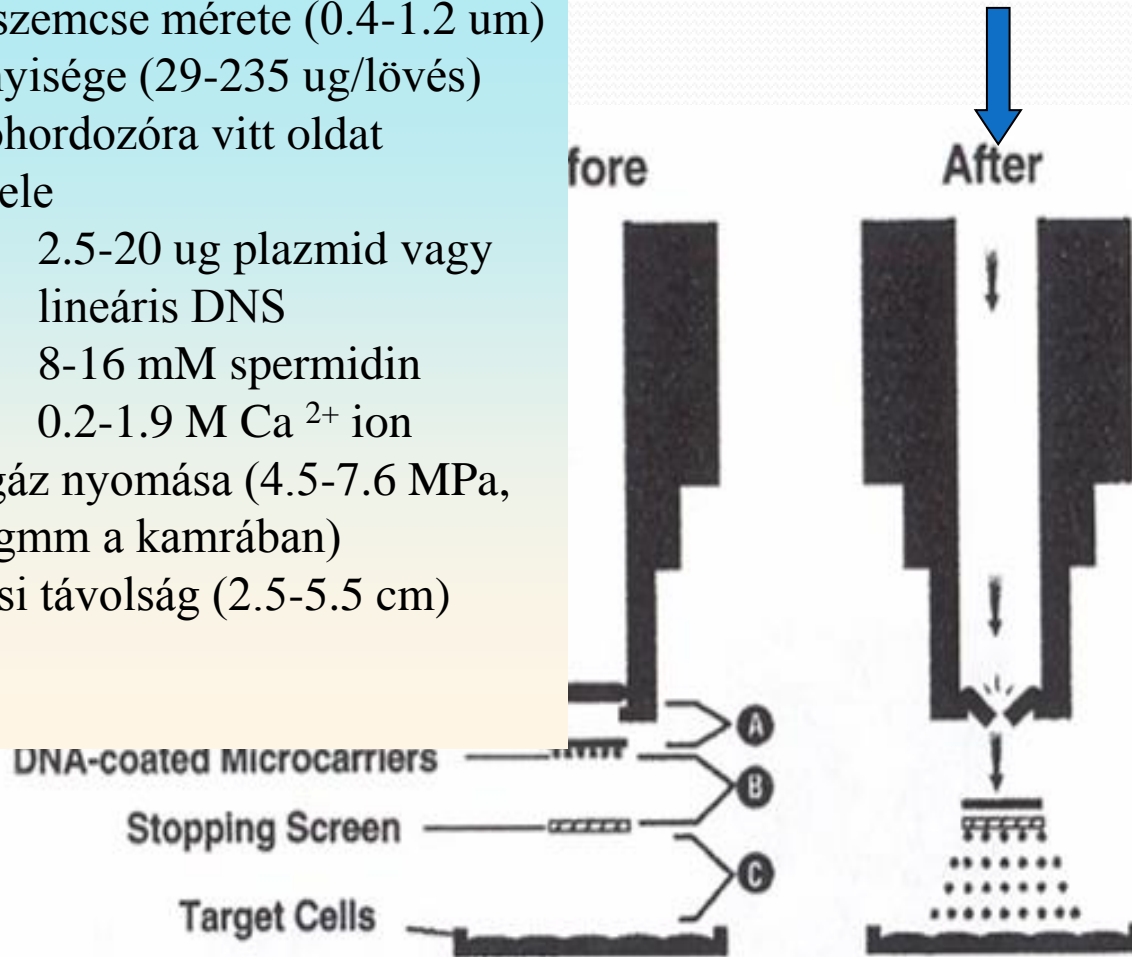
Transzformálás
transzgénikus növény regenerálása

Transzgén beépülésének és működésének kimutatása
Transzgénikus növény felhasználása

Biolisztikus transzformáció, „génágyú”

Nagy nyomású He gáz

- Aranszemcse mérete (0.4-1.2 μm) és mennyisége (29-235 μg /lövés)
- A mirohordozóra vitt oldat összetétele
 - 2.5-20 μg plazmid vagy lineáris DNS
 - 8-16 mM spermidin
 - 0.2-1.9 M Ca^{2+} ion
- a He gáz nyomása (4.5-7.6 MPa, 68-71 Hgmm a kamrában)
- A lövési távolság (2.5-5.5 cm)



Közvetett, *Agrobacterium* – közvetített transzformáció

Agrobacterium tumefaciens és *Agrobacterium rhizogenes*

talajban élő Gram-negatív baktérium, sebzési helyeken gyökérgolyvásodást vagy hajszaál gyökeresedést okoz (crown gall)

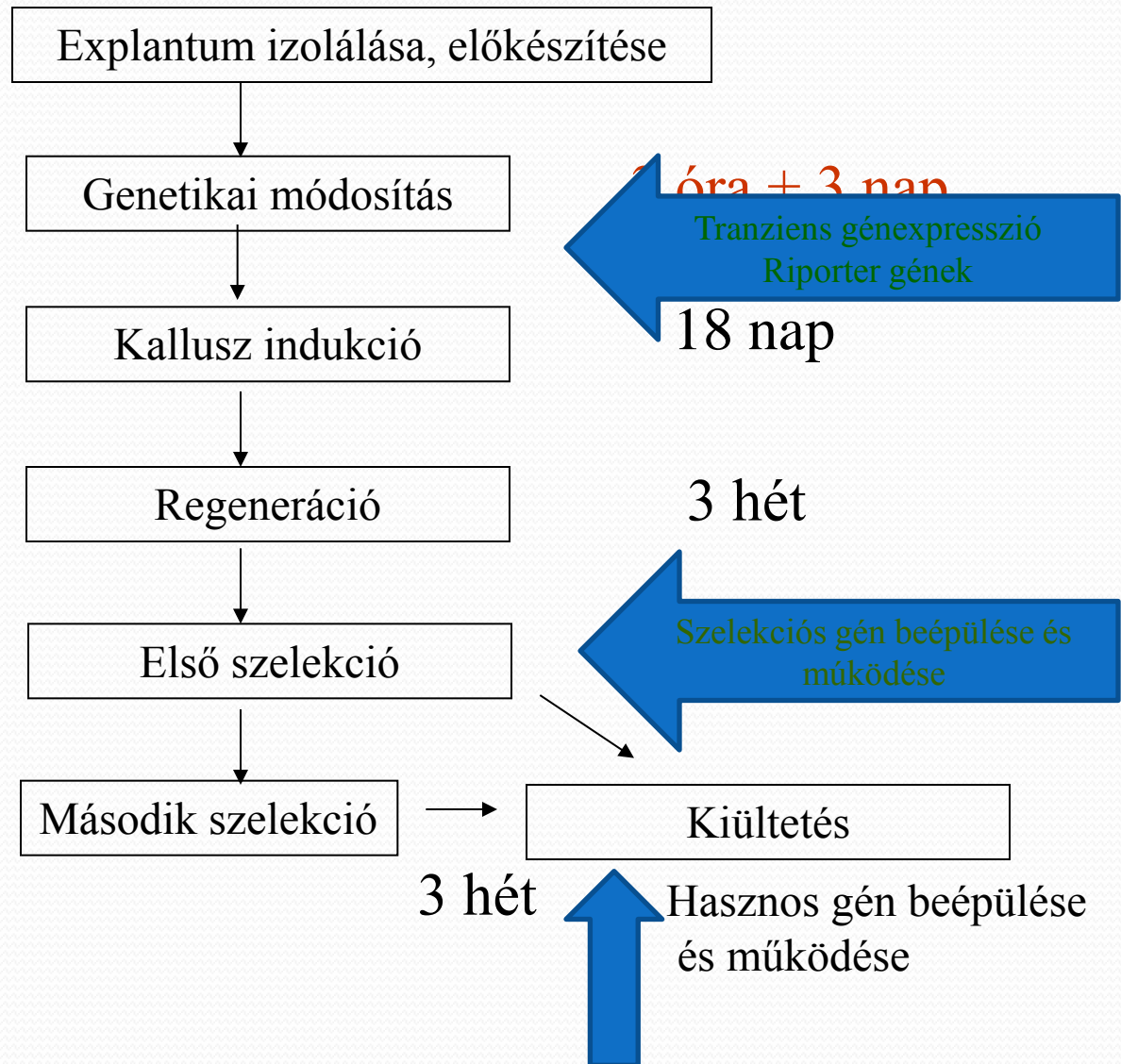
Gazdakörük rendkívül széles



- A növény sérülésekor felszabaduló jel érzékelése mozgás és kapcsolódás sérült növényi sejtekhez
- Kétkomponensű érzékelőrendszer aktivációja a transzfer (T-)DNS kivágásához,
- A baktérium- és növényi sejt közötti átjáró létrehozása
- DNS-fehérjekomplex felépítése és bejuttatása a növényi sejtbe,
- A komplex beszállítása a sejtmagba, és a DNS beépítése a növényi kromoszómába.

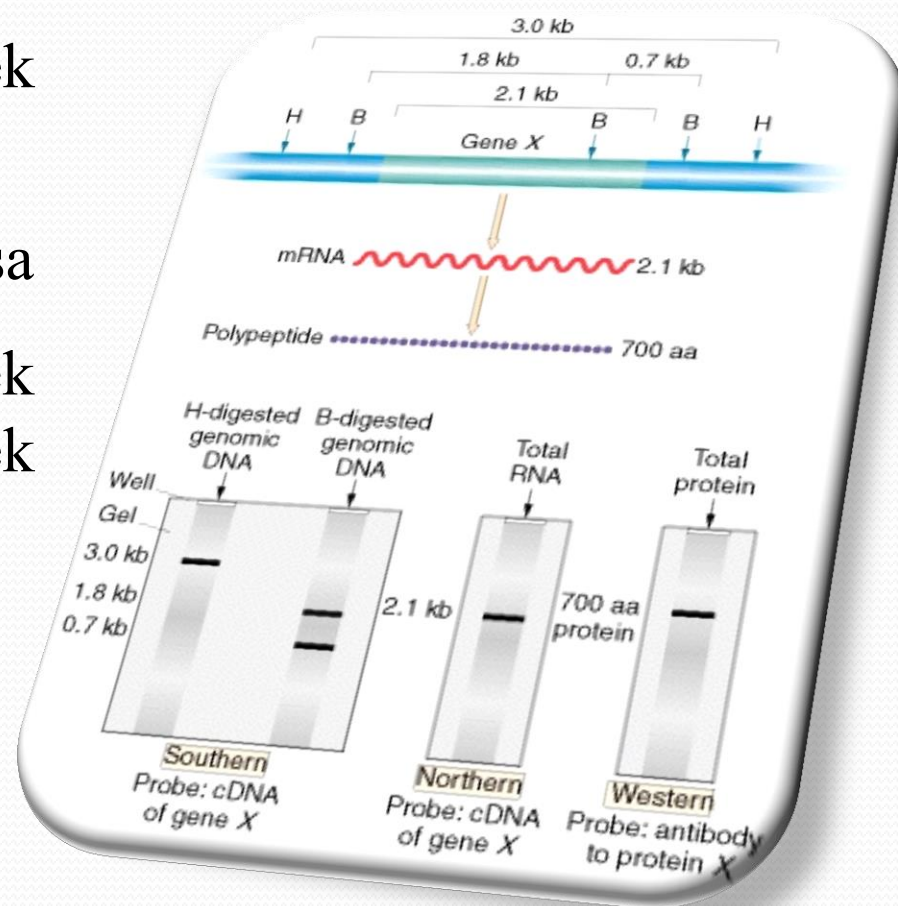
- A bejuttatott DNS mennyisége nagy:
 - Több kópiában történő beépülés
 - Komplex átrendeződést
 - Génexpresszió gátlása
 - A beépülés helye véletlenszerű:
 - hátrányos lehet a gén működésére
 - A belövés során fragmentálódik a DNS: nagy molekulatömegű DNS nem juttatható be
- A sejtbe legfeljebb csak néhány T-DNS molekula jut be:
 - Alacsonyabb kópiaszámban épül a genomba
 - Csökkenti a szerkezeti átrendeződések esélyét
 - Növeli a génexpresszió valószínűségét
 - A transzgén beépülése a transzkripciósan aktív régiókba preferáltan történik
 - Nagy molekulatömegű DNS bevitele lehetővé teszi egy lépésben több gén beépítését

Növény transzformáció főbb lépései



Transzgén kimutatása a transzformáció folyamatában

1. Tranzienst génexpresszió kimutatása
2. Integrálódott gén jelenlétének kimutatása
3. A beépült kópiaszám meghatározása
4. A gén által expresszált termék jelenlétének és mennyiségének detektálása, mérése
5. A génbeépülés helyének meghatározása



Milyen célból viszünk be idegen gént?

- Gének működésének vizsgálata
- Hasznos gének átvitele egyik szervezetből a másikba
- A transzgénikus élőlényekkel kapcsolatos kockázat elemzés

A transzgénikus növények gyakorlati alkalmazása

A növényi vírusok és a terjedő, veszélyes növénykórokozók (emerging infectious diseases)

- **A növényi vírusok obligát paraziták, amelyek a gazda génexpressziós rendszerét használják a replikációjukhoz**
- **A haszonnövények esetén az „Emerging infectious diseases”**

46%vírus, 30%gomba, 16% baktérium

Konklúzió: a haszonnövényeket védeni kell a vírusoktól

Hogyan védhetjük meg a haszonnövényeket a vírusoktól?

- **Vírus vektorok kiirtása (inszekticidek stb.)**
- **Vírusellenálló növények termesztése. Olcsó, környezetbarát alternatíva.**

A vírusellenálló növény legalább egy lépését gátolja a vírus fertőzési ciklusnak,

- vírus vektor fertőzést**
- replikáció a „primary infected” sejtekben**
- sejtről-sejtre mozgást**
- szisztémikus mozgást**

Virológusok: Vírusrezisztens a növény,

- ha a vírus nem képes replikálódni az elsődleges fertőzött sejtekben,**
- vagy ha nem tud sejtről-sejtre, illetve szisztémikusan mozogni**

Silhavy Dániel

Vírusrezisztencia típusok

Természetes rezisztencia

A rezisztencia gének hagyományos úton bevihetőek

Kell rezisztencia forrás és szelekciós rendszer

Genetikai módosításon alapuló rezisztencia

A rezisztencia gének transzformációval építhetőek csak be

Természetes vírus rezisztencia rendszerek

Vírus specifikus

(genetikai variabilitás, hagyományos nemesítés)

Poligénes

Ált. kvantitatív rez.

ritkán használt, de

pl. MSV mastrevírus jó

Monogénes

Recesszív!!

1/3

Domináns

2/3

R-gén !!!

Inhibitor!

Általános antivirális rendszer

(RNS silencing, RNAi)

(genetikai variab. nincs hagyományos nemesítéshez rossz,

biotechnológiai nemesítés)

Pathogen derived resistance

A PDR koncepció

Cél: Idegen gén beépítésével vírusellenállóvá tenni a növényt.

Elvben nagyon sokféle gén alkalmas lehet rá, pl dsRNS vírusok ellen dsRNS kötő fehérjék termeltetése.

Gyakorlatban egy domináns típus: Pathogen derived resistance (PDR)

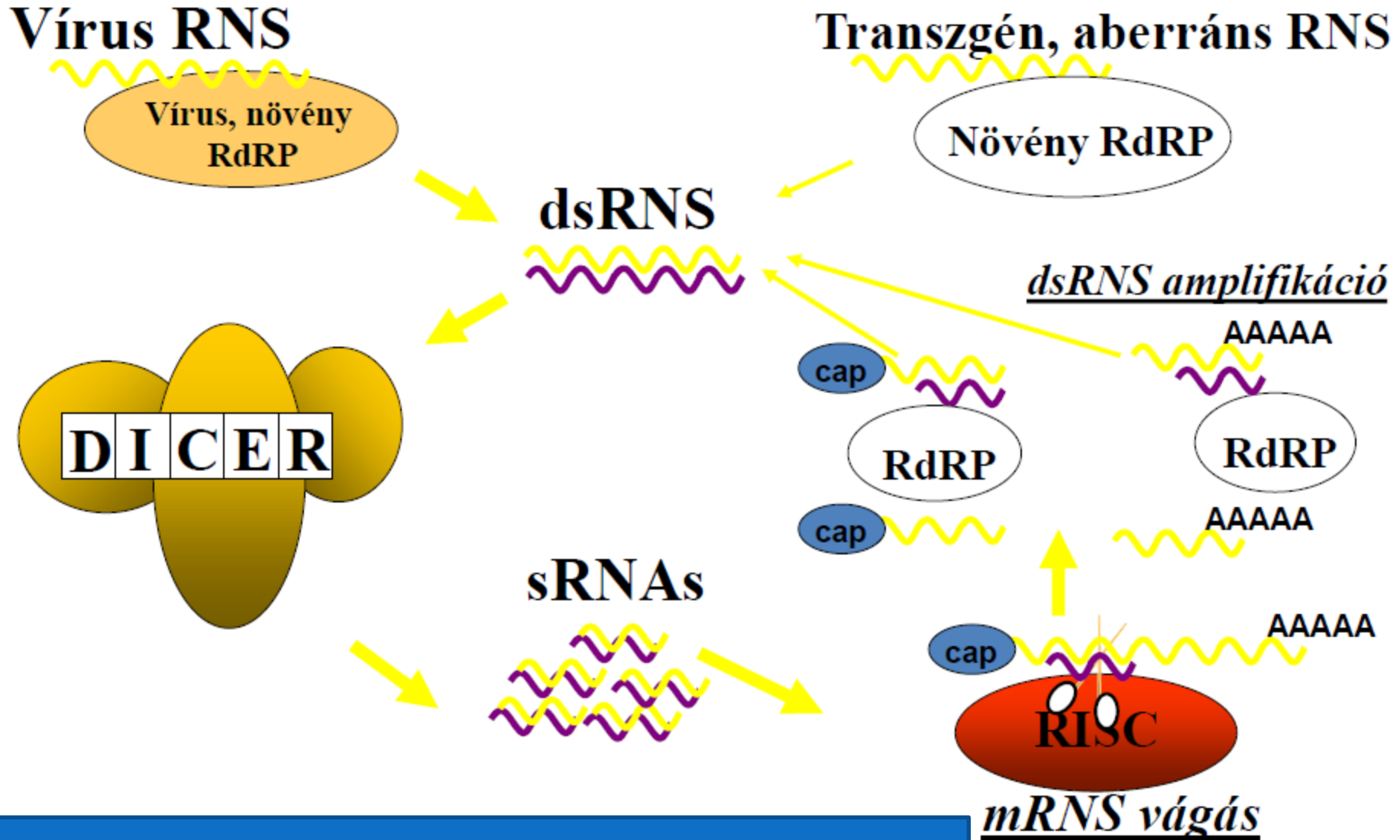
PDR általános mesterséges védekezés lehet bármely patogén ellen (vírus, gomba, baktérium).

Elv: fertőzéshez patogén fehérjék (és RNS-ek) megfelelő mennyisége és minősége kell.  Túltermeltetés

A növényekben PDR-alapú transzgénikus vírusrezisztencia kétféle módon is elérhető, virális fehérje, illetve RNS termeltetésével !!!!

Az RNS-alapú hatékonyabb!!!!  RNS silencing alapú

A növényi vírus és aberráns RNS indukálta sejt-szintű RNS silencing útvonalak

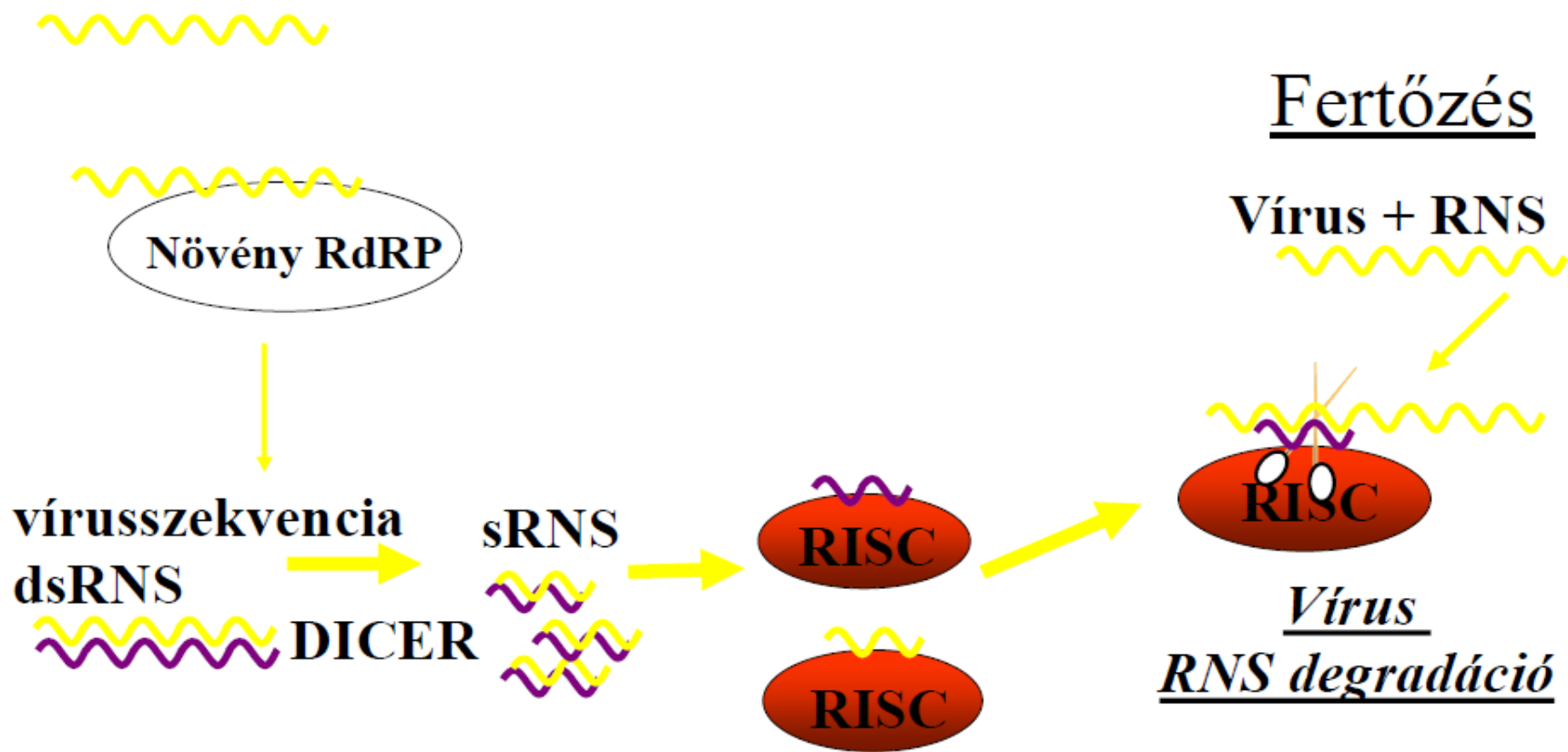


A növényi RdRP aberráns mRNS-ként ismeri fel azokat a transzkripteket, amelyeknek nincs cap-je vagy polyA farka, ilyenek az sRNS vágástermékek. RdRP ampl. regulált, különben 1 hibás mRNS minden hasonló mRNS-t eltüntetne.

Transzgénikus vírus rezisztens növények 1.

Virális RNS transzgénről expresszálatva-védettség (TEV)

Transzgén, cpRNS TEV, aberráns RNS íródott róla-szerencsére

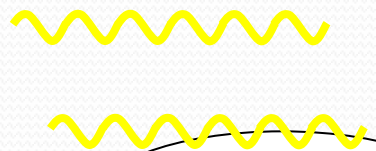


Virális sRNS-sel aktivált RISC folyamatosan jelen van, ha a vírus belép, azonnal elvágja.

Transzgénikus vírus rezisztens növények 2

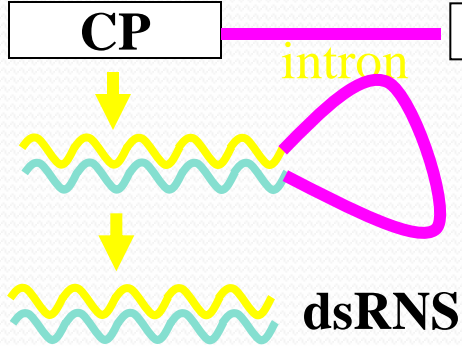
Virális szekvenciák fordított ismétlődésként transzgénről expresszáltatva

Transzgén, cpRNS TEV
aberráns virális RNS



Növény RdRP

vírusszekvencia
dsRNS
DICER



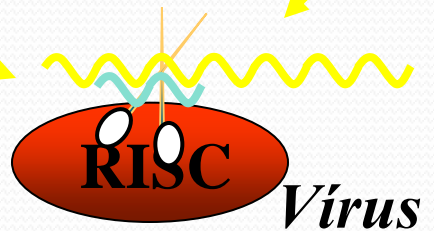
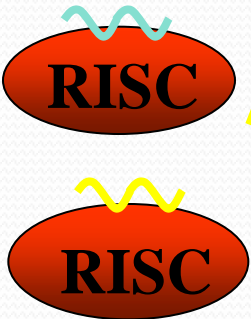
PC Transzgén, vírusdarab
fordított ismétlődésben
Hairpin RNS

Fertőzés

Vírus + RNS



sRNS



RNS degradáció

*Jóval hatékonyabb, dsRNS képzéshez nem kell RdRP!!!! Több sRNS,
Több virális sRNS-RISC, hatékonyabb védelem!!!*

Az RNAi (RNS silencing) rendszer

A silencing rendszer egy ősi eukarióta génszabályozási mechanizmus, amely kétszálú (double-stranded, ds)RNS-ek hatására indukálódik és a dsRNS-sel homológ nukleinsavak inaktiválása, elsősorban a homológ mRNS-ek specifikus lebontása révén a hasonló gének specifikus és nagyon hatékony inaktivációját, silencing-jét eredményezi. A rendszer specifitását rövid 21-26 nt RNS-ek adják!!!!

Az RNAi (silencing) rendszer jelentősége

Az RNAi rendszer felismerése alapvetően változtatta meg a eukarióta génszabályozásról, az RNS-ek szerepéről alkotott képet.

Páratlanul hatékony eszköz a gén-funkció kapcsolat megállapítására

Óriási gyakorlati jelentőség

Az RNS-alapú transzgénikus vírusrezisztencia (RNS-alapú PDR) ezen alapszik.

A recesszív rezisztencia gének és a CRISPR-alapú transzgénikus vírusellenállóság

R-gén alapú rezisztencia gyakori mindenféle patogénnel szemben

Recesszív monogénes főleg csak virális patogének ellen hasznosak.

A vírusok a gazda génexpr. rendszerét használják.

**Model: rec. rezisztencia passzív, a gazda egyik olyan faktora hiányzik,
ami a vírusnak kell**

A mRNS stabilitását biztosító Cap-PABP ribonukleoprotein (RNP) komplex felépítése

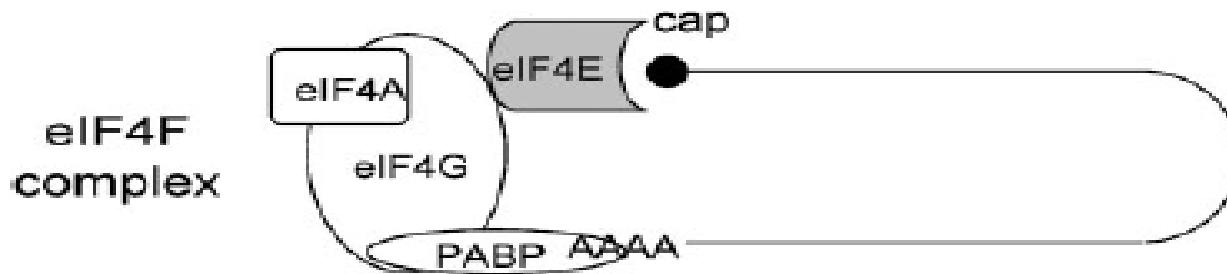


Fig. 6. eIF4E and the eIF4F complex. eIF4E together with eIF4G and eIF4A are part of the complex, eIF4F. PABP = poly(A)-binding protein. mRNA is shown 'circularized' with its cap and poly(A) ends identified.

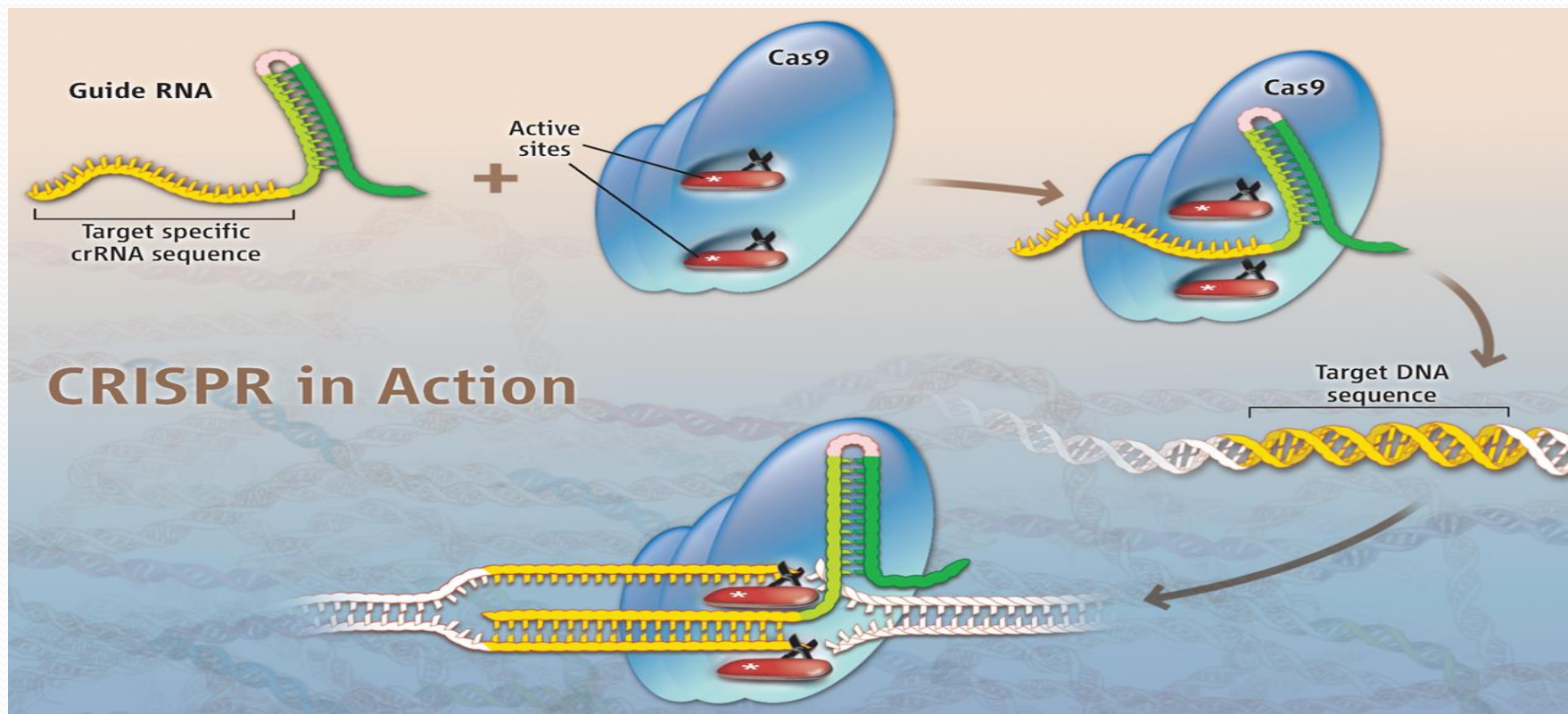
A cirkuláris struktúra

- transzláció iniciációját segíti,
- védi a mRNS-eket az exonukleázoktól!

-eIF4E vagy eIF(iso)4E fehérjék kellenek az egyes vírusok replikációjához
-eIF4E vagy eIF(iso)4E hiány nem okoz komoly gondot a gazdanövényben.
Azaz ha tudunk csinálni eIF4E vagy eIF(iso)4E hiányos növényeket, ezek minden az adott faktort igénylő vírus ellen ellenállóak lesznek

Silhavy Dániel

CRISPR/Cas9 rendszer-eredetileg baktériumok DNS vírusok védekezési rendszere, de eukariótákban hatékony, specifikus mutációs rendszerként használható!!!



Cas9 vágja a guide RNS-sel komplementer régióban vágja a DNS-t, a reparáció során hibák, mutáció.

Ha egy növényben termeltetünk Cas9-et és egy guide RNS-t, a guide-dal komplementer DNS-t mutáltathatjuk

Silhavy Dániel

RNS silencing alapú transzgénikus rezisztencia:

Minden vírus ellen alkalmazható

Több, teljesen eltérő vírus ellen hatékony

Domináns jelleg

*Transzgénnek a növényben folyamatosan működni kell:
Törvényi szabályozás szempontjából mindenképpen transzgénikus*

CRISPR/Cas9 alapú transzgénikus rezisztencia:

Csak ott alkalmazható, ahol ismert a gazdafaktor ami kell a vírusnak (kevés ilyen)

Minden az adott faktor igénylő vírus ellen jó

Recesszív, csak homozigótaként működik

*A genetikai módosítás utána transzgénnek nem kell jelen lenni:
Törvényi szabályozás szempontjából nem feltétlen transzgénikus*

A KUKORICA ROVAR-REZISZTENCIA JAVÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

➤ Kukoricamoly és kukoricabogár rezisztens hibridek: *Bacillus thuringiensis* (**Bt**) baktérium által termelt **delta-endotoxint** kódoló génszakaszt építették be. Bt baktérium különböző törzsei többféle kristályos toxint termelnek, melyek más és más rovarfajokra hatnak. 1999-ig 130-féle gént, ill. fehérjét azonosítottak, melyek mindegyike csak egy, vagy csak néhány rovarfajra toxikus.



Növényi géntechnológia alkalmazása

- **Agronómiai tulajdonságok**
 - Biotikus Stressz
 - Rovar rezisztencia **Bt kukorica**
 - Betegségellenállóság
 - vírus, baktérium, gombal, fonálféreg
 - **Liszthatmattak szemben ellenálló búza**
 - Gyomirtószer rezisztencia
 - Abiotikus Stressz
 - Szárazság, hideg, meleg, sós talaj, sovány talaj
- **Minőségi tulajdonságok**
 - **Nitrogén asszimiláció, Keményítő bioszintézise, O₂ asszimiláció**
 - **Feldolgozhatóság**
 - **Kereskedelmi élettartam**
 - **Reprodukció: szexuális határok, hímsterilitás, magnélküli termés**
 - **Tápanyagtartalom**
 - **Makro: Fehérje, szénhidrát, zsírok, rost**
 - **Mikro: Vitaminok, ásványi anyagok, antioxidánsokstb**
 - **Káros anyagok: allergenek és toxinok eltávolítása**
 - **Íz, illat**
 - **Rost, minőség, szilárdság, természetes színek**
 - **Felépítés**
 - **Dísznövények: szín, kereskedelmi élettartam, morfológia**
- **Új növényi termékek**
 - **Olajok**
 - **Fehérjék: gyógytápanyagok, terápiás anyagok, vakcinák**
 - **Polimerek**

Bioreaktorok

- **Olajok**
 - **Megváltoztatott telítettségű és összetételű zsírsavak**
- **Fehérjék**
 - **Enzimek - Észteráz (nyúl májból) búza endospermiumban**
 - **Vakcinák**
 - **Hepatitis B v. banánban**
 - **Cholera toxin B. v. rizsben (saját eredményeink)**
- **Polimerek**
 - **“Műanyaggyártás”**

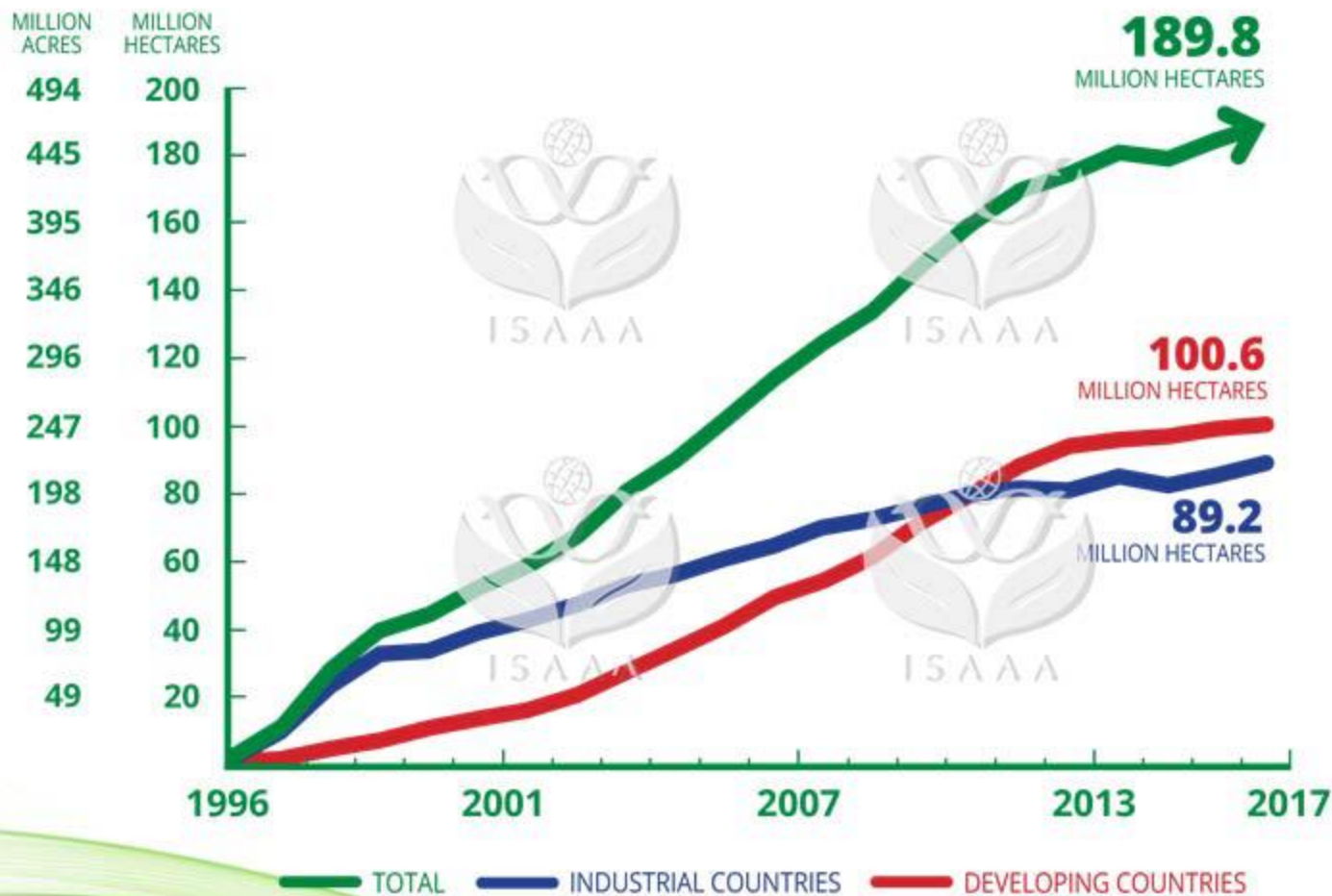
GMO-k a hétköznapokban

- EURO bankó – GM gyapotból
- Sör – GM sörélesztő
- Sajt – tejoltó enzim (rennin) – GM élesztőből
- Szennyezett talaj tisztítása – GM baktériummal
- Mosószer – GM baktériumban
- Olajszennyeződés – GM baktériumok bontják
- Inzulin – GM baktériumban
- Véralvadási faktor – GM baktérium

GMO-k a hétköznapiakban

- Az infarktus utáni vérrögöket oldó hatóanyag
- A vérképzést segítő eritropoetin
- A tüdőtágulás kezelését szolgáló alfa-1-antitripszin
- Számos vakcina (veszettség, hepatitis B, stb.)
- A fájdalomcsillapítók 80%-a, az asztmagyógyszerek 60%-a, a depressziót kezelő hatóanyagok 62%-a, a migrén megszüntetését segítő 52%-a és a skizofrénia kezeléséhez használt gyógyszerek 60%-a is.

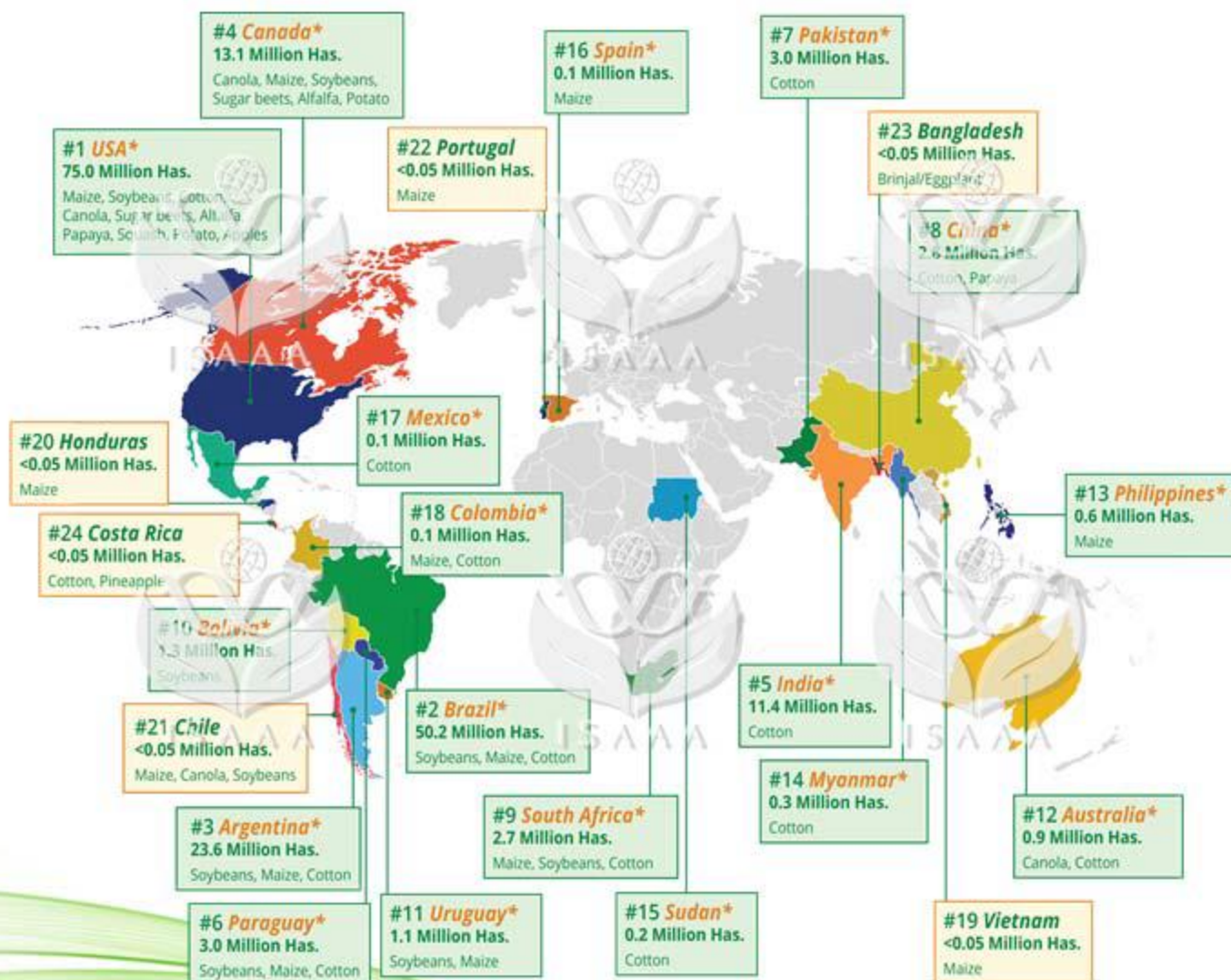
Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2017: Industrial and Developing Countries (Million Hectares, Million Acres)



ISAAA, 2017



Biotech Crop Countries and Mega-Countries*, 2017



■ *18 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

ISAAA, 2017

Engedélyeztetés az EU-ban

- A GM-termékek (GMO-k, GMO-t tartalmazó vagy a GMO-val előállított termékek) piacra történő kibocsátását az EU-ban engedélyeztetni kell.
- EFSA (*European Food Safety Authority*, Parma, Olaszország) tudományos alapon végzi a GM-termékek kockázatértékelését, az engedélyezés az Európai Bizottságra és a Tagállamokra, mint kockázatkezelőkre hárul.

GMO Panel és Szakértői Munkacsoportjai

Kockázatbecslés lépései

Az európai és amerikai megközelítés közötti különbség!

A GM Növények Magyarországon

- Az érvényben lévő új Alkotmány XX. cikke (2) bekezdése.
- Kísérleti célból lehetséges szabadföldön – engedély kérés után, a rendszabályok betartásával.
- Vetőmagpiaci pozíció, GM mentes előny megtartása fontos – Európában 2. legnagyobb kukorica vetőmageportőr ország vagyunk.
- Az elsőgenerációs GM növények 20 évvel ezelőtti technológia termékei.

A GM technológia újabb, várható fejlesztései növényeknél

- Kloroplasztisz GM növények előállítása
 - A beépített gén a zöld szintest önálló genetikai anyagába (plasztom) kerül
 - A plasztom **a sejtmagi kromoszómáktól független** öröklődést mutat
 - A plasztom (és a beépített transzgén is) szigorúan anyai öröklődést mutat – tehát **a virággal nem jut át más növényekbe**
 - A **sejtenként csaknem 10.000 génkópia** a leghatékonyabb élő bioreaktor biztosíthatja (lásd gyógyszer hatóanyagtermelés)

A GM technológia újabb, várható fejlesztései növényeknél

- RNS alapú géncsendesítési technológiák elterjedése
 - Ebben az esetben a beépített “transzgén” alapján a növény már **nem termel új fehérjét**, a termelődő RNS molekulák meglévő növényi gének működését módosítják

GENOMSZERKESZTÉS



Köszönöm a figyelmet!

Eredményes felkészülést és sikeres
vizsgát!