



Γενετική διόρθωση σε φυτικούς οργανισμούς
βασισμένη στην CRISPR – Cas τεχνολογία.
Περιγραφή της μεθόδου σε μοριακό επίπεδο
και τα οφέλη για το περιβάλλον

Στέλλα Ντόστα

ΑΜ: 7113102300001





Επισιτιστική
Ασφάλεια

Προστασία του
περιβάλλοντος



Υπερπληθυσμός

Αειφορική γεωργία

Κλιματική
Αλλαγή



Βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών

Ανάπτυξη τεχνολογιών για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των φυτών

Παραδοσιακές μέθοδοι

Επιλεκτικές διασταυρώσεις και υβριδοποιήσεις
Εκμετάλλευση φυσικών/επαγόμενων μεταλλάγων

Χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία

Γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί (GMOs)

Εισαγωγή ξένου γονιδίου για τη μεταβίβαση μιας επιθυμητής ιδιότητας με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* ή με τη μέθοδο βομβαρδισμού σωματιδίων (particle bombardment)

Χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία

Επιφυλάξεις για τις επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον

Αυστηροί κανονισμοί για τη καλλιέργειά τους

**Γονιδιωματική διόρθωση
- Genome Editing**

Γονιδιωματική διόρθωση - Genome Editing

Ακριβής και στοχευμένη
τροποποίηση σε γενετικούς τόπους

Νουκλεάσες με εξειδίκευση σε
συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο
(Sequence – specific nucleases, SSNs)

Εντοπισμός και πρόσδεση σε αλληλουχία-στόχο → Δημιουργία
δίκλωνου σπασίματος (Double-strand break, **DSB**)

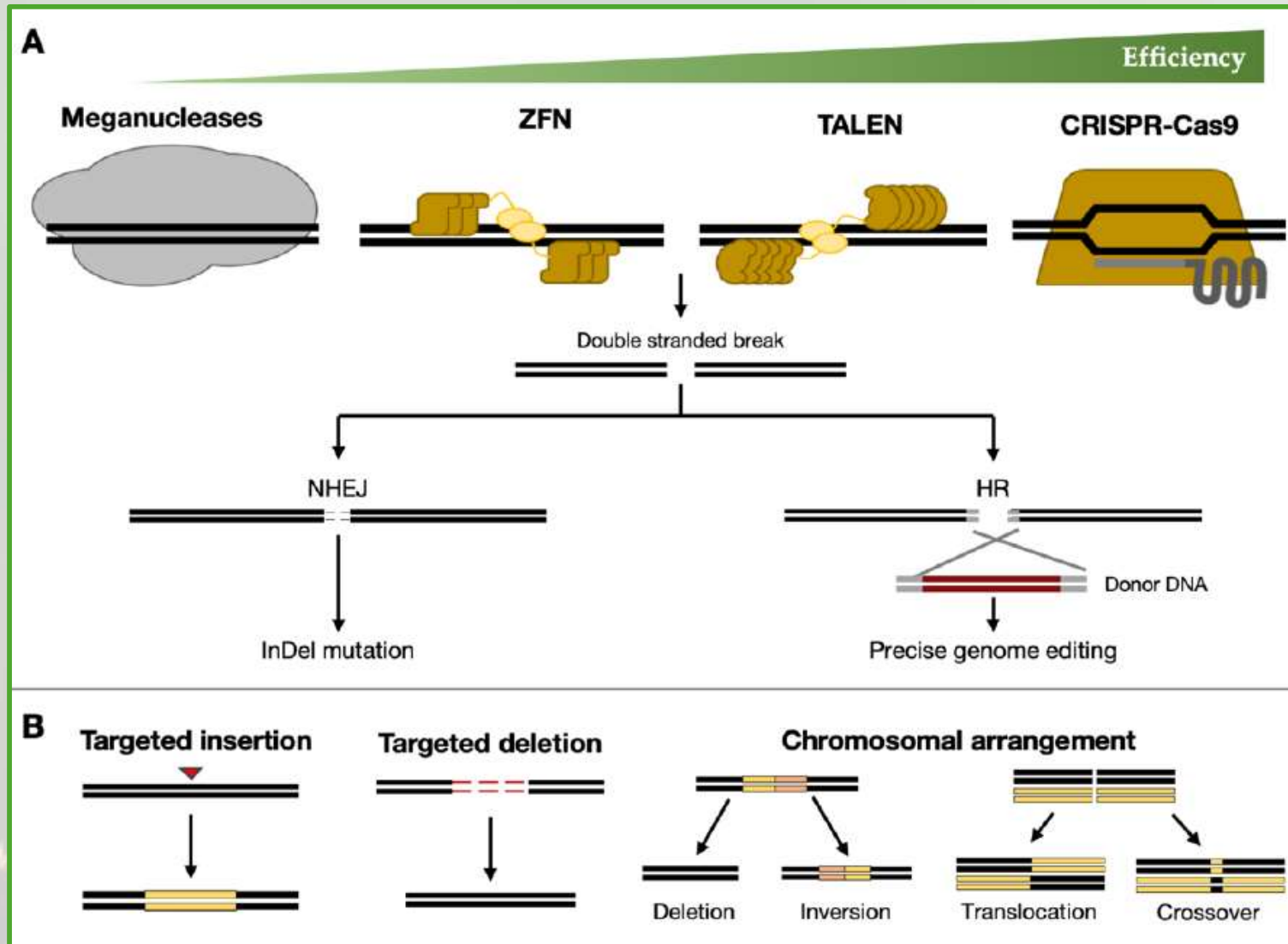
Ενεργοποίηση επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου

Homing endonucleases (HEs)
Zinc-finger nucleases (ZFNs)
Transcription activator-like effector
nuclease (TALENs)
CRISPR – Cas systems

Μη ομόλογη σύνδεση των άκρων
(non-homologous end-joining, NHEJ)

Ομόλογος ανασυνδυασμός
(homologous recombination, HR)

Γονιδιωματική διόρθωση - Genome Editing



Σύστημα CRISPR - Cas

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) with CRISPR – associated nuclease (Cas) systems

Μηχανισμοί προσαρμοστικής ανοσίας σε βακτήρια και αρχαία για τη προστασία έναντι ξένων γενετικών στοιχείων (ιοί και πλασμίδια)

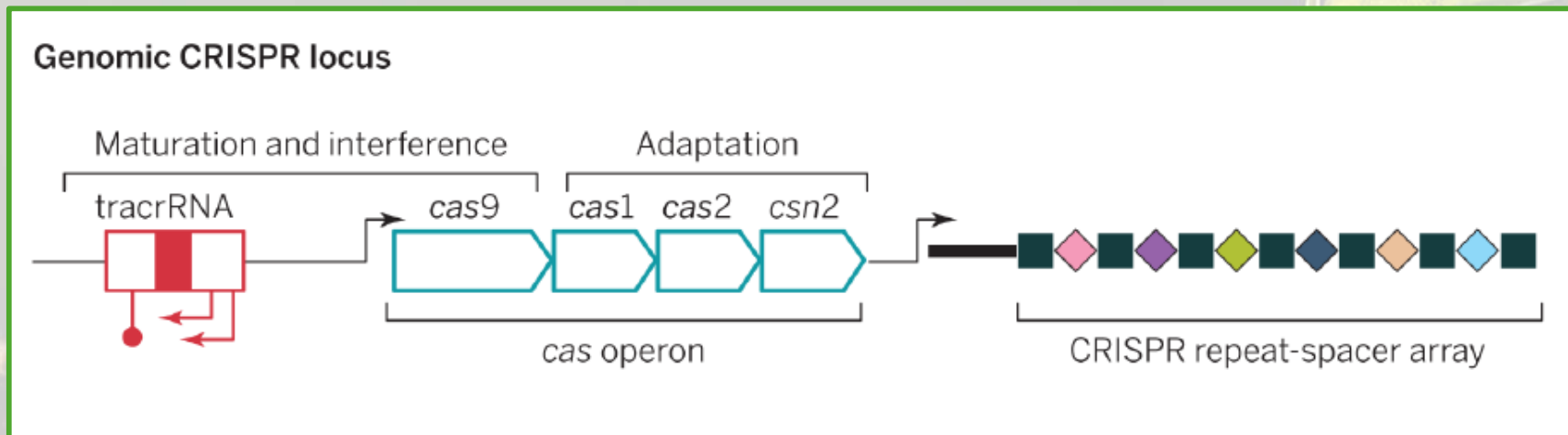
CRISPR → Γενετικός τόπος

1. Συστοιχία πανομοιότυπων επαναλήψεων που παρεμβάλλονται από μοναδικές αλληλουχίες στόχευσης του DNA του εισβολέα (**spacers**) που κωδικοποιούν τα στοιχεία του CRISPR RNA (**crRNA**)

CRISPR – Cas9 του *Streptococcus pyogenes*
→ Το πιο διαδεδομένο σύστημα

2. Οπερόνιο από cas γονίδια που κωδικοποιούν τα στοιχεία των Cas πρωτεϊνών

3. Αλληλουχία για το μη κωδικό trans-activating crRNA (tracrRNA)



Προσαρμοστική ανοσία

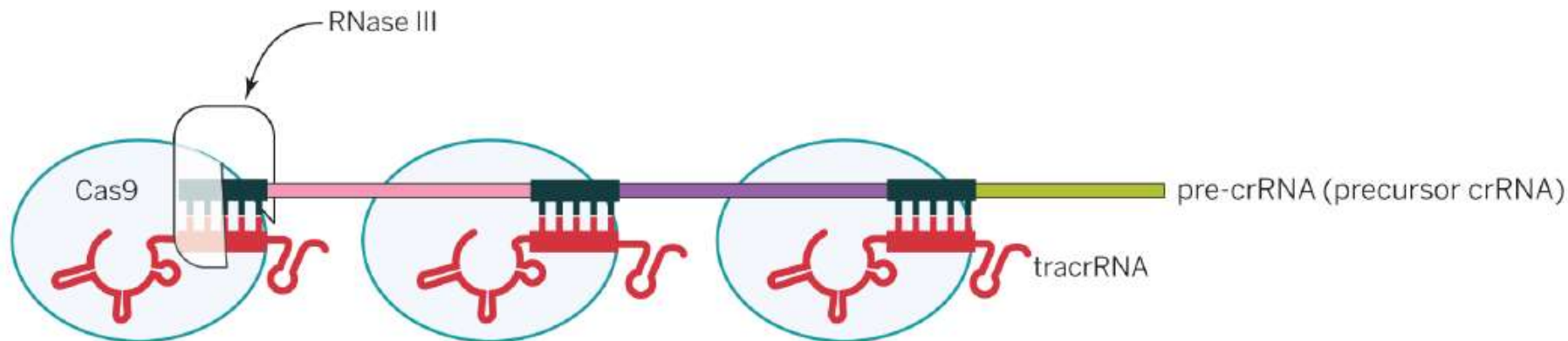
1. Προσαρμογή (Adaptation): Ενσωμάτωση ενός μικρού τμήματος DNA του εισβολέα ως spacer στη συστοιχία CRISPR στο γονιδίωμα του βακτηρίου

2. Έκφραση (Expression): Μεταγραφή του πρόδρομου crRNA (pre-crRNA) → παραγωγή ανεξάρτητων crRNAs + Έκφραση cas γονιδίων για τη παραγωγή νουκλεασών

tracrRNA: διευκολύνει την ωρίμανση του pre-crRNA σε διακριτά μόρια crRNAs με τη βοήθεια της Cas9 πρωτεΐνης και μιας RNAάσης III

crRNA: φέρει μια αλληλουχία 20-nt που καθοδηγεί την Cas9 πρωτεΐνη μέσω συμπληρωματικότητας βάσεων κατά Watson-Crick

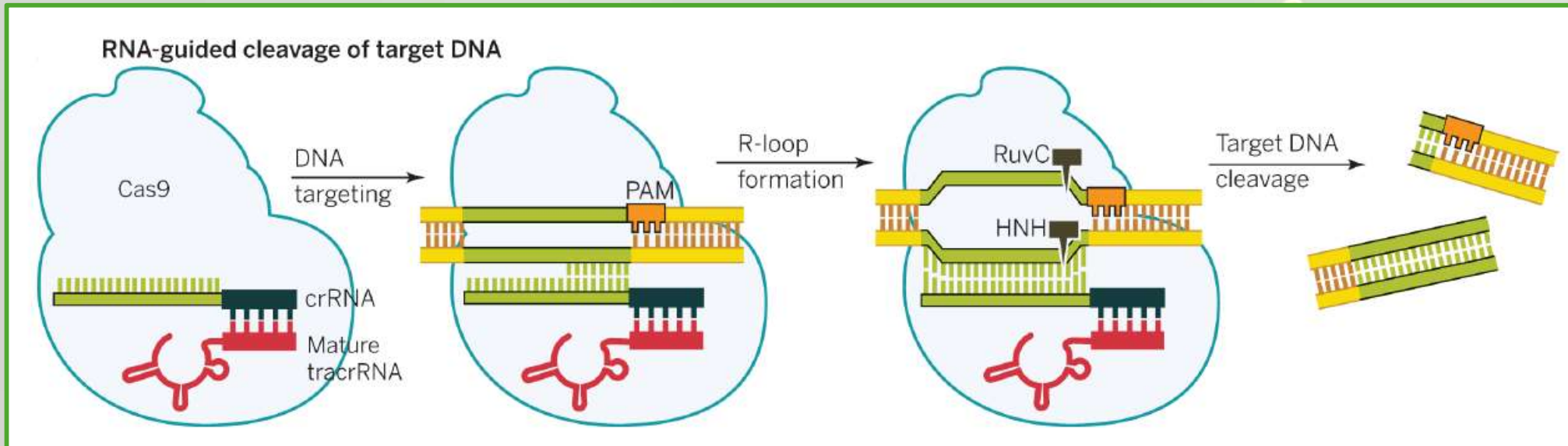
tracrRNA:crRNA co-maturation and Cas9 co-complex formation



Προσαρμοστική ανοσία

3. Παρέμβαση (Interference): Διάσπαση του DNA του εισβολέα από μια crRNA-καθοδηγούμενη Cas πρωτεΐνη, σε περιοχές συμπληρωματικές με την αλληλουχία του crRNA

<https://doi.org/10.1126/science.1258096>



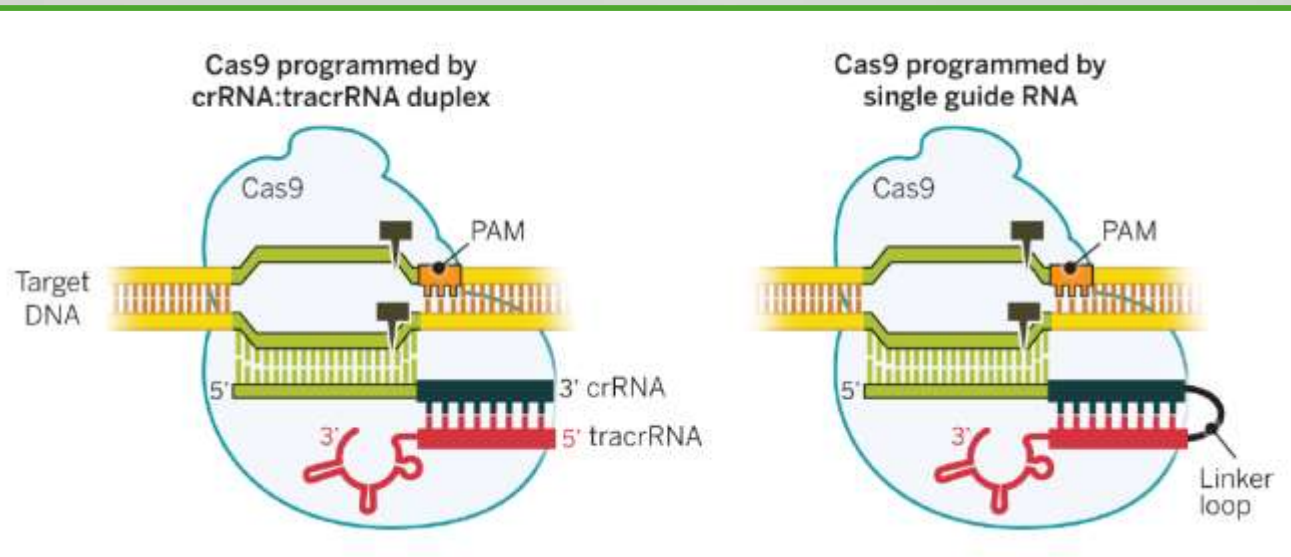
PAM (protospacer adjacent motif): αλληλουχία 3-6bp που αναγνωρίζεται από το σύμπλοκο Cas

RuvC - HNH: επικράτειες του ενζύμου με δράση νουκλεάσης που δημιουργούν το DSB

Σύστημα CRISPR – Cas9

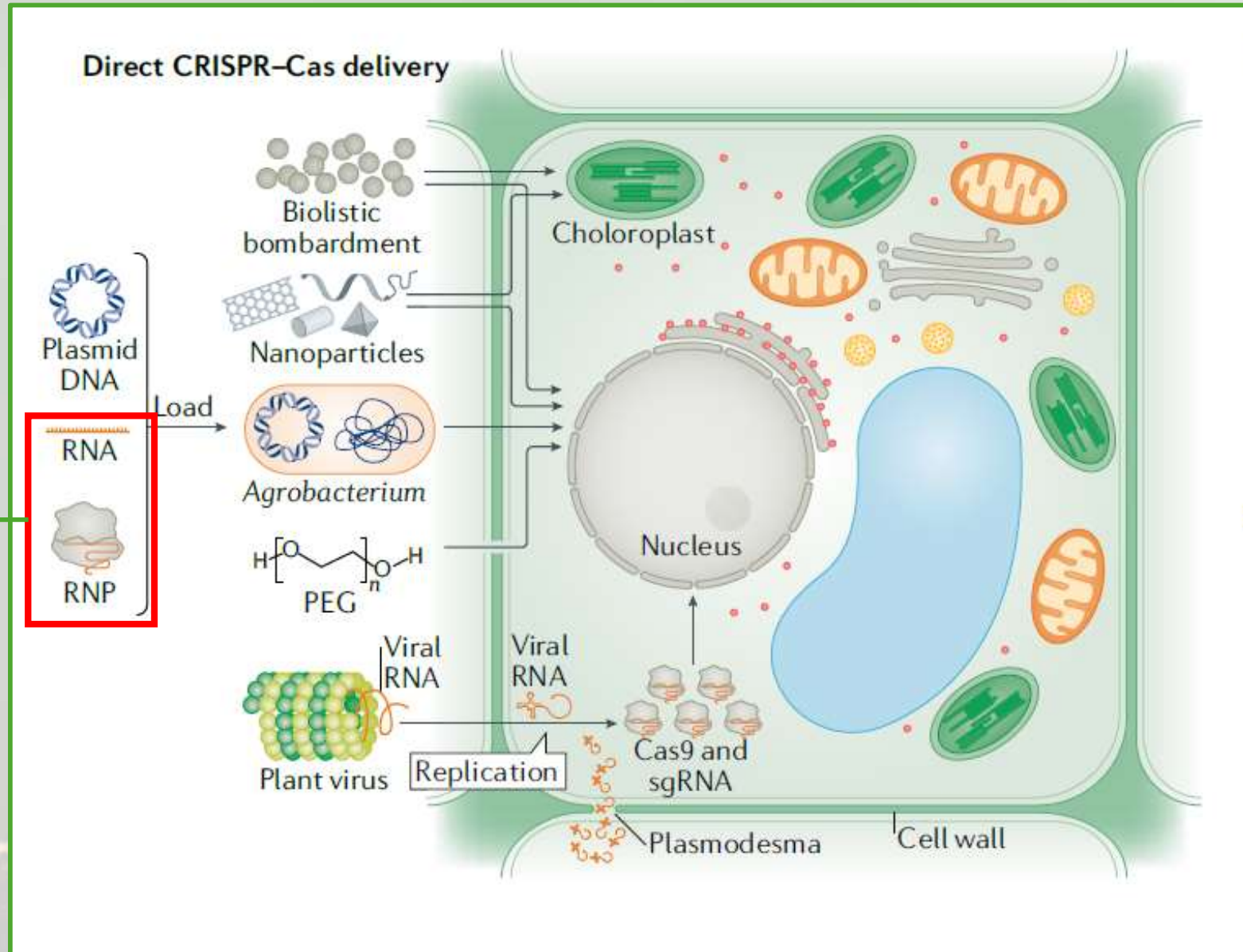
Εργαλείο gene editing με μόνο 2 στοιχεία:

1. Ένα χειμερικό single guide RNA (sgRNA) που προέκυψε από τη συγχώνευση των crRNA και tracrRNA
2. Τη πρωτεΐνη Cas9



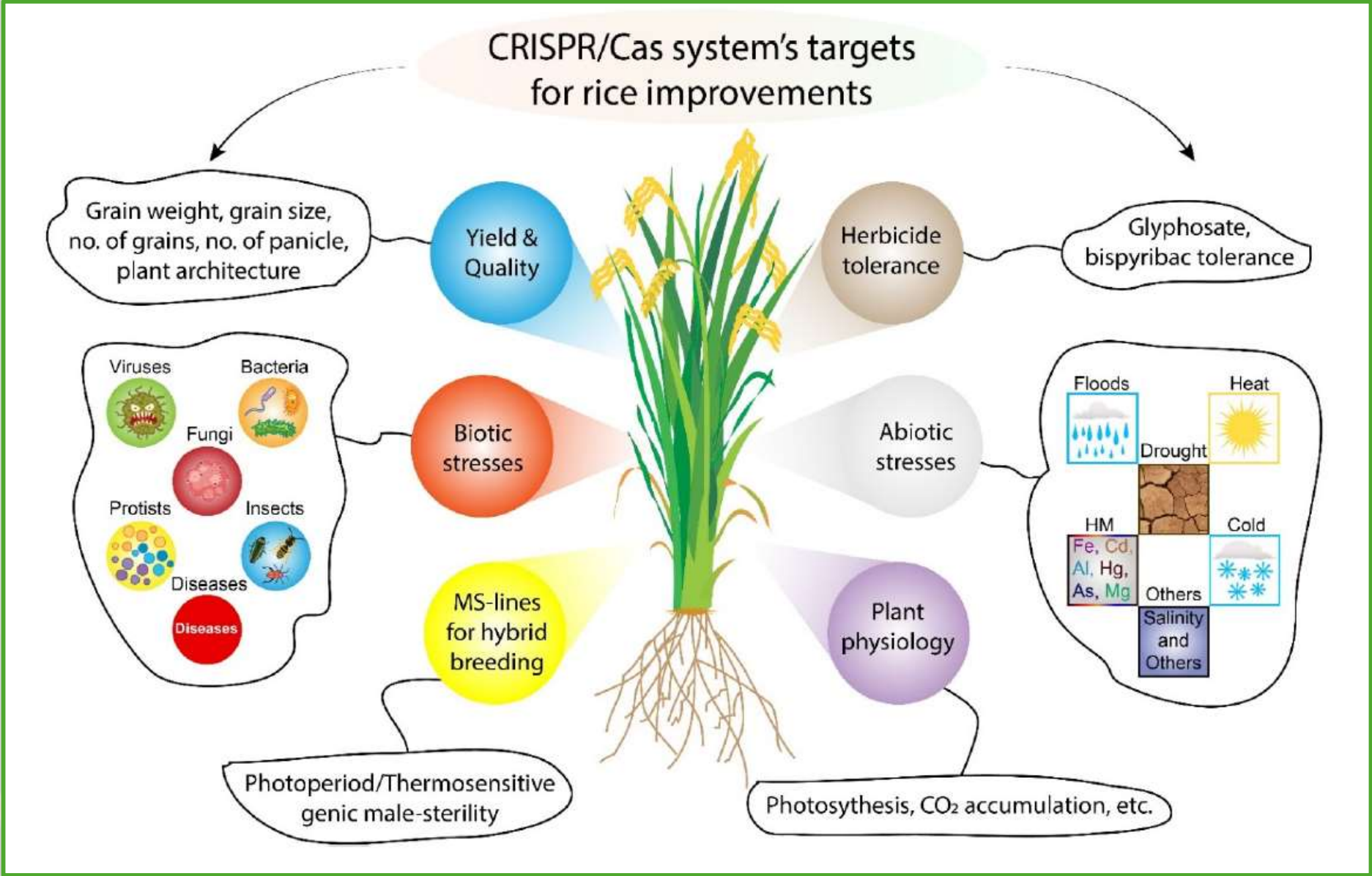
Το σύστημα CRISPR – Cas μπορεί να σχεδιαστεί για τη στοχευμένη δημιουργία DSB σε οποιασδήποτε αλληλουχία κοντά σε κατάλληλη αλληλουχία PAM με τη μεταβολή την αλληλουχίας 20-nt του sgRNA

Εισαγωγή του συστήματος CRISPR – Cas9 στο φυτικό κύτταρο



DNA-free genome editing

Εφαρμογές της CRISPR - Cas



Αβιοτικό στρες

Crop/Fruit/ Vegetable	Target gene	Trait Improvement
Maize	ARGOS8	Drought tolerance
Rice	OsNAC041	Salinity tolerance
Tomato	NPRI	Drought tolerance
Soybean	Drb2a and Drb2b	Salt and drought tolerance
Tomato	SIMAPK3	Drought tolerance
Tomato	SIAGL6	Heat stress
Soybean	SAPK1 and SAPK2	Salinity tolerance
Maize	ZmHKT1	Salinity tolerance
Rice	OsMPK2, OsPDS, OsBADH2	Multiple-stress tolerance

Βιοτικό στρες

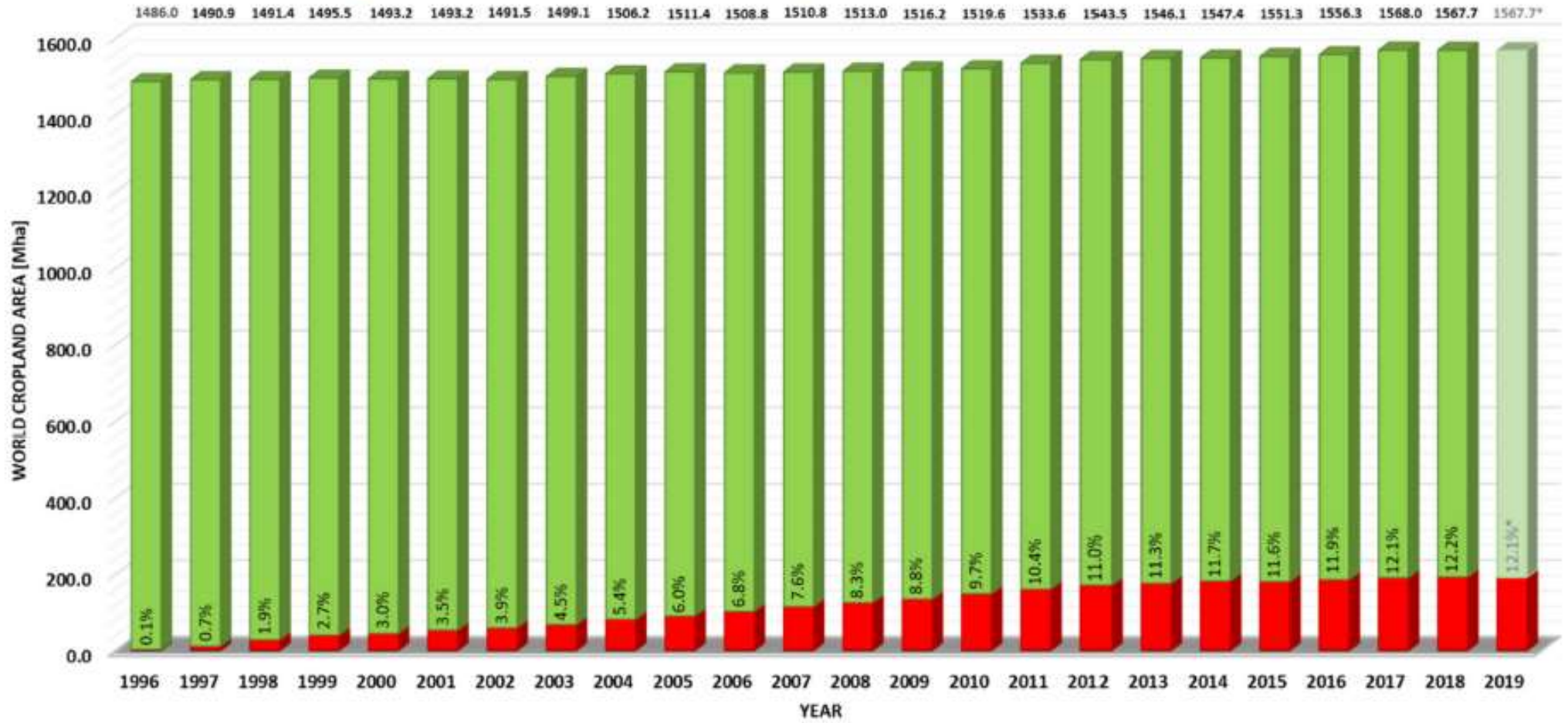
Crop/Fruit/Vegetable	Target gene	Trait Improvement
Citrus (orange)	CsLOB1 (promoter)	Citrus canker resistance
Cucumber	eIF4E	Broad virus resistance
Tobacco	43 regions in the viral genome	Resistance to the Gemini virus beet severe curly top virus
Tobacco	Six regions in the viral genome	Resistance to the Gemini virus bean yellow dwarf virus
Tomato	Three regions in the viral genome	Resistance to the Gemini virus Resistance to the tomato yellow leaf curl virus
Tomato	SlMlo1	Resistance to powdery mildew
Wheat	MLO-A1, TaMLO-B1 and TaMLO-D1	Resistance to powdery mildew
Grape	VvPDS, MLO-7	Powdery mildew resistance
Wheat	TaMLO	Powdery mildew resistance
Potato	S-genes	Phytophthora infestans resistance
Cotton	Viral and satellite DNAs	Resistance to cotton leaf curl disease

Βελτίωση απόδοσης και ποιότητας

Crop/Fruit/ Vegetable	Target gene	Trait Improvement
Wheat	PDS	Chlorophyll syn
Cotton	ALARP	Cotton fiber development
Rice	Waxy	Enhanced glutinosity
Rice	OsTB1	High grain yield
Maize	PPR, RPL	Reduced zein protein
Potato	GBSS	Enhance amylose content
Carrot	DcPDS, DcMYB113	Purple depigmented carrot
Cabbage	Bolc.GA4.a	Dwarfing and fruit dehiscence
Apple	PDS, TFL1	Albino phenotype, early flowering
Maize	CLE	Grain yield
Tomato	SLIAA9	Seedless fruit

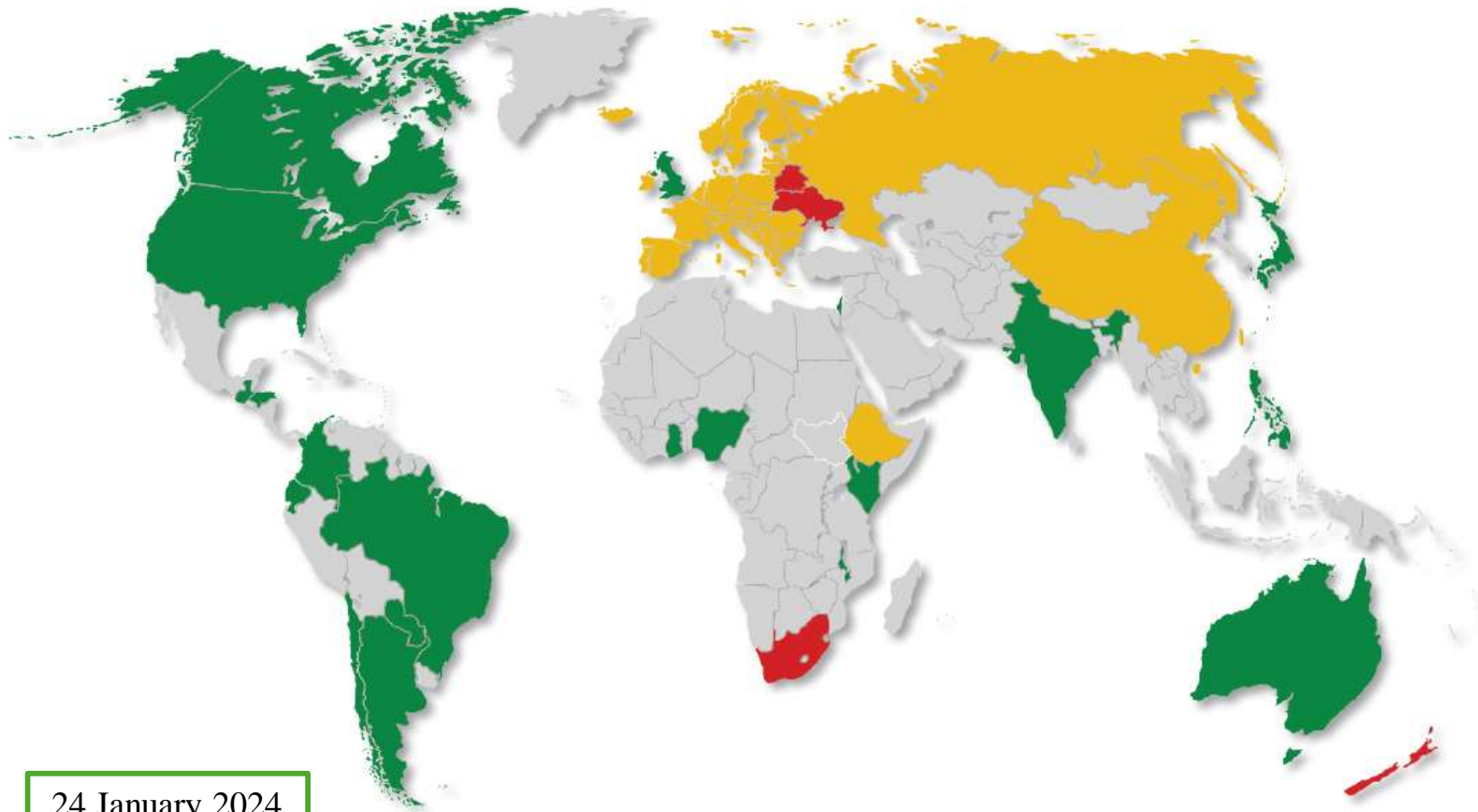
APPLICATION OF GENOME-EDITED CROPS IN THE WORLD

■ Cropland area planted with genome-edited crops ■ Cropland area planted with conventional crops



GLOBAL REGULATORY LANDSCAPE FOR GENE-EDITED CROPS

Established regulatory criteria for new breeding innovations in different world regions in the past decade



Countries where products are likely to be regulated as conventional new varieties after recent regulatory policy updates.

Countries where there are noticeable policymaking discussions over proposals to treat SDN1 as conventional new varieties.

Countries where SDN1 products should be treated as GMO according to court interpretations based on old regulations.

24 January 2024

New genomic techniques (NGTs) approved in EU

Μέχρι πρόσφατα τα GE φυτά (gene-edited plants) στην Ευρωπαϊκή Ένωση θεωρούνταν ως γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί και υπάγονταν στην ίδια αυστηρή νομοθεσία

5 Ιουλίου 2023

Proposal on New Genomic Techniques (NGTs) από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για ξεχωριστή κατηγοριοποίηση των GE φυτών από τα GMOs

24 Ιανουαρίου
2024

Η πρόταση για τις NGTs εγκρίθηκε από την Περιβαλλοντική Επιτροπή του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου (ENVI)

7 Φεβρουαρίου
2024

Η πρόταση για τις NGTs εγκρίθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο

Τα φυτά που παράγονται με τις NGTs με βάση τη νέα πρόταση θα χωριστούν σε δύο κατηγορίες:

1. NGT 1 plants: Περιορισμένες αλλαγές στο γονιδίωμα, κυρίως μιμούνται φυσικές γενετικές παραλλαγές → Ισοδύναμα με τα συμβατικά, **θα εξαιρούνται από τη νομοθεσία των GMOs**
2. NGT 2 plants: Πιο εκτεταμένες αλλαγές στο γονιδίωμα ή εισαγωγή ξένων γονιδίων → θα εντάσσονται στη κατηγορία των GMOs

Here's How

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR-Cas Works

for advanced plant breeding



DNA

is the instruction manual for the growth and development of all living organisms

/ˌdeɪˈenˈɑː/
NOUN BIOCHEMISTRY

deoxyribonucleic acid, a self-replicating material present in all living organisms as the main constituent of chromosomes. It is the carrier of genetic information.

DNA Breaks & Repairs Happen in Nature



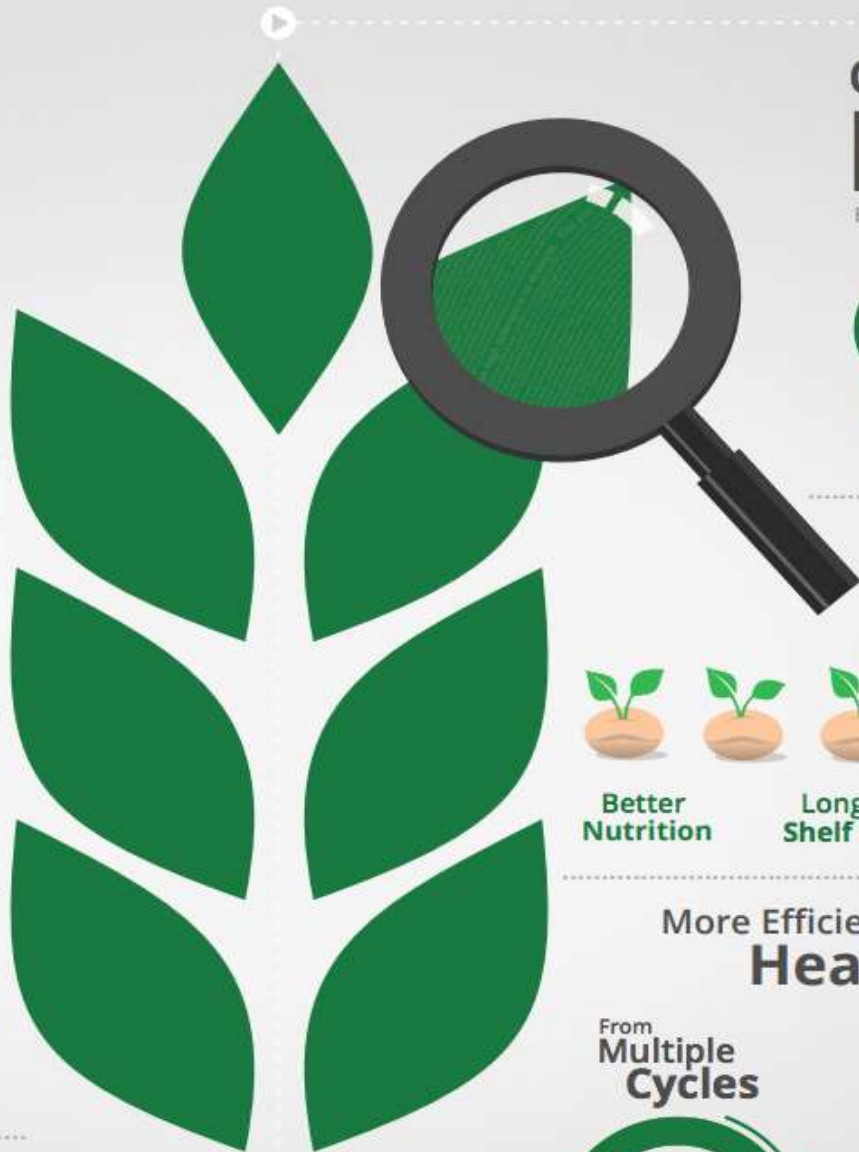
SCIENTISTS HAVE DEVELOPED A DEEP UNDERSTANDING OF THE

Genetic & Physical Attributes

WITHIN PLANTS

CRISPR-Cas DIRECTS DNA BREAKS & REPAIRS TO

Create Specific Outcomes



CRISPR-Cas Reads the DNA of a Plant

BASED ON HOW CRISPR-CAS IS PROGRAMMED, IT FINDS A SPECIFIC LOCATION IN THE GENOME AND EITHER,



DELETES



EDITS



REPLACES

TARGETED GENETIC SEQUENCES

Grower & Consumer Benefits



Better Nutrition

Longer Shelf Life

Disease Resistance

Drought Tolerance

Higher Yields

More Efficient Development of Healthy Seed Products

From Multiple Cycles

To 1-2 Cycles

Reduced Timeline in Years



SAME FIELD TESTING

crisprcas.pioneer.com

