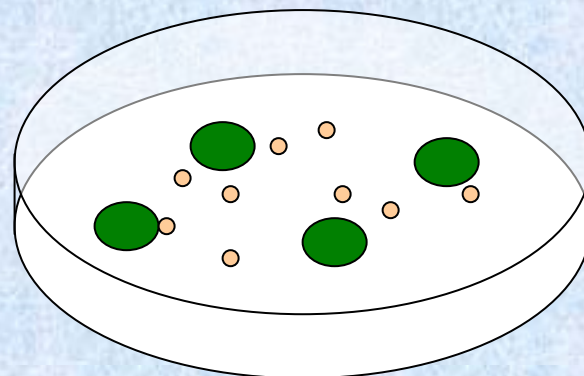
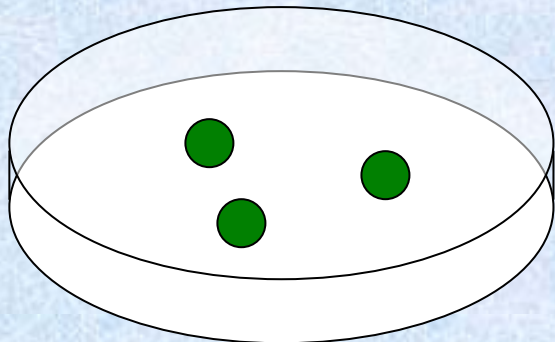
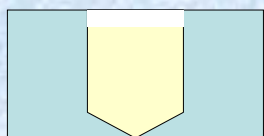
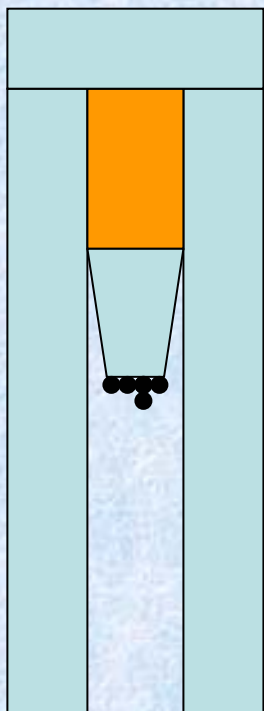




Növények transzformációja



A növényi biotechnológia

- Micropropagáció
- Szomatikus hybridek / Cybrids
- Haploid növények
- Fermentáció
- Új gének bejuttatása növényekbe

Az új gének felhasználása

- Génfunkció kutatása
- 'Molecular farming'
- Termesztett növények megváltoztatása egy lépésben

Molecular farming

- Biodegradálható műanyag:
Polyhydroxyvajsav (PHB).
- Monoklonális ellenanyagok
- Human Serum Albumin
- Interleukinok
- Neurotransmitterek: pl. 50mg/kg Leu-enkaphalint termelő repce
- Biodiesel: módosított olajkompozíció
- Vakcinák: pl. vírus köpenyfehérje termelése

Molecular farming



Gene isolation -
easy



Vector design

- organ specific promoters
- High level expression



– Containment

- Transformation of maize by Biolistics



Regeneration from a
crop monocot difficult



- Growth, seed harvesting and downstream processing requires strong agricultural and fermentation expertise.
- www.prodigene.com

A növénynemesítők által kedvelt tulajdonságok

- Nagy elsődleges produktivitás
- Magas termésátlag
- Magas tápérték
- Jó termelhetőség a különböző rendszerekben
- Nitrogén fixáció
- Szárazságtűrés
- Ellenálló betegségekkel szemben
- Gépi művelésre alkalmas
- A nappalok hosszára nem érzékeny
- Mérgező vegyületeket nem tartalmaznak







Növények genetikai transzformációja

- Áttekintés a szükséges feltételekről
- Egy GM élelmiszer kifejlesztése
- Szükséges gének
- A GM növények előnyei, különös tekintettel a fejlődő országokra
- Hogyan lehet géneket bejuttatni a sejtekbe (transzformáció)?
- Hogyan lehet teljes növényt regenerálni egyetlen sejtből?

Áttekintés a szükséges feltételekről

- Egygénes tulajdonságok.
- A gén expresszióját reguláló régiók (**Promoterek és terminátorok**).
- A gént a növényi sejtbe juttató mód (**Vektorok**).
- A transzformánsok szelektálási módja.
- A teljes növény regenerálási módja a transzformált sejtből.

Egy GM élelmiszer kifejlesztése

- 1950 First regeneration of entire plants from an *in vitro* culture
- 
- 1973 Researchers develop the ability to isolate genes
- 
- 1983 **1st transgenic plant:** antibiotic resistant tobacco
- 
- 1985 GM plants resistant to insects, viruses, and bacteria are field tested for the first time - **USEFUL TRAITS**
- 
- 1990 First successful field trial of GM cotton- **CROP**
- 
- 1994 Flavr-Savr tomato - **1st FDA approval for a food**
- 
- 1995 Monsanto's Roundup Ready soybeans approved for sale in the United States.

Hasznos egygénes tulajdonságok

- Gyomirtó rezisztencia
- **Rovar rezisztencia**
- **Vírusrezisztencia**
- **Mag produkció**
- **Gombarezisztencia**
- **Késleltetett érés**
- Fagy- és hidegtűrés
- **Szárazságtűrés**
- Magas keményítőtartalmú burgonya
- Olaj produkció
- Bioplasztik
- Jobban emészthető fehérjék
- Ellenanyagok

Kórokozó rezisztencia gének

- Rovarok

- Protease inhibitors
- *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins**
- Lectins
- Ribosome-inactivating proteins (RIPs)

- Gombabetegségek

- Chitinases and Beta-1,3-glucanases
- RIPs
- Thionins
- Antifungal peptides

A betakarított termés minőségének javítása

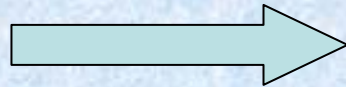
- Gyakran a termés 50% is tönkremegy betakarítás után pl. Afrikában.
- Any poisonous protein can be detoxified by heating and rendered safe e.g. lectins; inhibitors.
 - Ripening control
 - Wheat germ agglutinin
 - Cowpea trypsin inhibitor
 - Flavrsavr tomatoes contain antisense to polygalacturonase (softens tomatoes by dissolving the cell wall).

Más hasznos tulajdonságok

- Improved Agronomic properties
- Improved plant breeding
- Improved nutritional properties
- High starch potatoes
- Pollen-specific promoter plus RNAse
- Golden rice (gene from *Chrysanthemum* giving - converted to vitamin A.

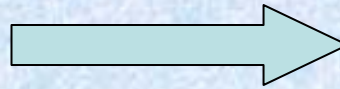
Potential of GM crops in low input, sustainable agriculture

Traditional



GM crop with pest resistance plus post-harvest qualities

4 tonnes/ha produced



5 tonnes/ha



25% losses
post-harvest
= 1 tonne/ha



10% losses
post-harvest
= 0.5 tonne/ha

3 tonnes/ha to eat

4.5 tonnes/ha to eat

Megváltoztatott tulajdonságok

- Glufosinate^r gyomirtó
- Sethoxydim^r gyomirtó
- Bromoxynil^r gyomirtó
- Glyphosate^r gyomirtó
- Sulfonylurea^r gyomirtó
- Hímsterilitás
- Módosított zsírsavak
- Virágszín
- Virág élettartama
- Késleltetett érés
- Vírus rezisztencia
- Bt

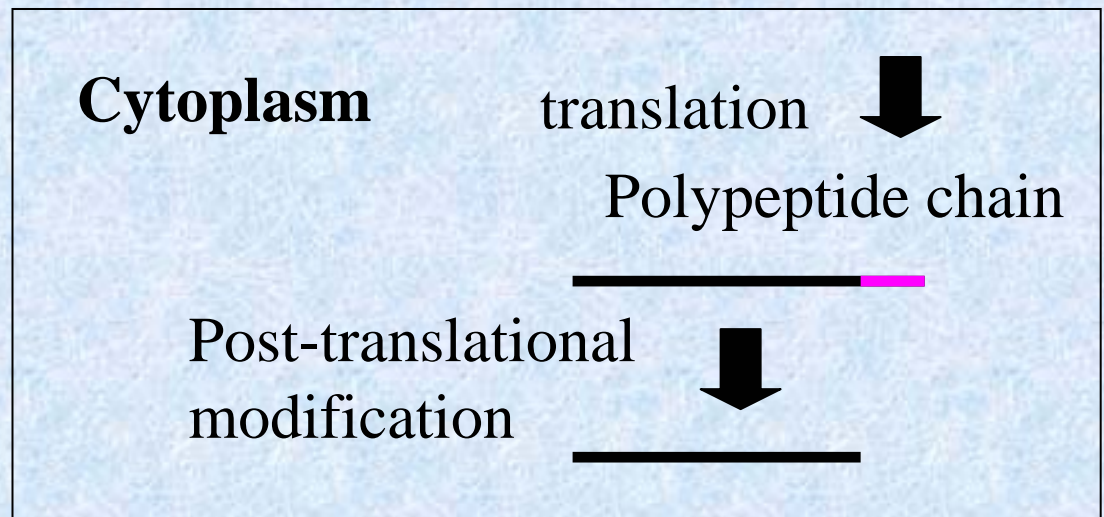
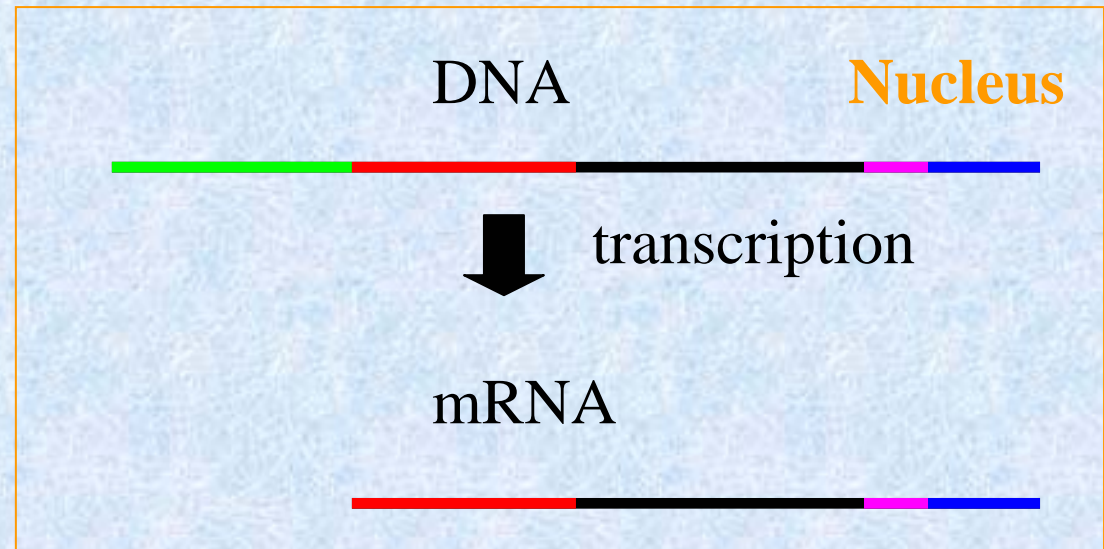
Plasmid konstrukciók

- Hasznos génkonstrukciók
- Látható markergén
- Szelektálható markergén*



Génkonstrukciók

- Plant specific promoter
- Plant RBS
- Useful gene
- Signal peptides*
- PolyA-tail



Kétféle transzformációs rendszer

Csupasz DNS

A sejtfal gátolja a DNS felvételét

- Biolistics
- SiC fibres
- Protoplasts
- Electroporation
- Pollen

Vektorba épített DNS

- *Agrobacterium*
- Virusok

Gének bejuttatása a sejtbe

Agrobacterium

- Egy természetes génebész! – tumort okoz
- A legtöbb kétszikű növényt képes transzformálni
- Problémás az egyszikűeknél

Génágyú

- Működik!
- Nincs maradék *Agrobacterium*
- Különböző DNS-ekhez használható-funkcionális tesztekhez

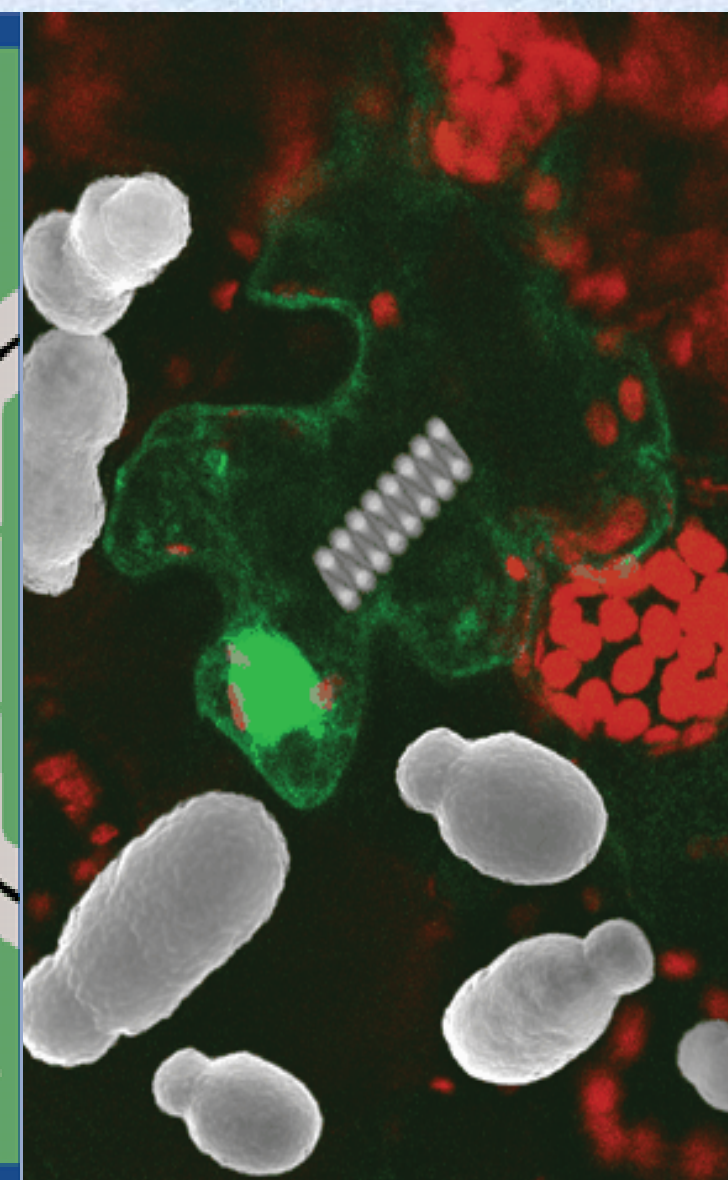
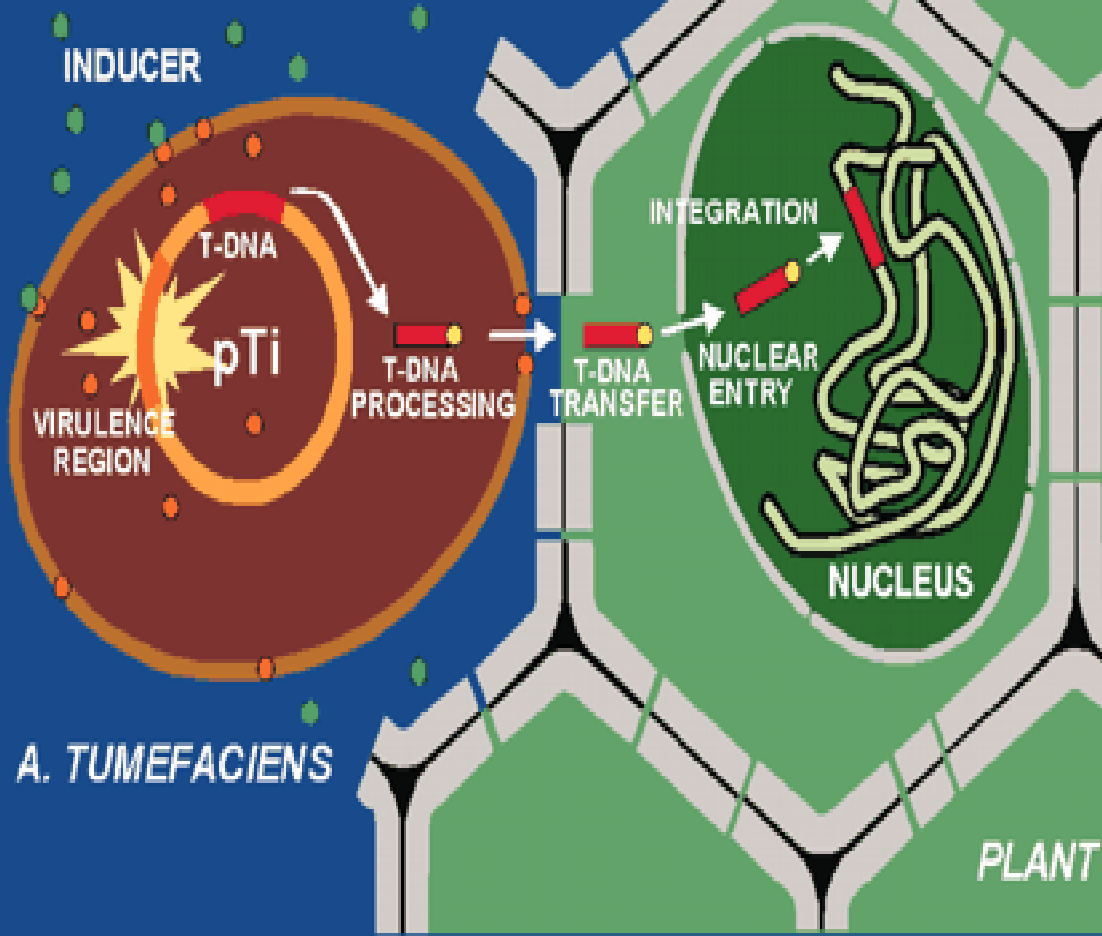
The T-DNA as a transposon

- The T-DNA is a very efficient gene-tagging tool because it prefers to insert within gene-coding DNA regions. Each time we transform a plant with a T-DNA, we are very likely to insert within a gene chosen at random.
- Scientists have exploited this property by generating large numbers of transformed plants, which is most easily accomplished with *Arabidopsis*. You can request large numbers of transformed lines from a public stock centers. You can then screen these lines, searching for interesting phenotypes.
- Once you find a mutant you like, you can verify that it has been caused by a T-DNA insertion and then proceed to clone and characterize the tagged locus.
- The T-DNA can be considered a type of transposon because it moves from the Ti plasmid (or from a binary plasmid) to the plant DNA. It is incapable, however, of further movement.

Characteristics of *Agrobacteria*

- related to *Rhizobium*
- contain large plasmids: Ti (*A. tumefaciens*); Ri (*A. rhizogenes*)
- integration of a part of the plasmid (T-DNA) induces the tumorous or rooty growth T-DNA;
- this DNA directs the synthesis of opines, carbon and nitrogen containing molecules used for the continued bacterial growth
- each bacterial strain can utilize one of the three opine classes: octopine, nopaline and agropine
- host range of *A. tumefaciens*
331 genera; 643 species
- variability is seen for infection between
varieties of a species
the organ of the plant
- monocot species except for some members of the Liliales and Arales genera are not susceptible

PASSAGE OF T-DNA FROM AGROBACTERIUM INTO PLANT NUCLEAR DNA

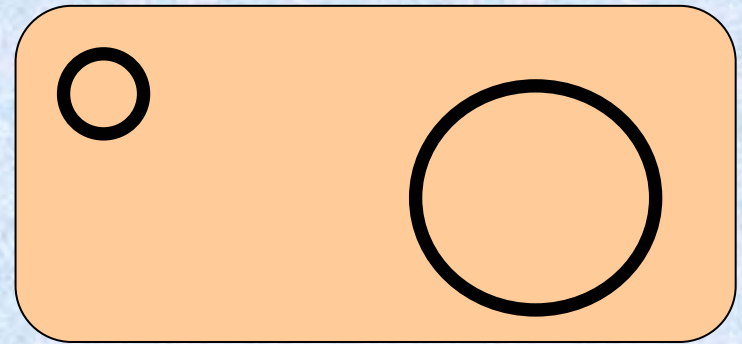


A T-DNS útja a Ti plazmidtól (pTi) a növényi genomba való stabil integrációig (Rossi et al., 1998).

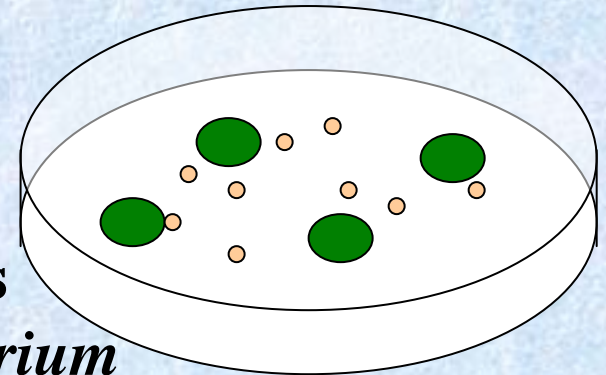
Agrobacterium-os transzformáció

- *Agrobacterium* contains a circle of DNA (Ti plasmid) that carries the desired genes
- Co-cultivation of the *Agrobacterium* with plant pieces transfers the DNA

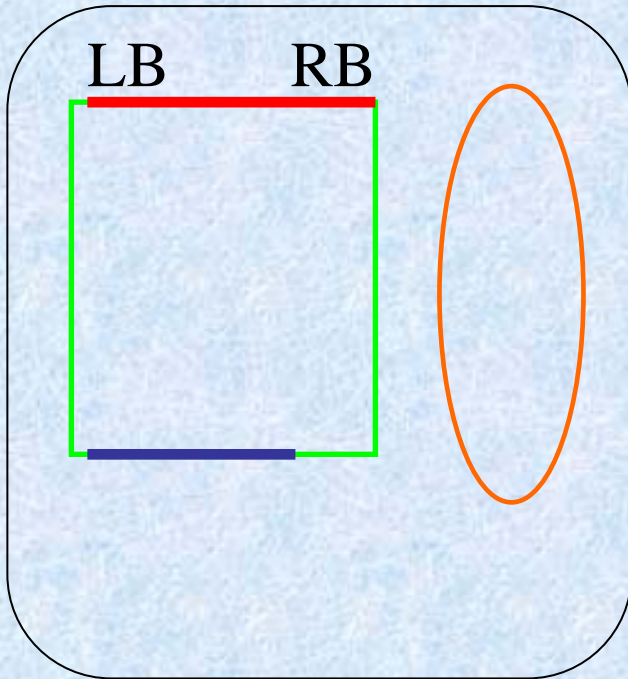
Ti Plasmid Bacterial
chromosome



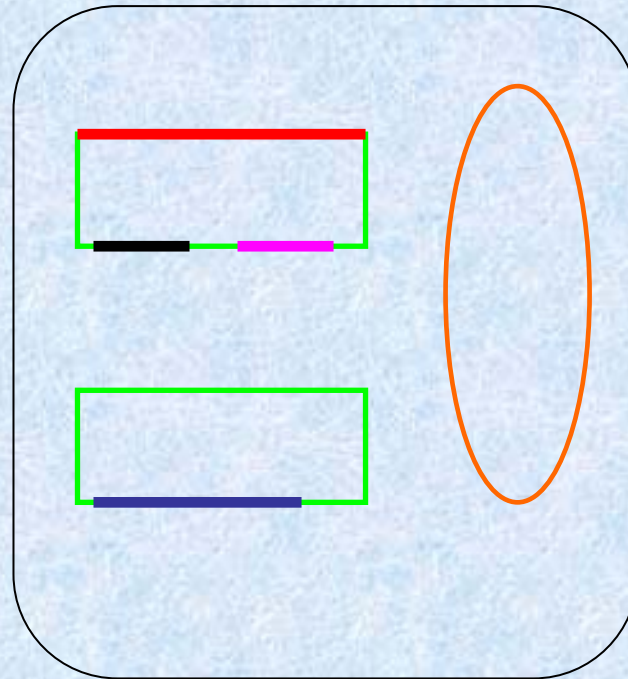
Petri dish
with leaf pieces
plus *Agrobacterium*



Cointegratív és bináris vektorok



Co-integrative



Binary vector

t-DNA

Bacterial ORI

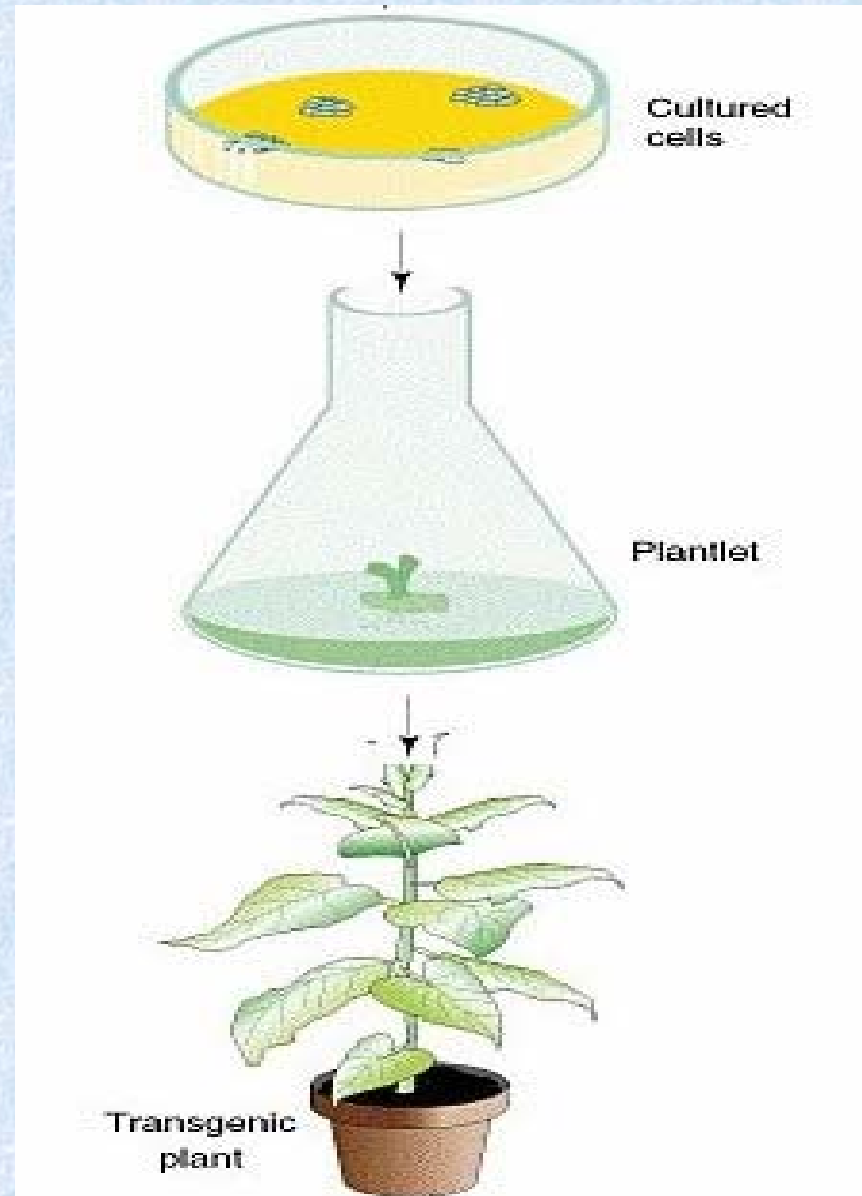
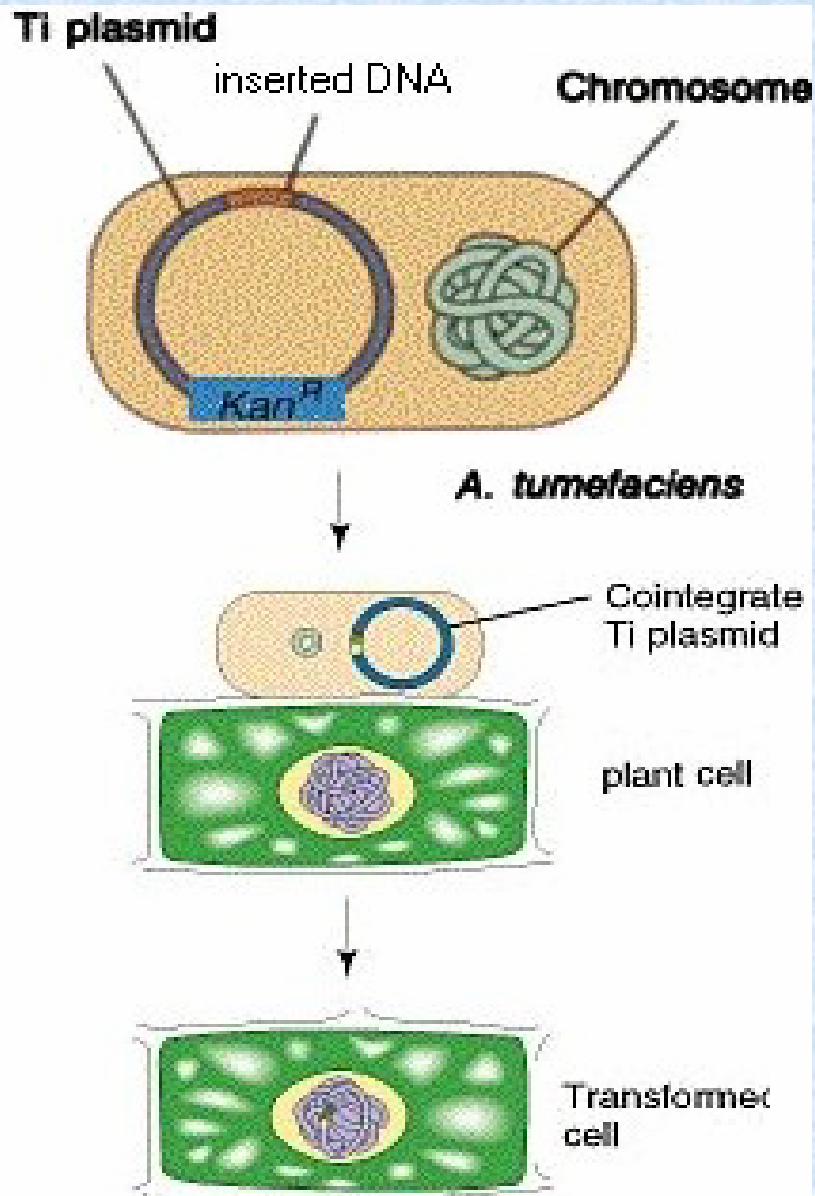
Ampicillin
resistance

VIR genes

Plasmid DNA

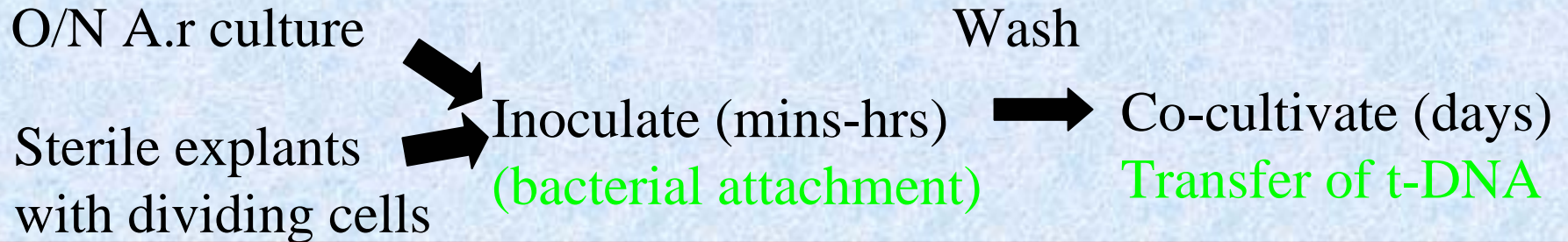
Bacterial
Chromosome

Agrobacterium-mediated Transformation

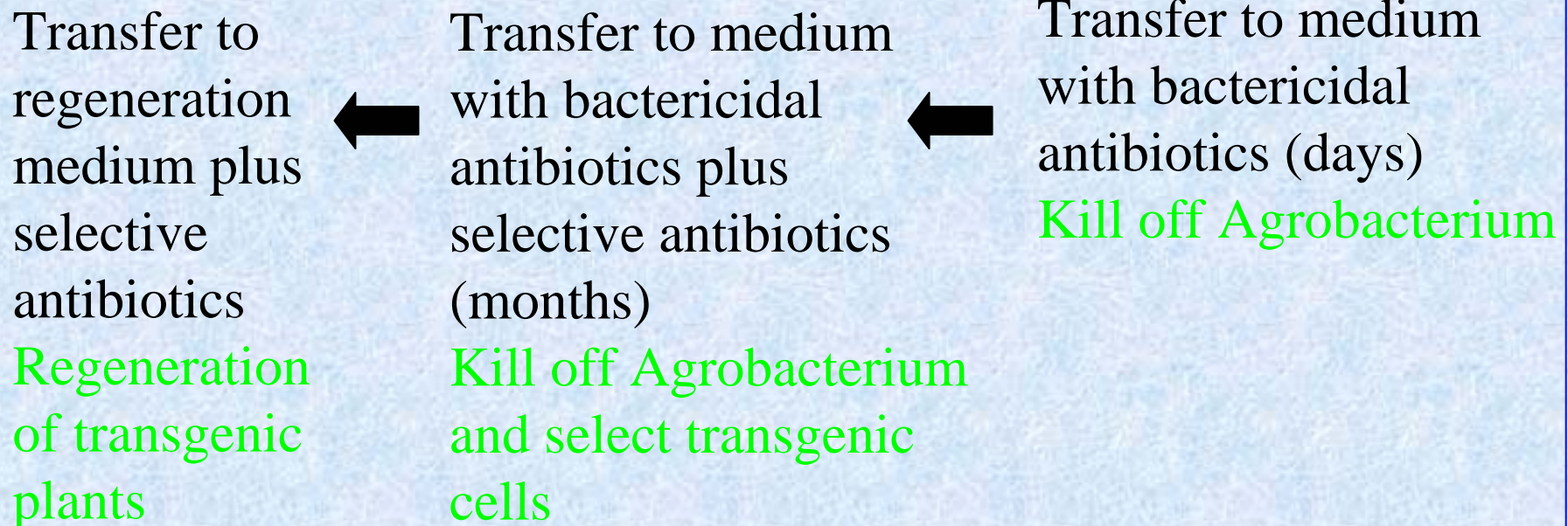


Általános transzformációs protokoll

Transformation



Recovery of transgenic plants

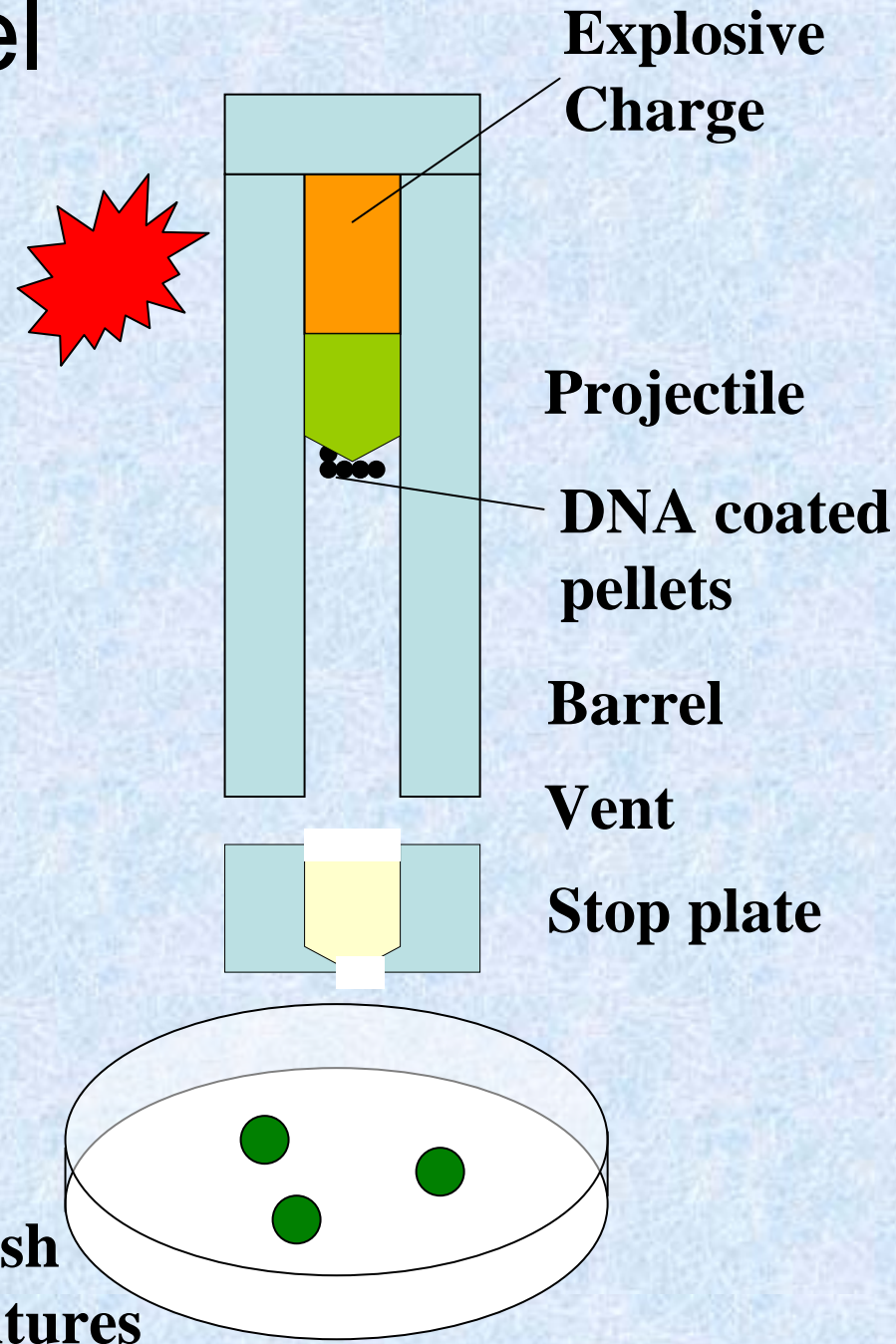


Csupasz DNS direkt bevitele

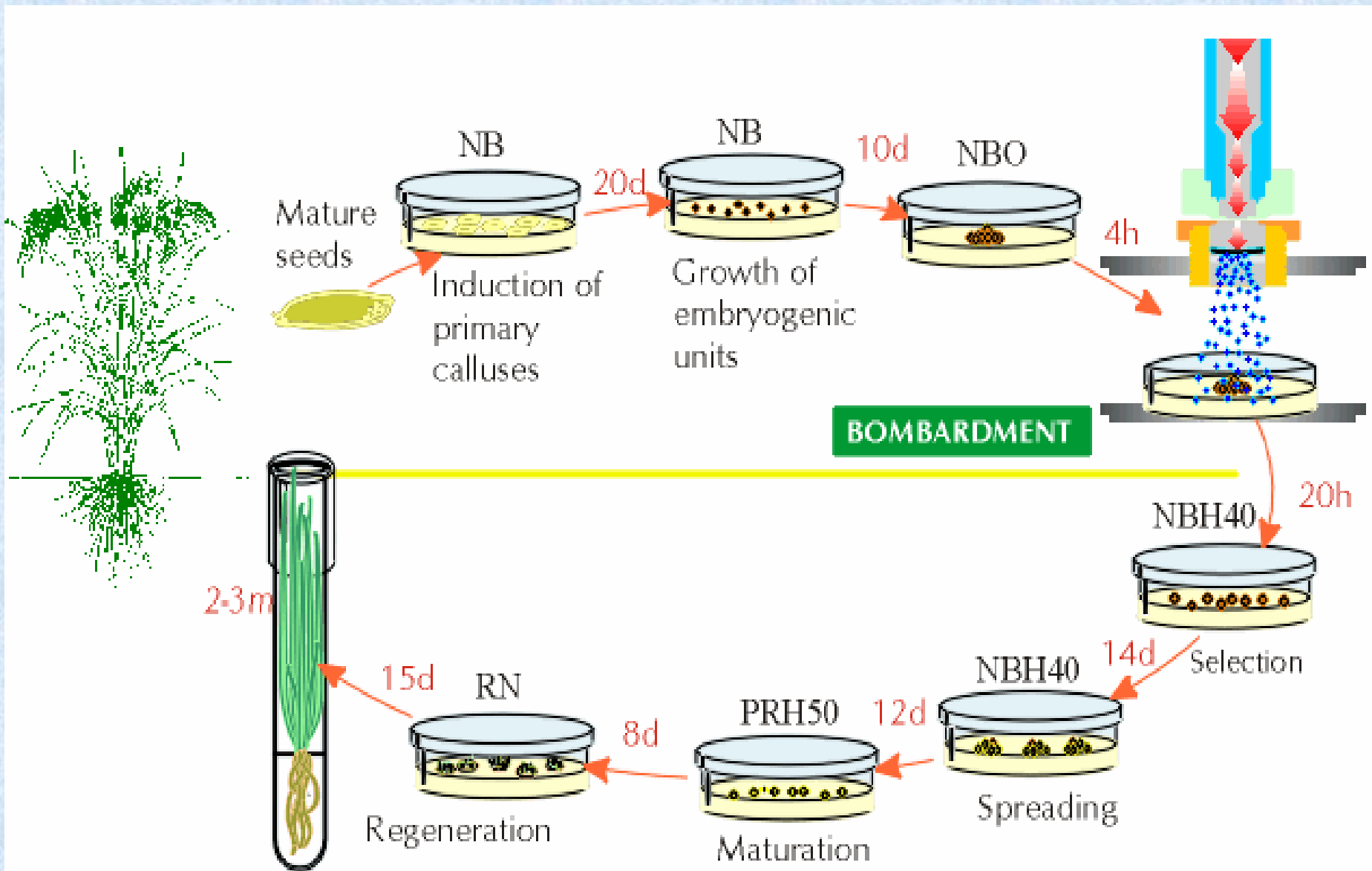
- Biolisztikus (rutinszerűen alkalmazzák): DNSsel fedett részecskék direkt belövése a sejtekbe.
- SiC szálak ($1\mu\text{m} * 70\mu\text{m}$): képesek áthatolni a sejtfalon.
- A protoplasztok sejtfal nélküli sejtek. A sejtfal leemésztésével készülnek. A DNS felvételét elektroporációval vagy polyethylenglycol kezeléssel segítik elő.

Biolisztikus bevitel 'Génágyú'

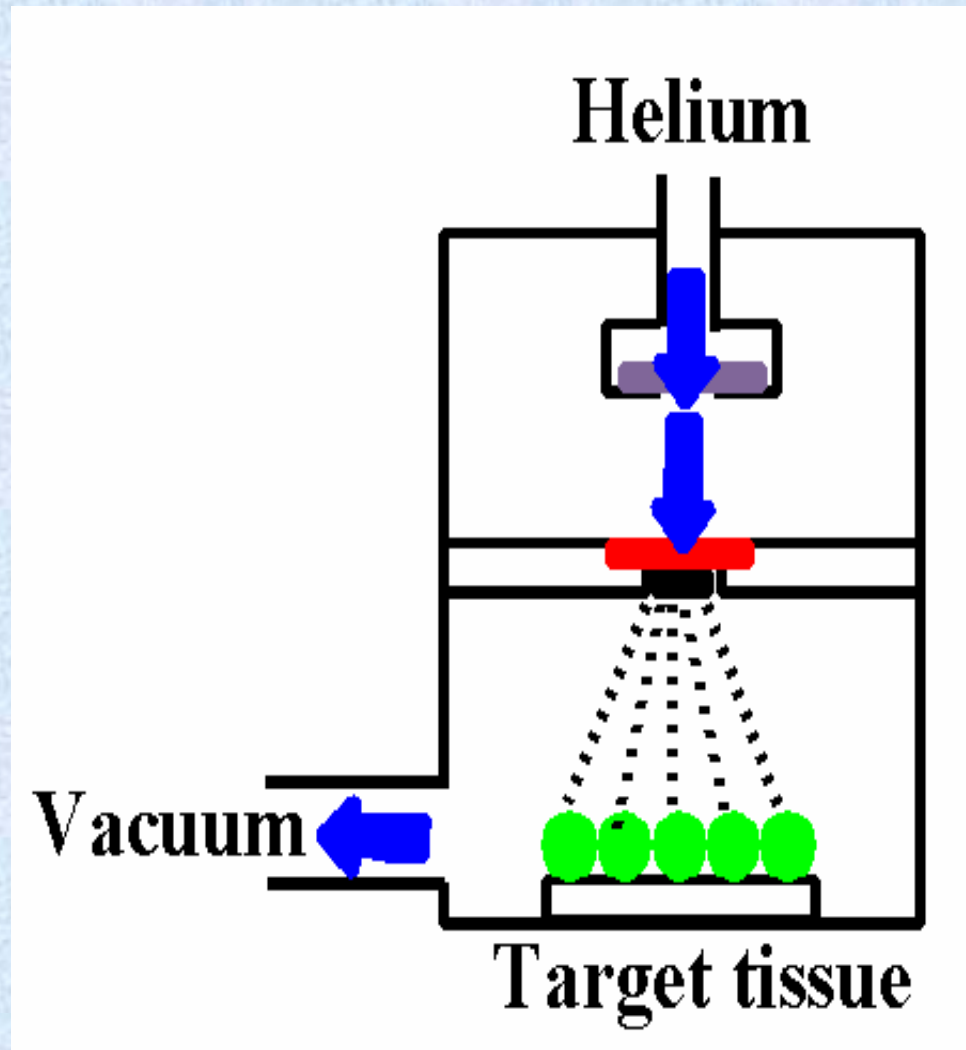
- DNA coated on pellets is forced down the barrel of a 'Particle Gun' by an explosive charge
- The particles are forced through the cell wall where the DNA is released



Microprojectile-mediated transformation of rice



Armed for research: Gene guns



Electroporation



Electroporation is the process where cells are mixed with a DNA construct and then briefly exposed to pulses of high electrical voltage. The cell membrane of the host cell is penetrable thereby allowing foreign DNA to enter the host cell. (Prescott *et al.*, 1999). Some of these cells will incorporate the new DNA and express the desired gene. While direct introduction of DNA into monocots by electroporation has proven successful, the electroporation technique is used in a relatively small proportion of cases in comparison to other methods.

Látható markerek

B-glucuronidase (GUS)

- Az UidA gén által ódolt aktivitás általánosan használt. Kék színt ad egy szintelen szubsztrátból (*X-glu*) kimutatási tesztekben.

Green Fluorescent Protein (GFP)

- Zölden fluoreszkál UV fényben.
- Nem destruktív.
- A cryptic intron problémája már megoldott.
- Egyedül is használható szelekcióhoz.

Szelekció

- A transzformáció gyakorisága alacsony (max. 3%) ezért szelekció nélkül a nem transzformált sejtek túlnőnék őket.
- Általában pozitív szelekciót, pl. antibiotikum rezisztenciát használunk. Pl. A NptII gén (Neomycin phosphotransferase II) foszforilálja a kanamycin csoportba tartozó antibiotikumokat.

A teljes növény regenerálása egyetlen sejtől: két lehetőség

Szomatikus embriogenezis

- Sok embrió képződik.
- 3 típus:
 - Pro-embriogén callus
 - Cleavage polyembryony
 - Secondary embryo formation

Adventitious shoot formation

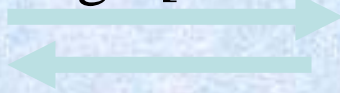
- Dividing cells stimulated by high [cytokinin]/[auxin] to form buds which grow to give shoots

Somatic embryogenesis from Pro-embryonic masses (PEMs)

+ **Auxin** leads to high [Putrescine]



Development and cycling of Pro-embryonic masses



Single cells sloughed off the surface



Putrescine to Spermidine

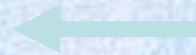


Spermidine to Spermine

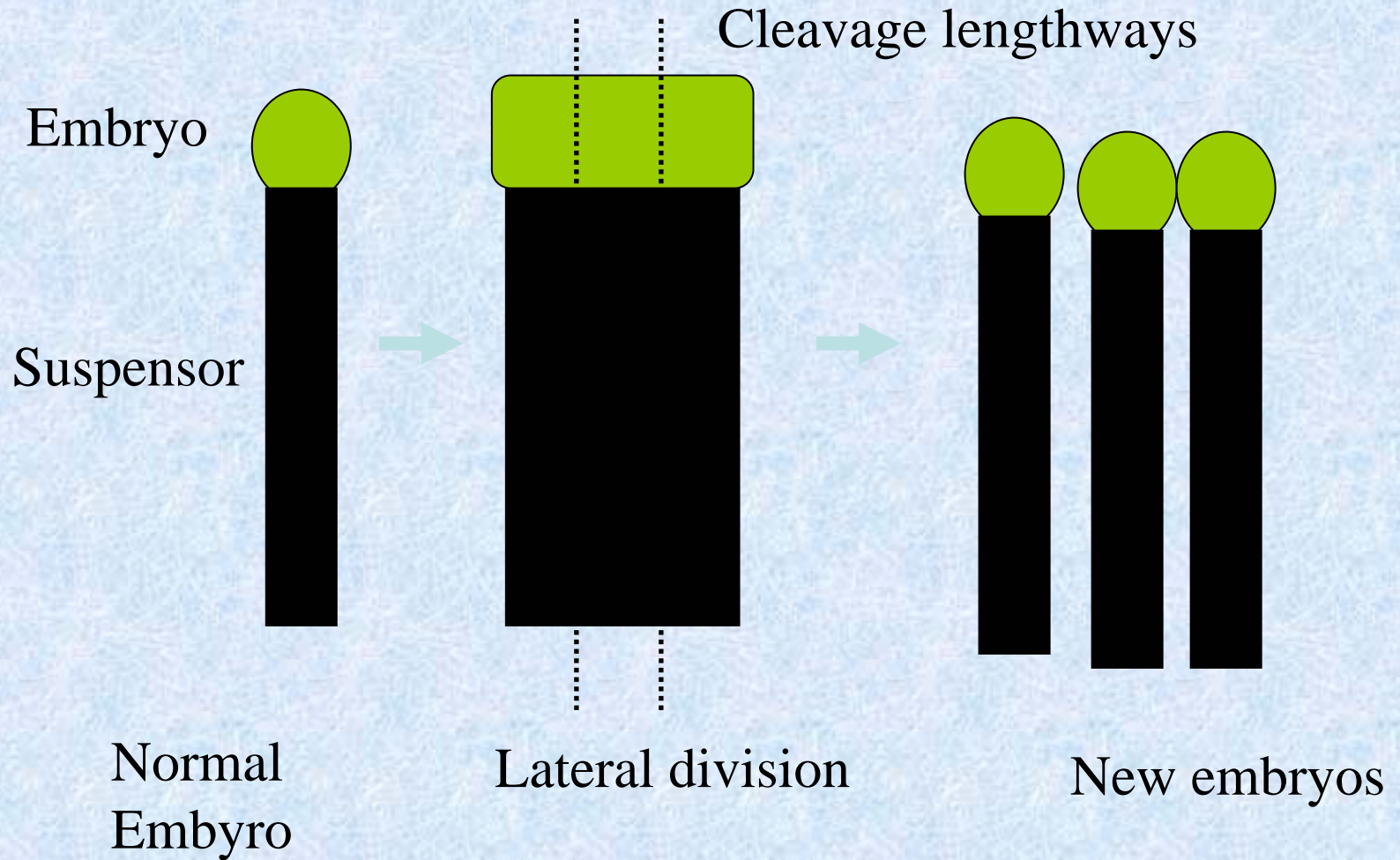


*E.g. Carrot,
Monocots,
some
conifers*

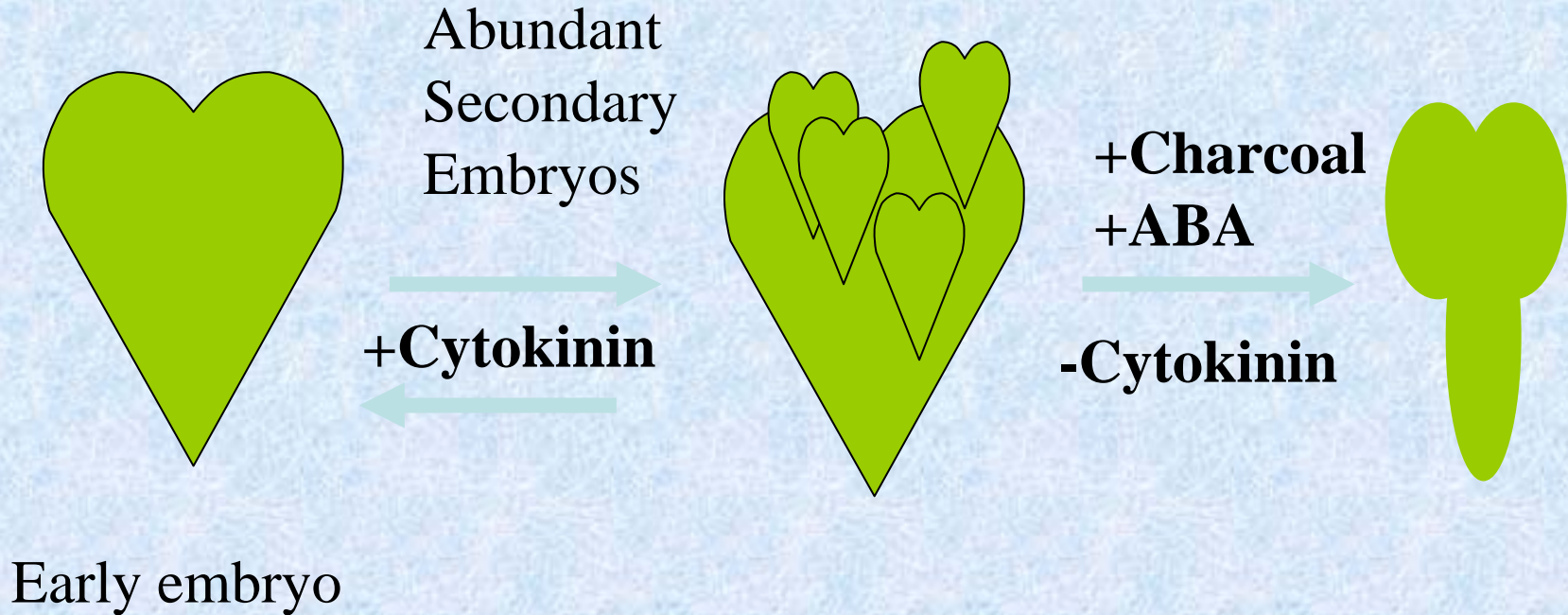
**Remove
Auxin
Polyamine
interconversions**









Cleavage Polyembryony- conifers



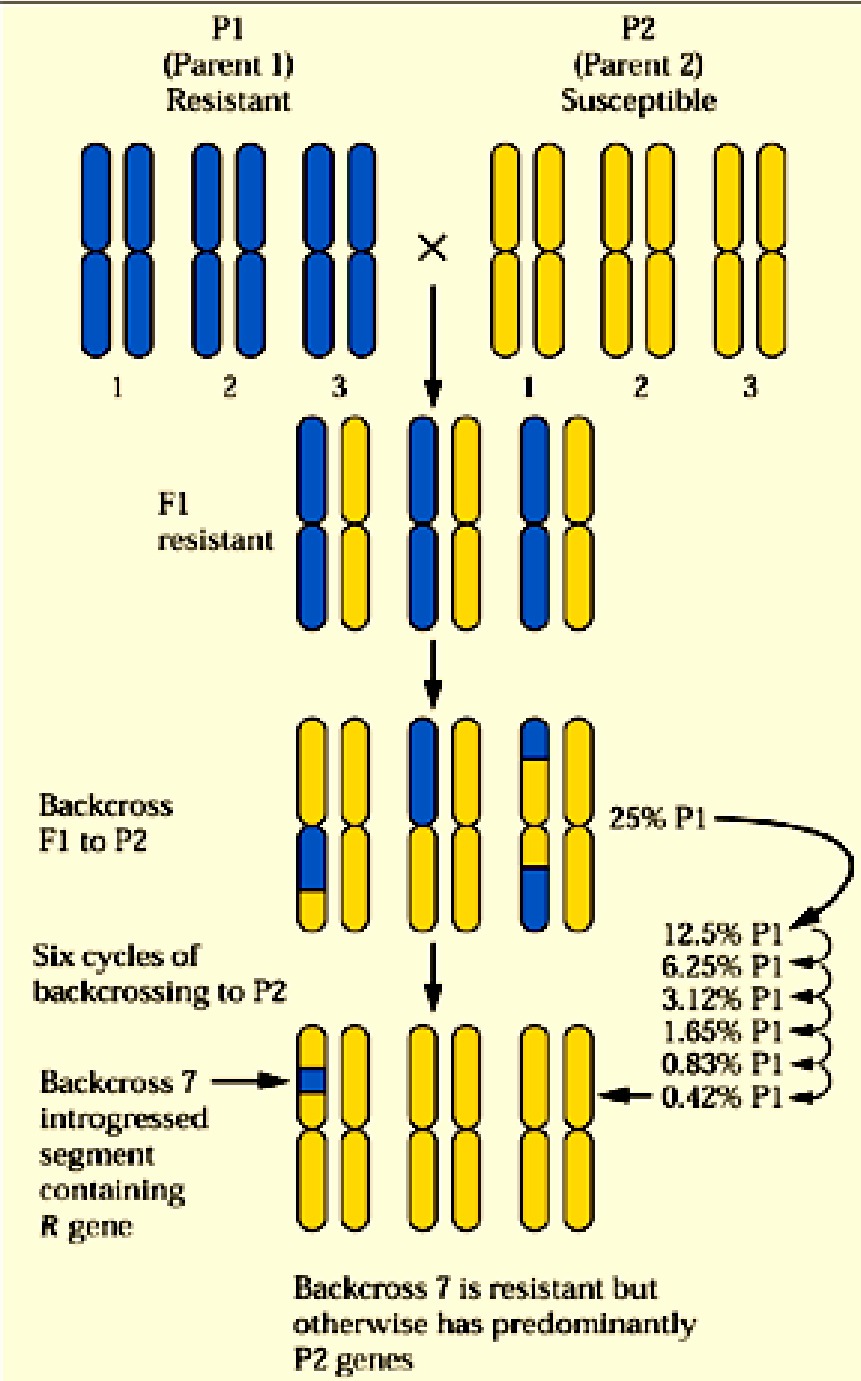
Secondary embryo formation - Most dicots



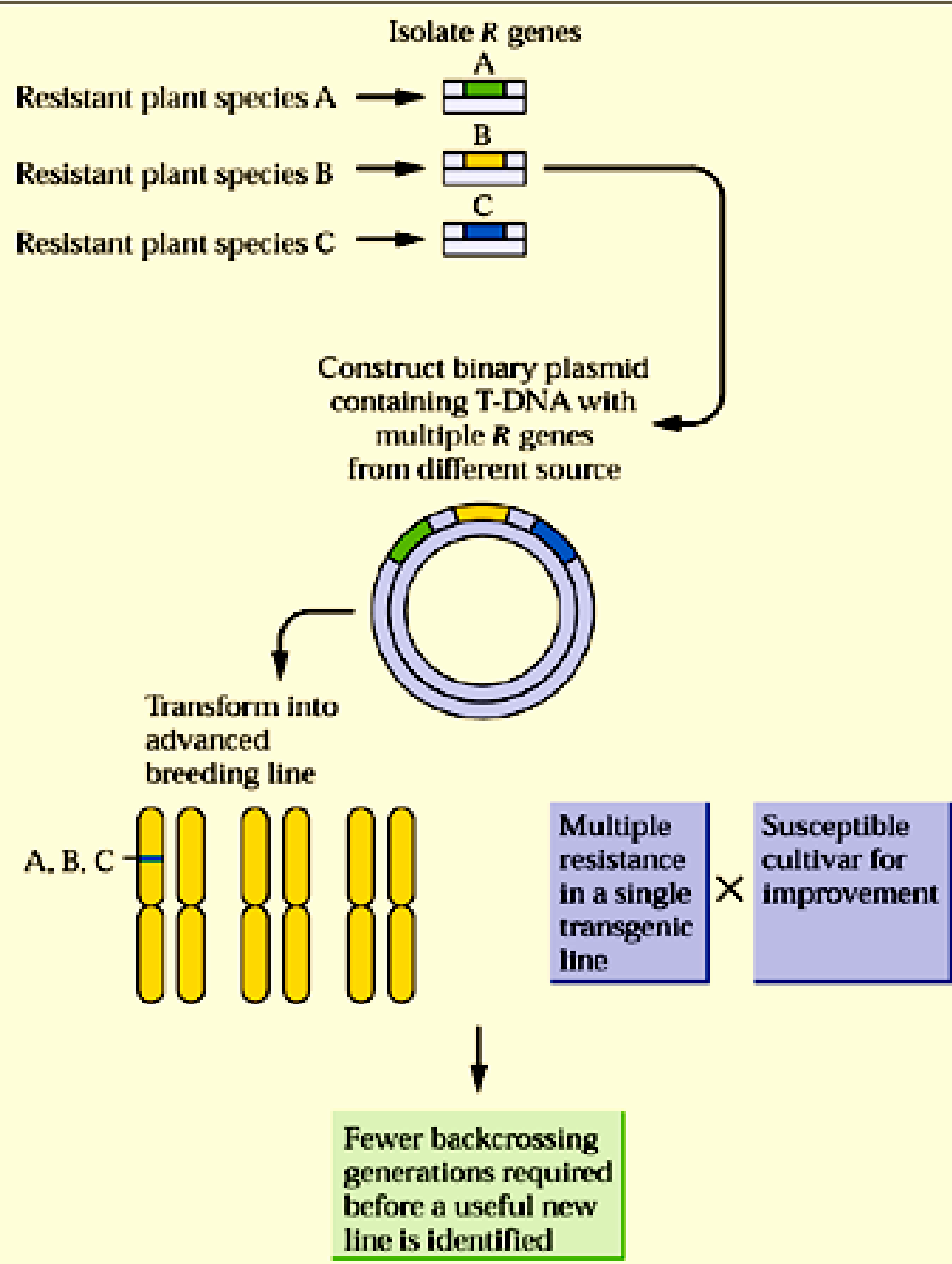
Development of GM foods

- 1950 First regeneration of entire plants from an *in vitro* culture
- 
- 1973 Researchers develop the ability to isolate genes
- 
- 1983 **1st transgenic plant:** antibiotic resistant tobacco
- 
- 1985 GM plants resistant to insects, viruses, and bacteria are field tested for the first time - **USEFUL TRAITS**
- 
- 1990 First successful field trial of GM cotton- **CROP**
- 
- 1994 Flavr-Savr tomato - **1st FDA approval for a food**
- 
- 1995 Monsanto's Roundup Ready soybeans approved for sale in the United States.

Traditional breeding method



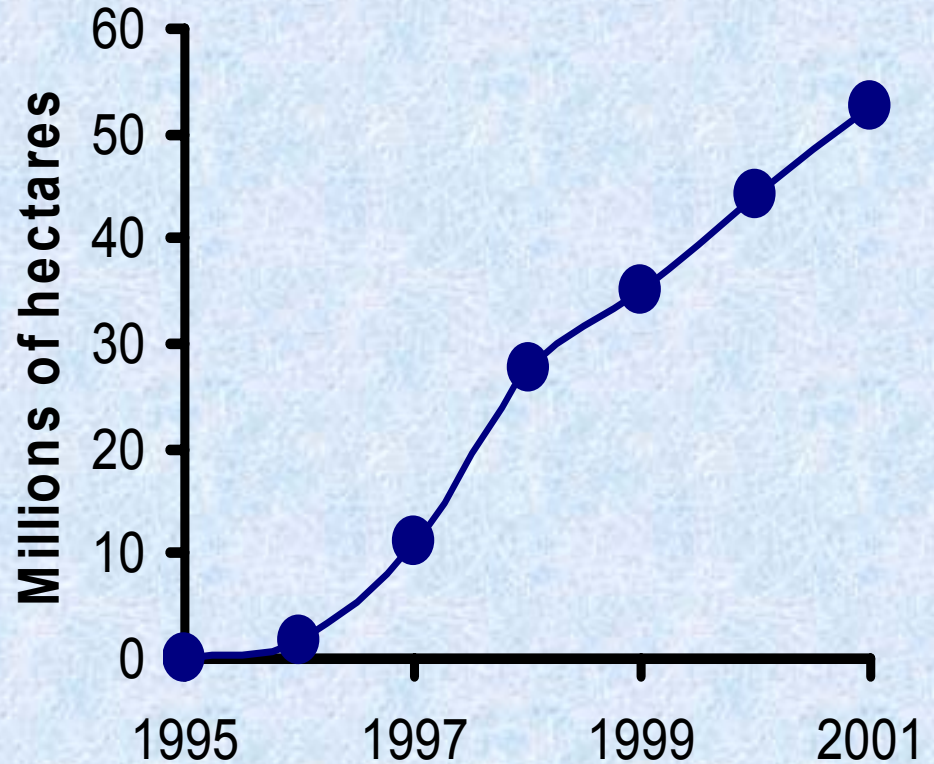
Transgenic approach



Global area of transgenic crops

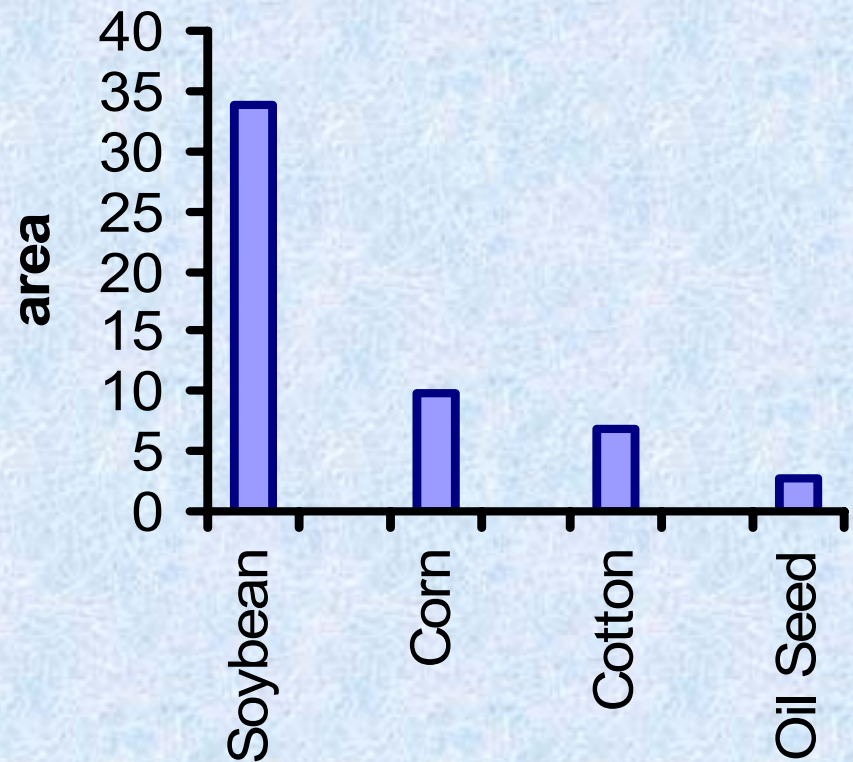
(ISAA Brief. Global Review of Commercialised Transgenic crops: 1998 & 2001)

- Acreage of transgenic crops has gone from nothing in 1995 to around 135 million acres in 2001.



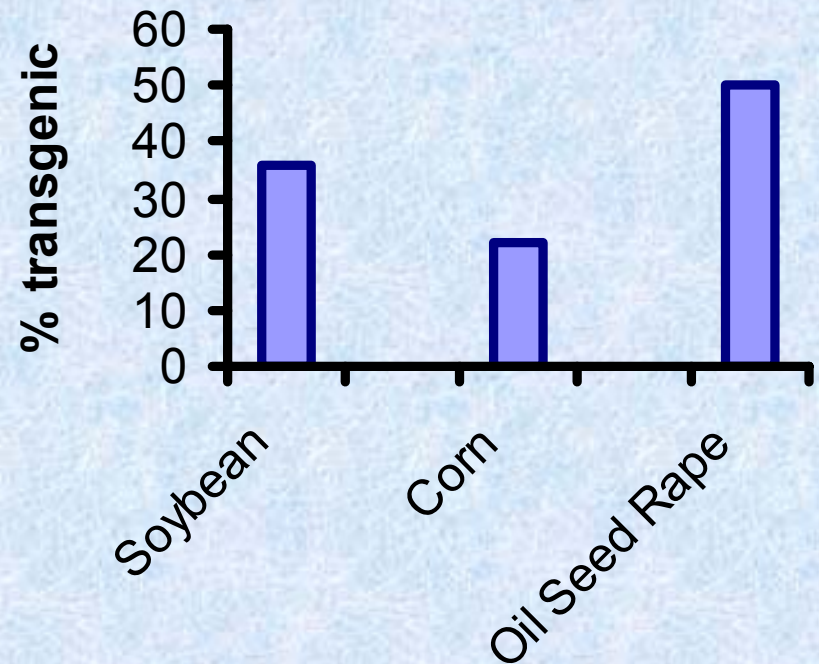
Types of GM crops (1998)

- Soybean and corn are the major GM crops
- * *Large acreage*
- * *Grown in the USA*
- * *Can be regenerated*
- Acreage of potatoes is small (<0.1 million hectares)



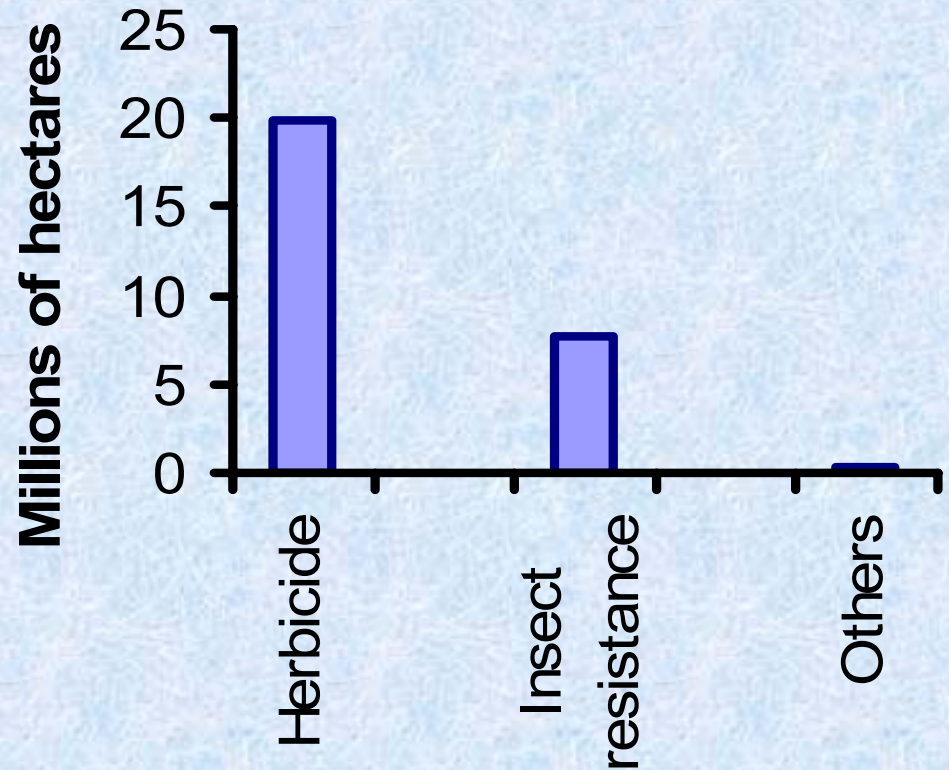
GM crop areas in North America

- Almost 1/3rd of the Soybean crop in the US is GM (60% of crop in Argentina)
- Almost 1/4 of US corn
- 50% of Canadian oil seed rape



Types of genetic modification

- >99% of all transgenic crops are either herbicide or insect resistant
- <1% have other traits

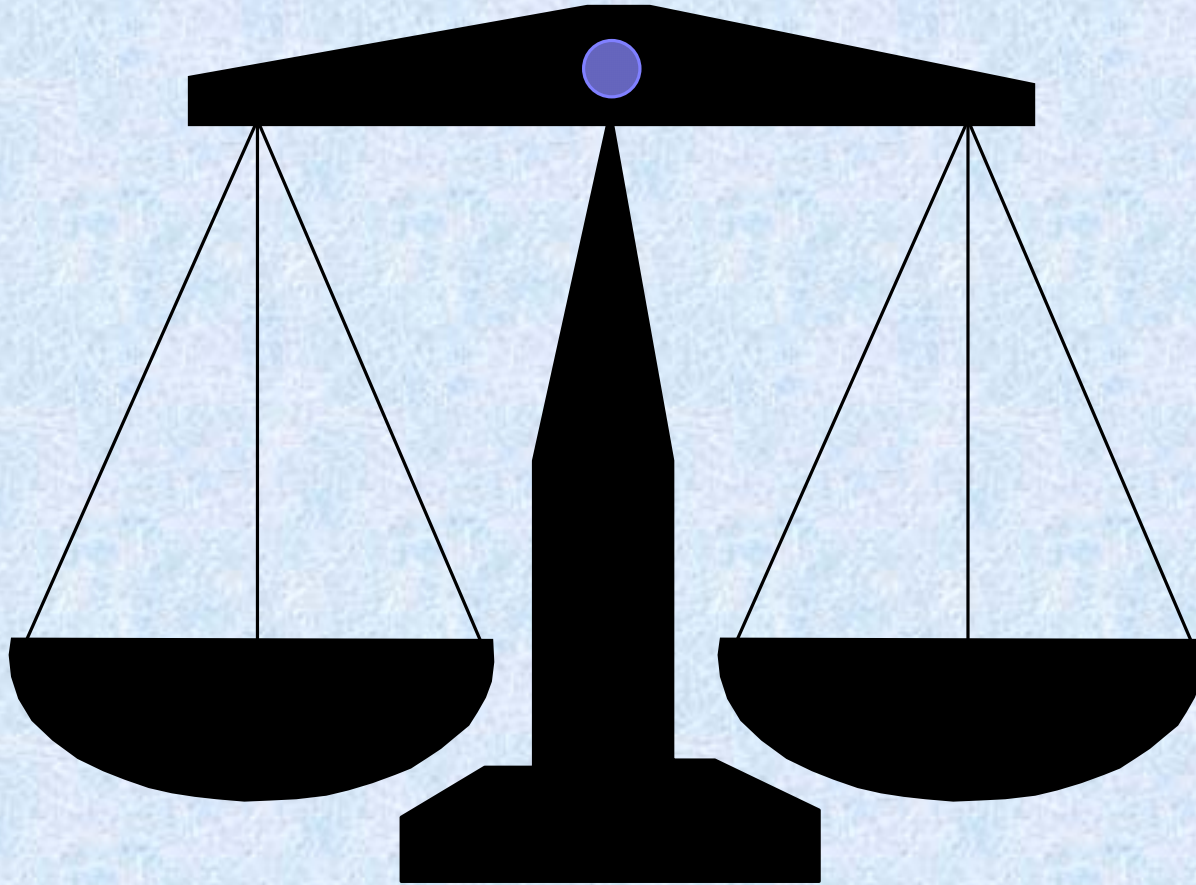


Approved Transgenic plants

- Soybean
- Corn
- Cotton
- Oil Seed rape
- Sugarbeet
- Squash
- Tomato
- Tobacco
- Carnations
- Potato
- Flax
- Papaya
- Chicory
- Rice
- Melon

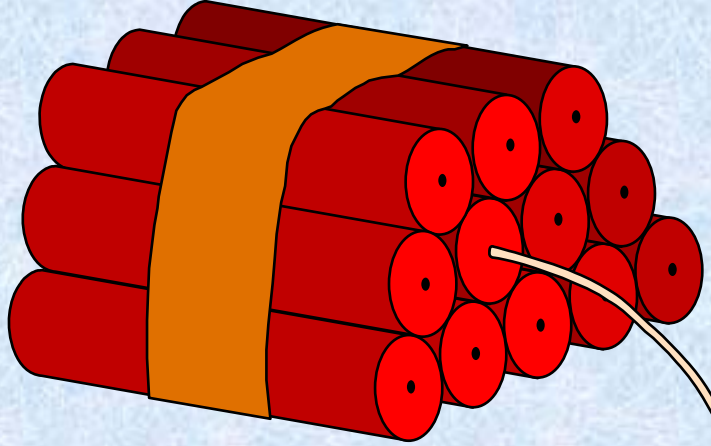


Problémák és lehetőségek



Future traits and methodology

- Environmental stress resistance
- Edible vaccines
- Post-harvest quality
- 'Plantibodies'
- Biodegradeable plastics
- Fungal resistance
- Targetting to the chloroplast
- Organ specific expression
- Antibiotic-free selection
- Greater gene stability
- More crop species



‘Problems’ with GM foods

- Unethical to meddle with nature
- ‘Contamination’ of non-GM crops
- Lack of public choice
- Allergic reactions
- Generation of ‘Super-weeds’
- Transfer of antibiotic resistance genes
- Re-activation of latent viruses
- Toxins
- Loss of diversity
- Poisoning / reduction of beneficial insects

Összegzés

- A növényi biotechnológia sokféle módon lehet hasznos.
- Sokféle hasznos tulajdonság bevihető így a különböző növényekbe.
- A GM növények haszna oly jelentős, hogy e technológia gyorsan elterjedt.
- A lehetséges hasznot és károkat minden egyes esetben függetlenül kell mérlegelni.