



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Σύγχρονες Τεχνικές Βιο-ανάλυσης στη Γεωργία και το Περιβάλλον

Βιοτεχνολογία και Βελτιστοποιημένα Φυτικά Προϊόντα

Κ. Παπαδοπούλου

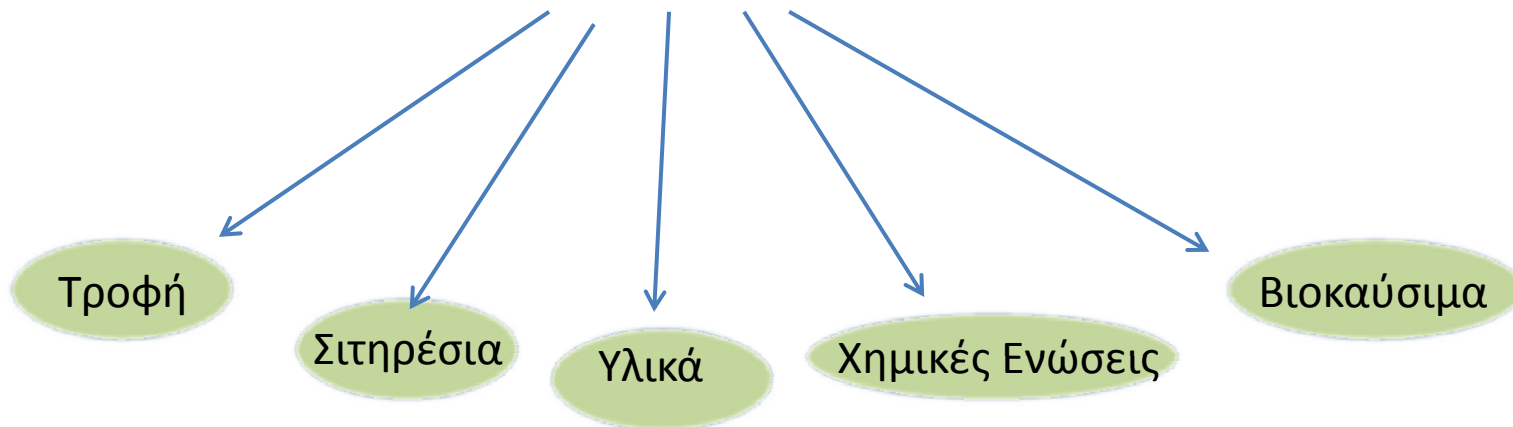
Προγράμμα Επικαιροποίησης Γνώσεων Αποφοίτων ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Η γεωργία είναι μια παγκόσμια «βιομηχανία»

Παραγωγικότητα φυτών - δυναμικό του φυτού:

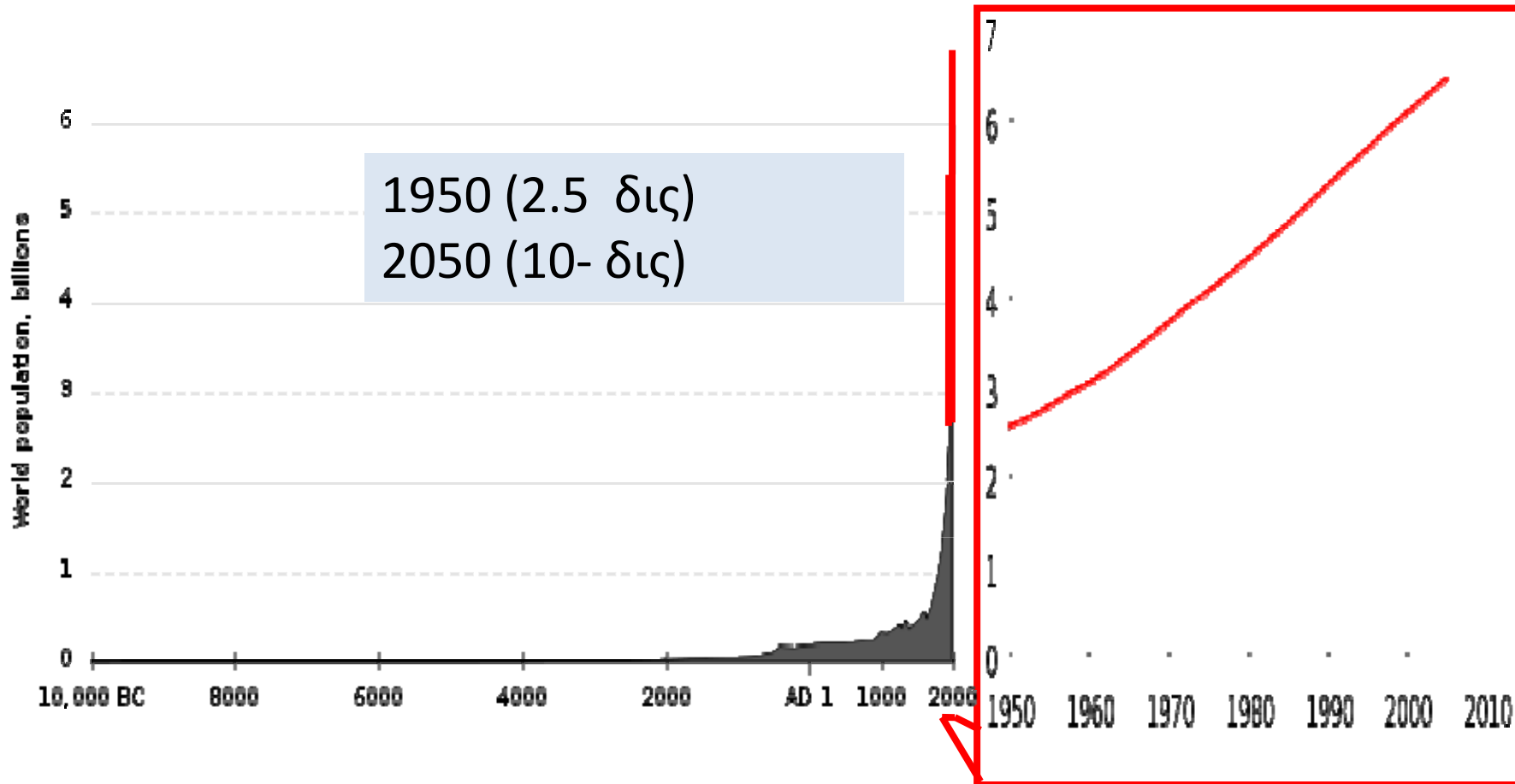


Επιστήμη των Φυτών και Προκλήσεις του 21^{ου} Αιώνα

- ❖ Εξασφάλιση τροφής για την καλύψη της ταχύτατης αύξησης του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού
- ❖ Αύξηση της φυτικής παραγωγής υπό τα δεδομένα της κλιματικής αλλαγής με μείωση των εισροών στη γεωργία (κλιματική αλλαγή-προστασία περιβάλλοντος)
- ❖ Εξασφάλιση επαρκούς ή/και ενισχυμένης τροφής για μείωση της εμφάνισης χρόνιων ασθενειών στον πλανήτη (υγεία)
- ❖ Ανάγκη για παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές (αιιφορία και περιβάλλον)
- ❖ Παραγωγή βιοπροϊόντων αυξημένης προστιθέμενης αξίας



Αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού παγκοσμίως.



Πώς αναμένεται να επιτευχθεί αύξηση της φυτικής παραγωγής / βιομάζας;

Με την ανάπτυξη/δημιουργία φυτών που

- είναι ανθεκτικά στην ξηρασία ή σε άλλες καταπονήσεις
- απαιτούν λιγότερες εισροές και νερό
- είναι ανθεκτικά σε παθογόνα / εχθρούς
- είναι πιο θρεπτικά



Πρώτες καλλιέργειες

- Τεχνητή Επιλογή από το ~9.000 π.Χ.

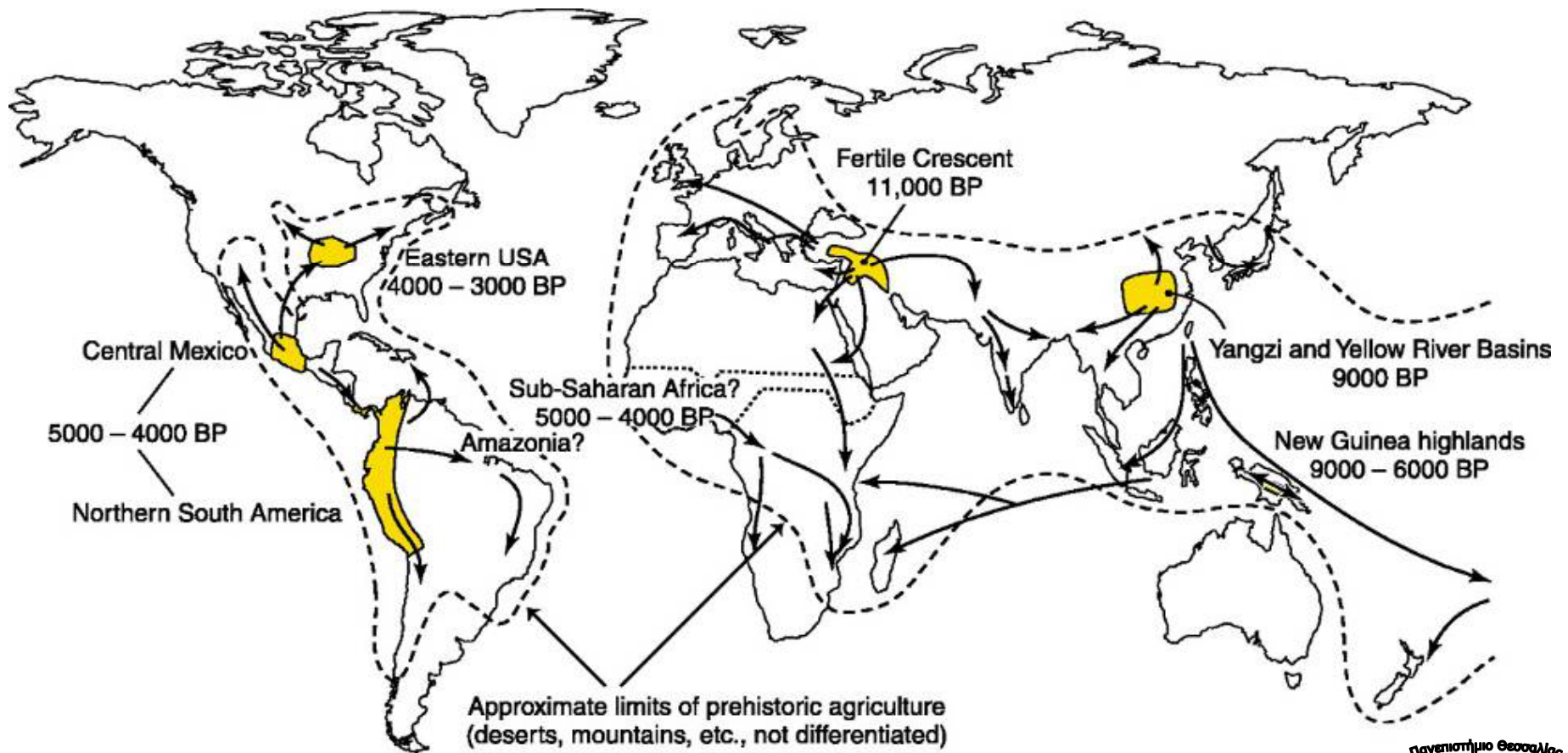


Βελτίωση φυτών

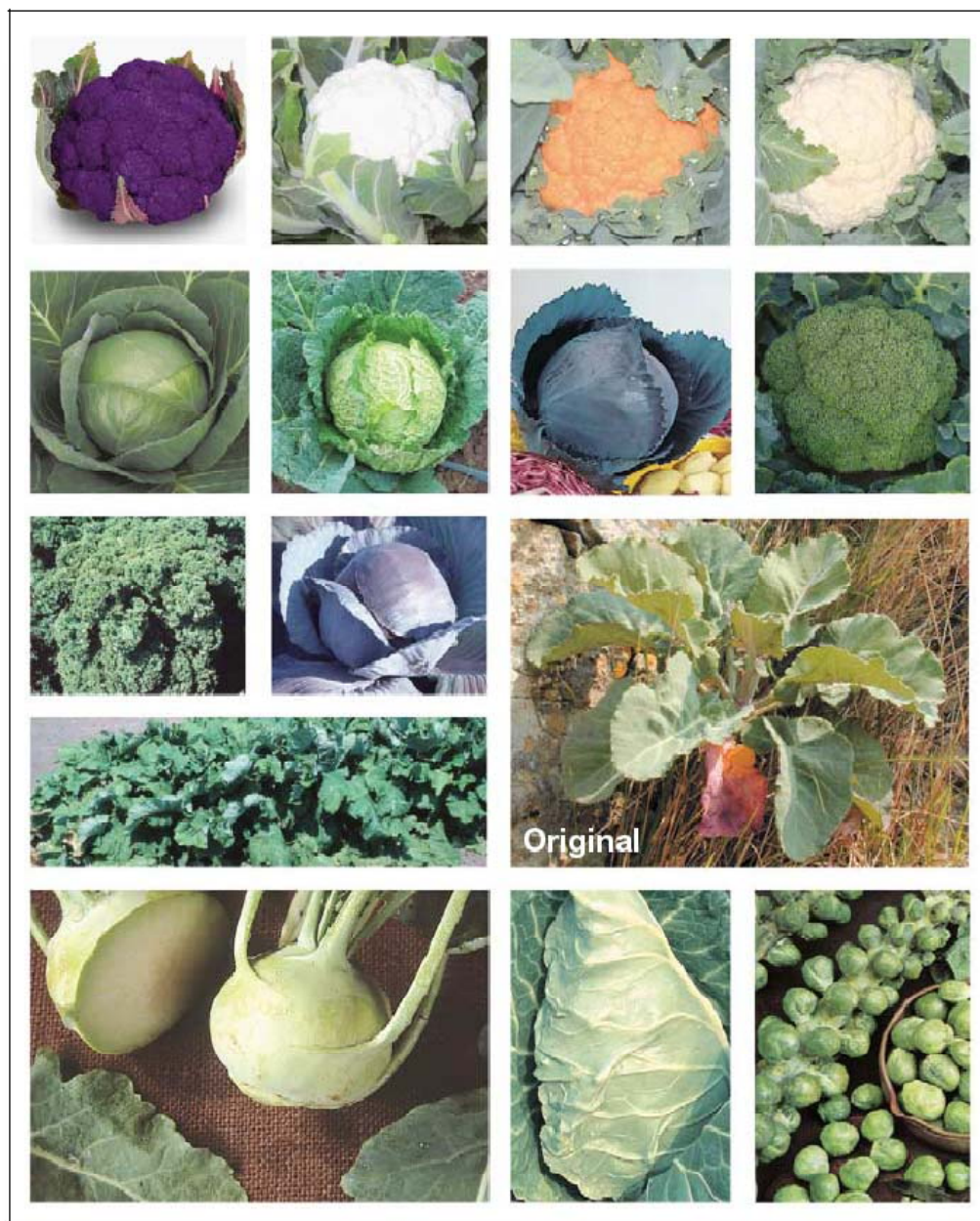
- Στρατηγικές τροποποίησης γονιδιωμάτων
- Κλασική Βελτίωση
 - Επιλογή επιθυμητών χαρακτηριστικών (πληθυσμιακή γενετική)
 - Εισαγωγή νέων γονιδιακών χαρακτήρων
 - Τεχνολογίες υβριδισμού
 - Διασταυρούμενη επικονίαση
 - Ιστοκαλλιέργεια (σύντηξη πρωτοπλαστών)
- Μοριακή Βελτίωση
- Τεχνολογίες μεταφοράς DNA



Καταγωγή των καλλιεργειών



Τεχνητή επιλογή στην οικογένεια Brassicaceae



...στην ντομάτα

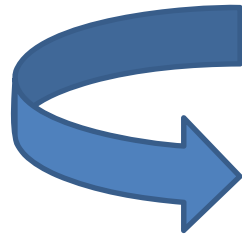


...στην πιπεριά





Οι έρευνες του Mendel αποτελούν την επαρχή της επιστήμης της γενετικής και της βελτίωσης των φυτών



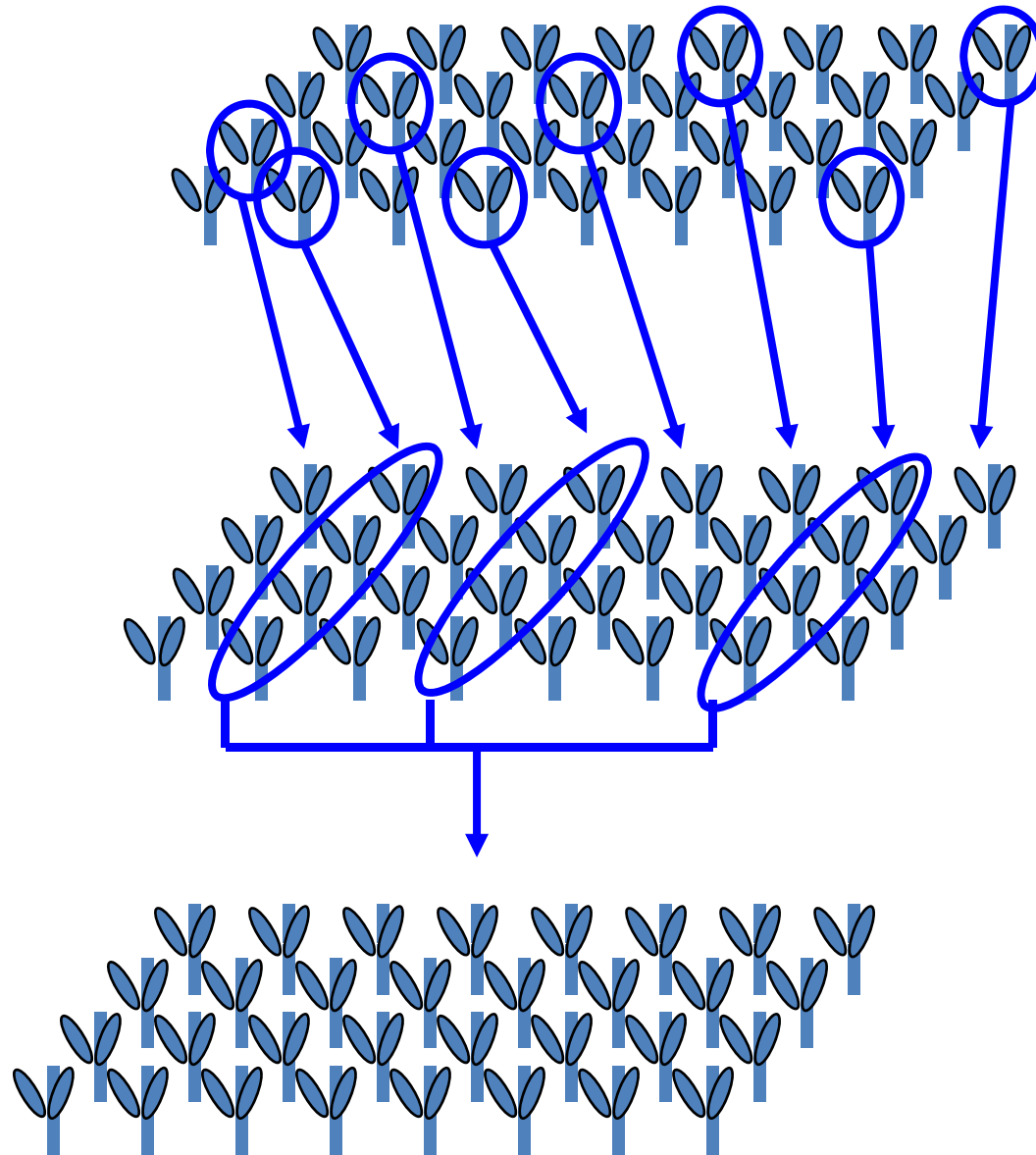
ΠΡΑΣΙΝΗ ΕΠΑΝΑΣΤΑΣΗ
(1940-1960)



[Norman Borlaug](#)
1914-2009,
Nobel Laureate
1970



Υπάρχουν πολλές
τεχνικές κλασικής
βελτίωσης



- πχ: Mass selection



Περιορισμοί της τεχνητής επιλογής

- Περιορίζεται στα γενετικά χαρακτηριστικά που υπάρχουν ήδη στα καλλιεργούμενα είδη
- Μείωση της ευρωστίας των ομόζυγων και inbreeding



Βελτίωση φυτών

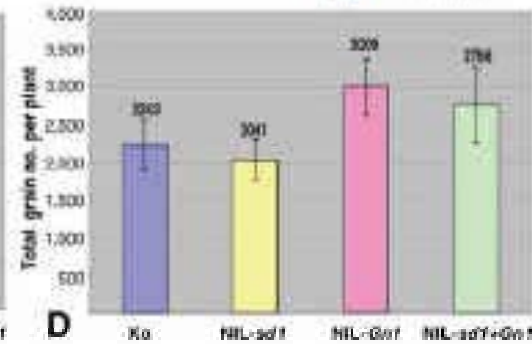
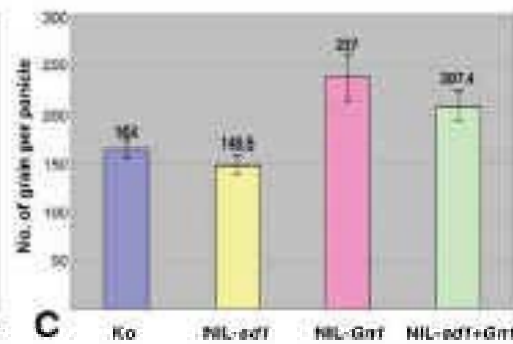
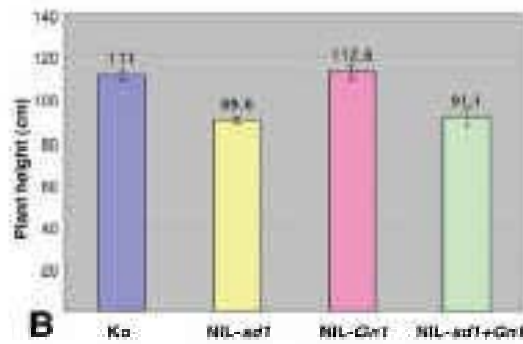
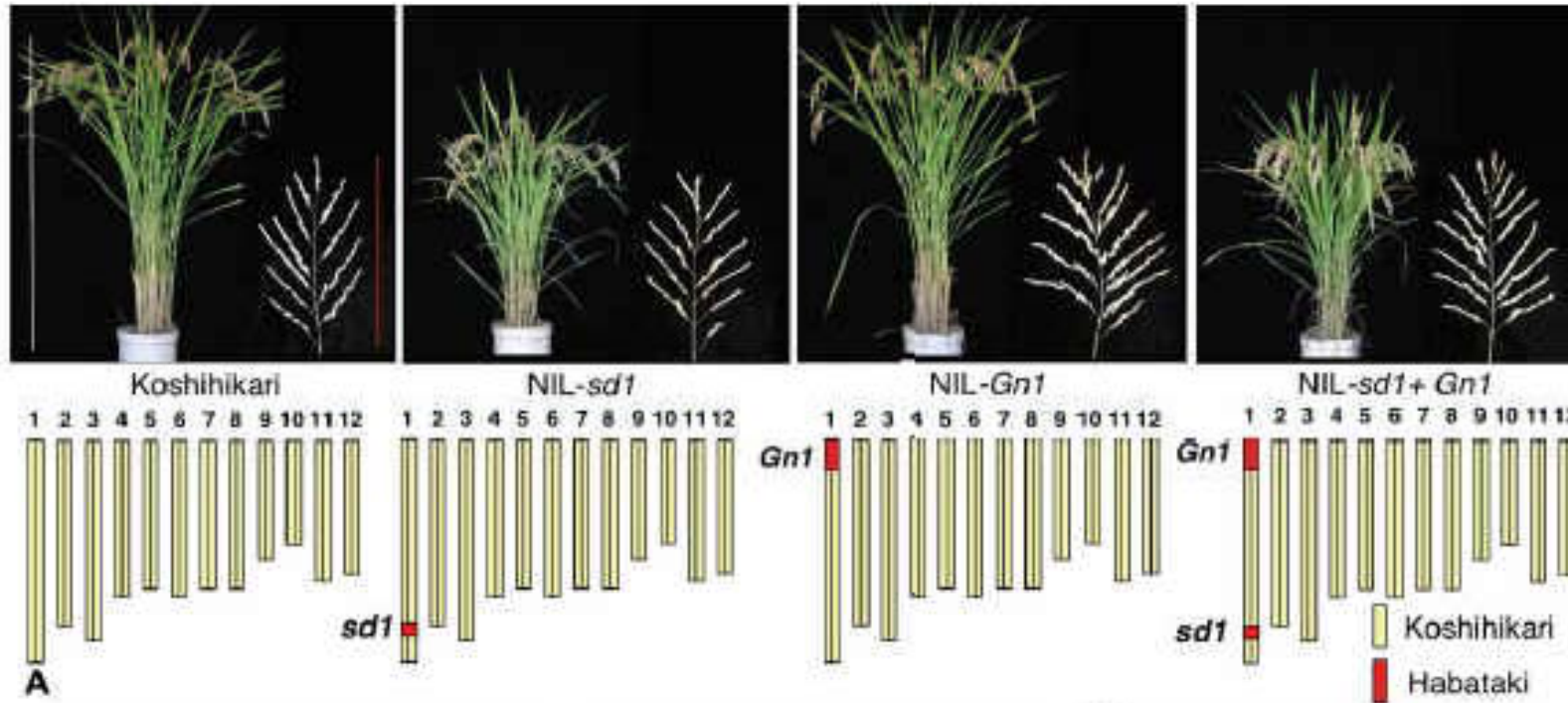
- Στρατηγικές τροποποίησης γονιδιωμάτων
- Κλασική Βελτίωση
 - Επιλογή επιθυμητών χαρακτηριστικών (πληθυσμιακή γενετική)
 - Εισαγωγή νέων γονιδιακών χαρακτήρων
 - Τεχνολογίες υβριδισμού
 - Διασταυρούμενη επικονίαση
 - Ιστοκαλλιέργεια (σύντηξη πρωτοπλαστών)
- Μοριακή Βελτίωση
- Τεχνολογίες μεταφοράς DNA



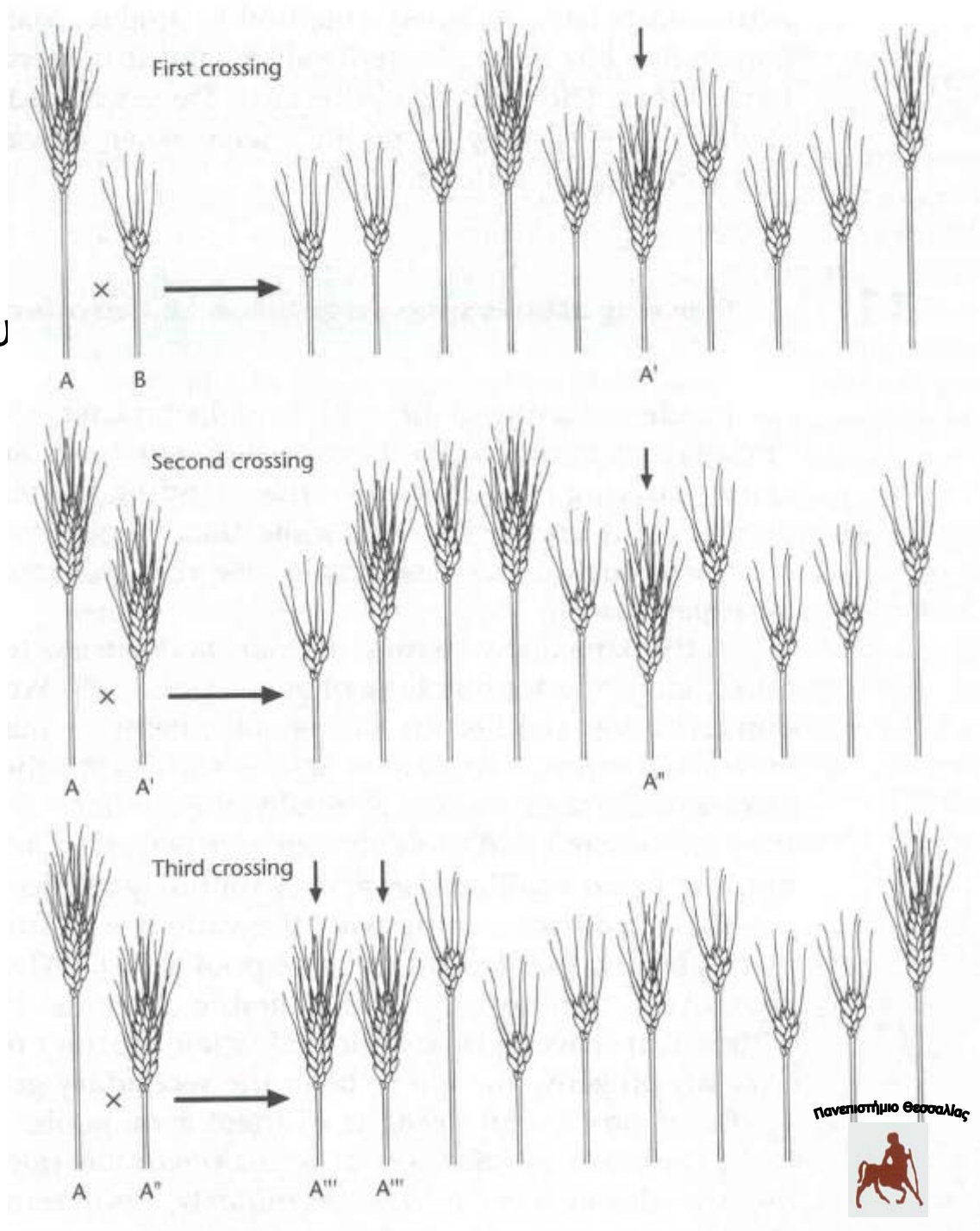
Εισαγωγή νέων χαρακτήρων: Υβριδισμός

- Κατευθυνόμενες διασταυρώσεις (σταυροεπικονίαση)
 - Καλλιεργούμενη ποικιλία με ένα γονέα
 - Συγγενικές ποικιλίες ή είδη με επιθυμητά χαρακτηριστικά





Διασταυρώσεις με τον ένα γονέα για τη μεταφορά του επιθυμητού χαρακτήρα



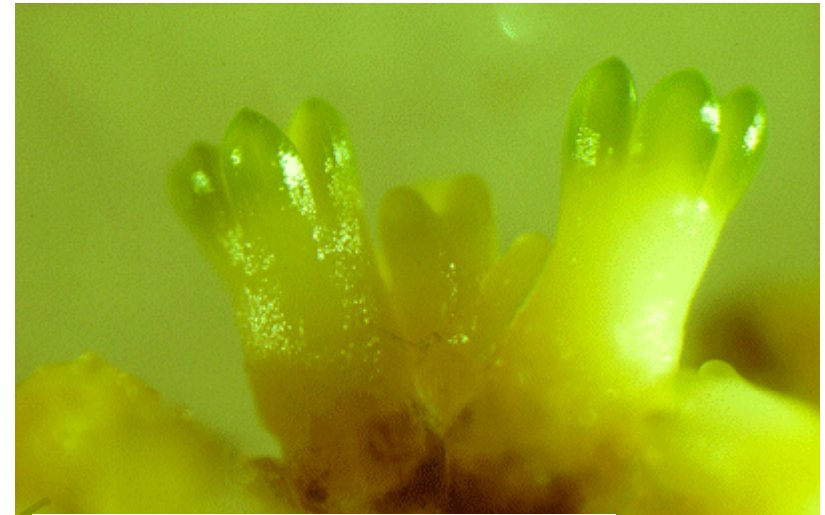
Περιορισμοί του υβριδισμού

- Περιορίζεται σε φυτά που μπορούν αν υβριδιστούν στη φύση
 - Διασταυρώσεις σε στενά συγγενικά είδη
 - Διασταυρώσεις σε απομακρυσμένα γενετικώς είδη
 - Μικρή παραγωγή σπερμάτων
 - Τα υβρίδια είναι συχνά στείρα
- Μεταφορά και μη επιθυμητών χαρακτήρων (λόγω σύνδεσης)



Εισαγωγή νέων χαρακτήρων: Υπέρβαση των αναπαραγωγικών φραγμών

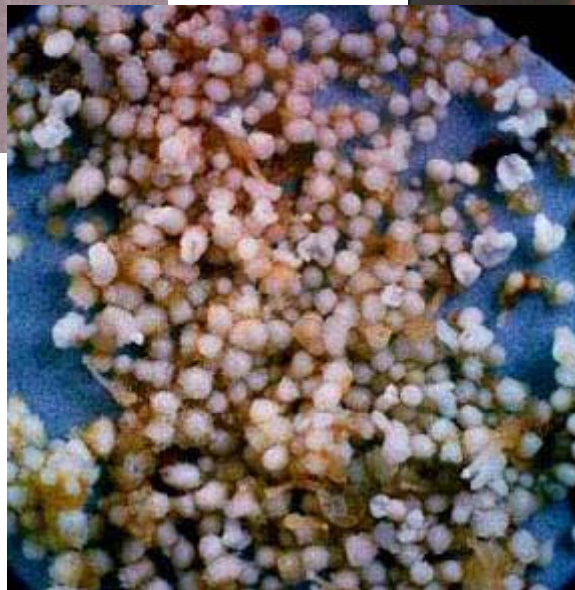
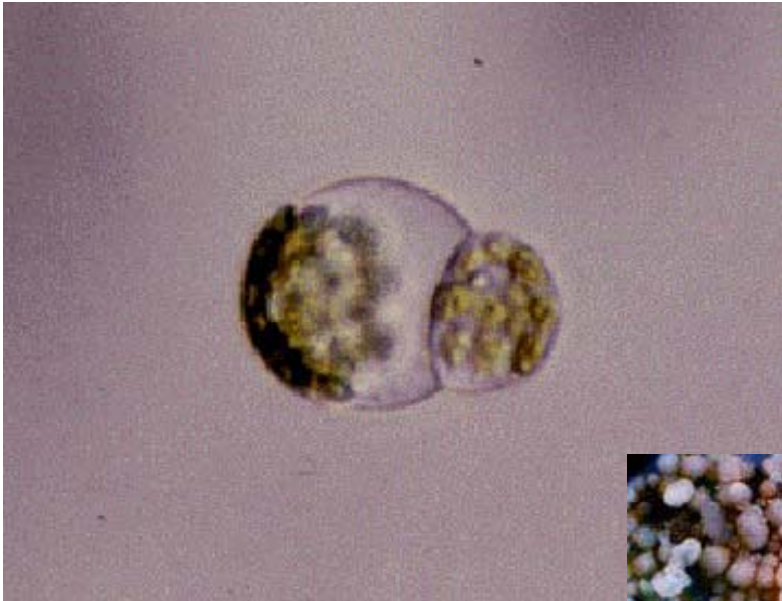
- Καλλιέργειες φυτικών κυττάρων
 - Διάσωση εμβρύου
 - Σύντηξη πρωτοπλαστών
 - Μικροπολλαπλασιασμός



Σωματικά έμβρυα, Sitka spruce



Σύντηξη πρωτοπλαστών



The Journal of Heredity 67:123–128. 1976.

Interspecific Hybridization by Protoplast Fusion in *Nicotiana*

Confirmation and extension

H. H. SMITH, K. N. KAO, AND N. C. COMBATTI

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Interspecific protoplast fusion for the transfer of atrazine resistance from *Solanum nigrum* to tomato (*Lycopersicon esculentum* L.).

Jain, S. M., E. A. Shahin, and S. Sun. 1988. **Interspecific protoplast fusion for the transfer of atrazine resistance from *Solanum nigrum* to tomato (*Lycopersicon esculentum* L.).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **12**: 189-192.

Atrazine resistance was successfully transferred from *S. nigrum* ($2n = 4x = 48$) to tomato cv. VF36 by protoplast fusion in the following combinations: (1) *S. nigrum* with tomato; (2) UV-irradiated *S. nigrum* with tomato; (3) UV-irradiated *S. nigrum* with iodoacetate treated tomato; and (4) backfusion of tomato with a somatic hybrid. In all, 6 somatic hybrids were identified by their glutamate aspartic aminotransferase [aspartate aminotransferase] isoenzyme banding patterns. The fusion hybrid from variant 4 exhibited a new isoenzyme band with a mobility (Rf) value of 0.41. Results from this hybrid indicated that the *S. nigrum* genome was partially eliminated and the tomato genome partially transferred. It is thought that several backfusions may result in an atrazine resistant tomato plant with no *S. nigrum* genome.



«Wide crosses» ανάμεσα σε είδη εντελώς
απομακρυσμένα γενετικά: μέσω σύντηξης πρωτοπλαστών
και αναγέννηση ιστών

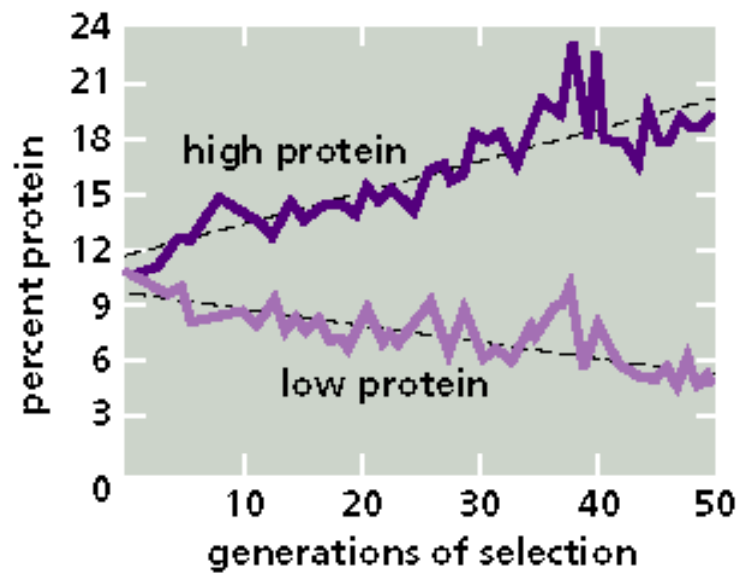
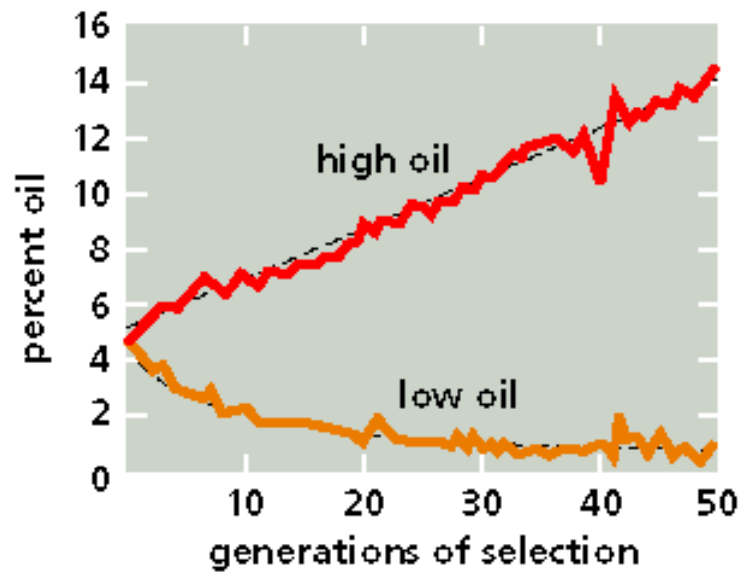


Brassica juncea (Pb^t) x *Thlaspi caerulescens* (Zn^t & Ni^t)





Επιλογή επιθυμητών γενετικών χαρακτήρων



Ανάπτυξη ποικιλιών ρυζιού κατά την Πράσινη επανάσταση



Αρχικές ποικιλίες- πατρικά φυτά
woo-gen (δεξιά)
dee-geo-woo-gen, το οποίο είχε την *sd1*
μετάλλαξη



Rice Domestication by Reducing Shattering

Changbao Li, Ailing Zhou, Tao Sang*

Crop domestication frequently began with the selection of plants that did not naturally shed ripe fruits or seeds. The reduction in grain shattering that led to cereal domestication involved genetic loci of large effect. The molecular basis of this key domestication transition, however, remains unknown. Here we show that human selection of an amino acid substitution in the predicted DNA binding domain encoded by a gene of previously unknown function was primarily responsible for the reduction of grain shattering in rice domestication. The substitution undermined the gene function necessary for the normal development of an abscission layer that controls the separation of a grain from the pedicel.

Cereals, the world's primary food, were domesticated from wild grass species. Because wild grasses naturally shed mature grains, a necessary early step toward cereal domestication was to select plants that could hold on to ripe grains to allow effective field harvest (1, 2) (fig. S1). The selection process might have been mainly unconscious because grains that did not fall as easily had a better chance of being harvested and planted in the following years. Consequently, nonshattering alleles had an increased frequency and eventually replaced the shattering alleles during domestication. The finding that one locus accounted for

Two previous QTL studies using crosses between *O. sativa* ssp. *indica* and the wild perennial species *O. rufipogon* detected four and five shattering QTL (8, 9). Both studies identified a QTL at the same location of *sh4* with either the largest or nearly largest phenotypic effect among the detected QTL. Moreover, genetic analyses between *O. sativa* ssp. *japonica* and *O. rufipogon* and two other closely related wild species *O. glumaepetala* and *O. meridionalis* all found that a single dominant allele from each of the three wild species was responsible for grain shattering (10, 11). This locus, named *Sh3*, was mapped to the same

evaluation. By progressively examining SSR and SNP (single-nucleotide polymorphism) markers between RC4-123 and RM280, we finally mapped the mutation responsible for the derivation of nonshattering in cultivated rice to a 1.7-kb region of a gene with a previously unknown function (Fig. 1B and table S1). The gene is predicted to be a transcription factor, and its coding region is physically located between 34,014,305 and 34,012,126 base pairs (bp) on assembly LOC_Os04_g57530 of rice chromosome 4 (The TIGR Rice Genome Annotation Database).

The comparison of the 1.7-kb sequences between the mapping parents revealed seven mutations (Fig. 1C). These include one mutation in the intron: (a) a 1-bp substitution; three mutations in the first exon: (b) a 15-bp or five-amino acid insertion/deletion, (c) a 3-bp or one-amino acid insertion/deletion, and (d) a 1-bp or an amino acid substitution; and three mutations 5' upstream of the start codon: (e) a 1-bp substitution at site -55, (f) a 3-bp insertion/deletion between sites -343 and -344, and (g) an 8-bp insertion/deletion between sites -558 and -559.

To assess the polymorphism and evolutionary direction of these mutations, we sequenced this 1.7-kb region from an additional 14 rice cultivars representing the diversity of *O. sativa* (14), 21 accessions of *O. nivara* covering the

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Μοριακή Γενετική – Μοριακοί Δείκτες (marker-assisted selection)

χρησιμοποιεί τους μοριακούς δείκτες: συνηθέστερα είναι ένα τμήμα DNA ή και μια χημική «ετικέτα» (tag) που συσχετίζεται με ένα επιθυμητό χαρακτήρα

✓ επιλογή χαρακτηριστικών-στόχων με μικρή κληρονομησιμότητα ή υπολλειπόμενα γονίδια

✓ σύγχρονη μεταφορά πολλών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το ίδιο ή παρόμοια χαρακτηριστικά σε μία («πυραμίδα γονιδίων»- gene pyramiding).



Δημιουργία ποικιλιών ρυζιού ανθεκτικών σε κατάκλιση

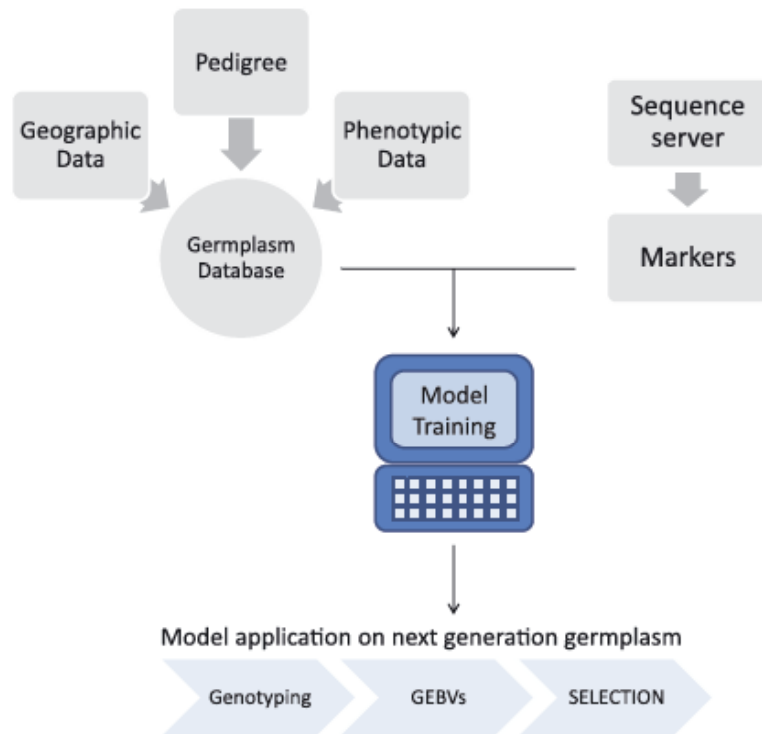


Julia Bailey-Serres et al, 2010, Rice Submergence Tolerant Rice: SUB1's Journey from Landrace to Modern Cultivar



Σύγχρονα συστήματα μοριακής βελτίωσης

Γονιδωματική Επιλογή (Genomic / Genome-wide Selection GWS)



αναλύονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και οι μοριακοί δείκτες σε **ολόκληρο το γονιδίωμα μεμονωμένων φυτικών σειρών** και κατόπιν γίνεται πρόβλεψη για τους απογόνους ενός πληθυσμού βελτίωσης

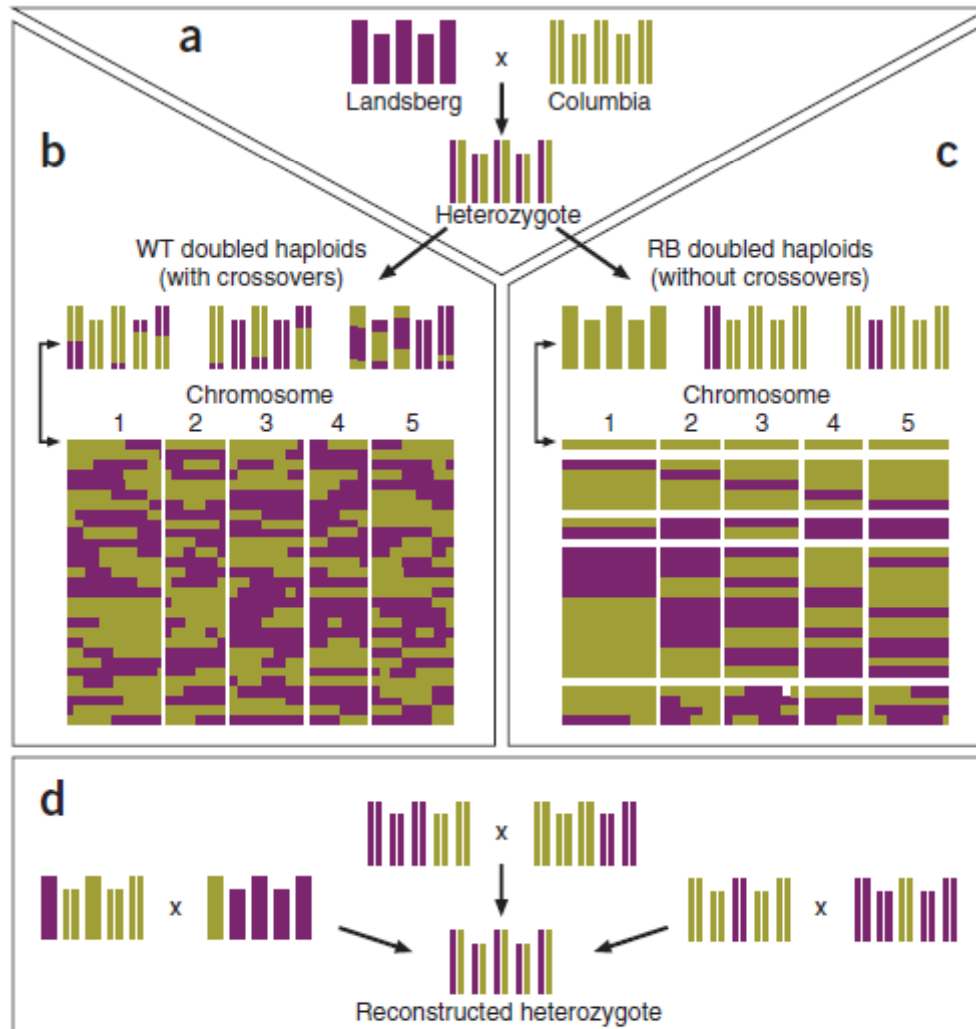
Figure 1. Schematic diagram depicting the steps involved in the use of genomic selection in a plant breeding program.

GEBVs, genomic estimated breeding values.

Carbera-Bosquet et al, 2012



Ανάστροφη βελτίωση



A) Δημιουργία ενός ετεροζυγώτη όπου η ικανότητα μειωτικών ανασυνδυασμών είναι κατασταλμένη
(β) Γενοτύπος δι-απλοειδών με παρουσία μη ανασυνδυασμένων χρωμοσωμάτων
(Γ) Γενότυπος 21 διαφορετικών γενοτύπων με πλήρη απουσία ανασυνδυασμών



High-throughput Phenotyping (Phenomics)

αυτοματοποιημένες τεχνολογίες καταγραφής των
φαινοτύπων σε μεγάλη κλίμακα

www.lemnatec.com

www.phenofab.com



Διερεύνηση της γενετικής βάσης των φαινοτύπων σε φυσικούς πληθυσμούς

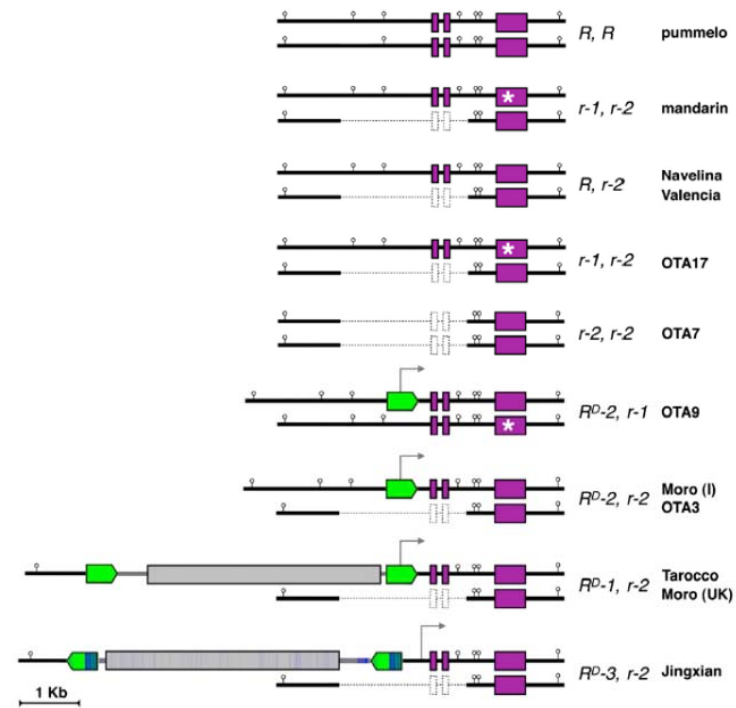


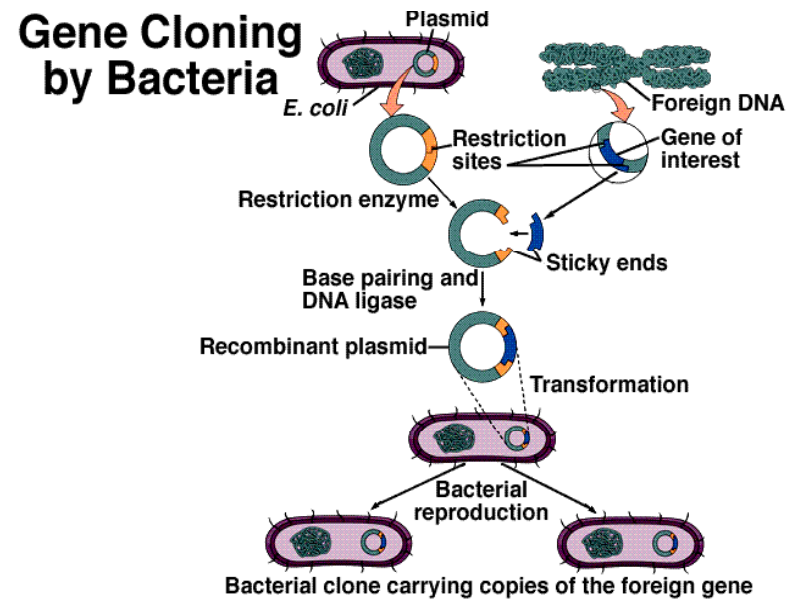
Figure 6. Maps of Structures of the Ruby Locus in the Different Citrus Species, Orange Accessions, and Hybrids.

Butelli et al, 2012 The Plant Cell, Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges

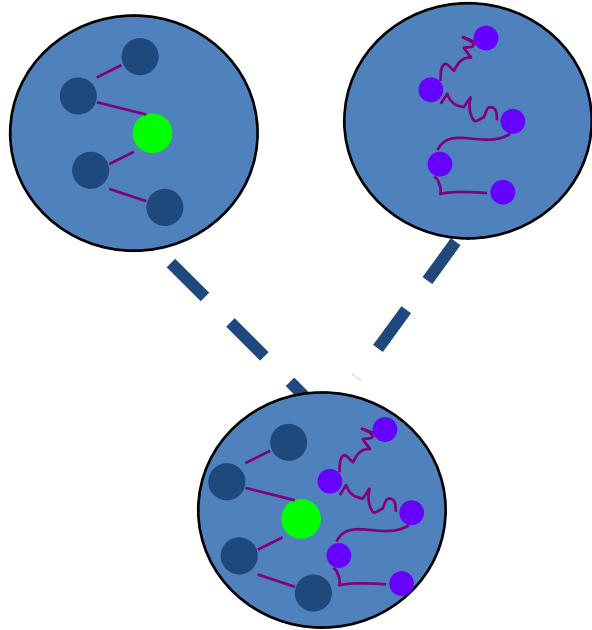


Εισαγωγή νέων χαρακτήρων: Υπέρβαση των αναπαραγωγικών φραγμών

Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου DNA και γενετική μηχανική

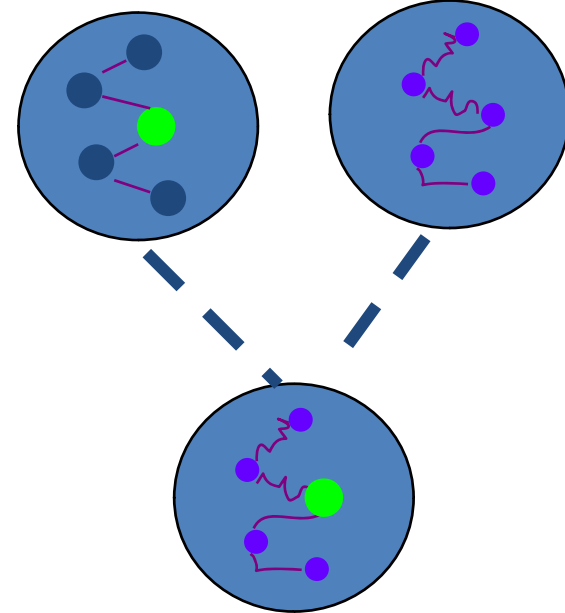


Wild Relative Crop Plant



Conventional Breeding

Wild Relative Crop Plant



Genetic Engineering



Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και βελτίωση φυτών

- Μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλα τα είδη φυτών
- Επιτρέπει την άμεση μεταφορά μεμονωμένων επιθυμητών γονιδίων
- Απαιτεί μια μέθοδο μεταφοράς των γονιδίων στα φυτικά κύτταρα
- Απαιτεί κύτταρα που θα μπορούν να επαναδημιουργήσουν ένα ολόκληρο φυτό από μεμονωμένα γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα

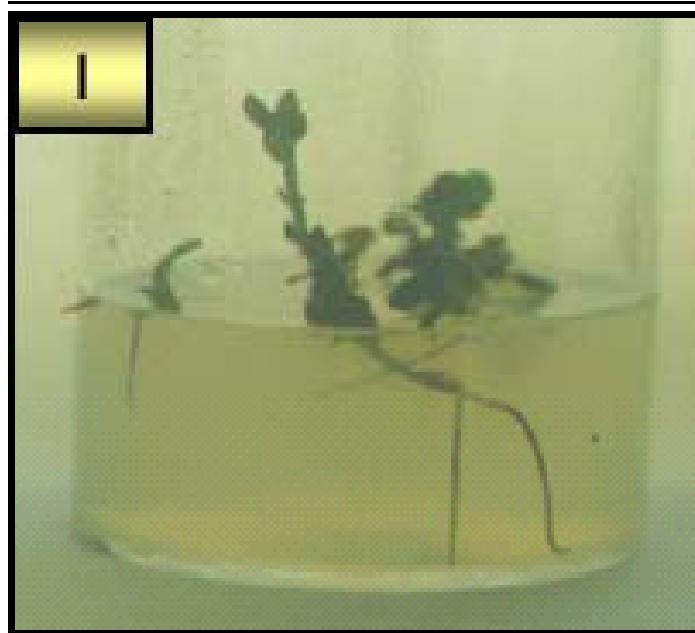


Ολοδυνητικότητα (totipotency):

Όλα τα φυτικά κύττρα διατηρούν το γενετικό τους δυναμικό και υπό τις κατάλληλες συνθήκες μπορούν να το εκφράσουν. Είναι δηλαδή δυνατόν να αποδιαφοροποιηθούν και να παράγουν όλους τους κυτταρικούς τύπους και άρα να αναπτυχθούν εκ νέου σε πλήρες φυτό.



Ιστοκαλλιέργεια – Κυτταροκαλλιέργεια φυτών



Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιέργειας φυτών

Βασικά συστατικά

[1] απαραίτητα στοιχεία ή μεταλλικά ιόντα (συνήθως με τη μορφή σύμπλοκων μειγμάτων αλάτων)

Μακροστοιχεία (άζωτο, κάλιο, μαγνήσιο, φωσφορος, ασβέστιο, θείο, χλώριο)

Ιχνοστοιχεία (μαγγάνιο, ιώδιο, χαλκός, μολυβδένιο, ψευδάργυρος, σίδηρος)

[2] οργανικά συμπληρώματα/ αυξητικοί παράγοντες (βιταμίνες-θειαμίνη, ινοσιτόλη, αμινοξέα, πεπτόνες, ορμόνες, IAA, INA)

[3] πηγή άνθρακα (συνήθως σουκρόζη αλλά και γλυκόζη, μαλτόζη, σορβιτόλη, γαλακτόζη)



Φυτο-αυξητικοί ρυθμιστές

Ανάλογα με τη φυσιολογική τους δράση διακρίνονται σε:

[1] αυξίνες (κυτταροδιαίρεση και αύξηση- επιμήκυνση βλαστών και ριζών/επαγωγή άνθησης/ αύξηση μεγέθους καρπών/ καθορισμός φύλου)

[2] κυτοκινίνες (κυτταροδιαίρεση)

[3] γιββεριλλίνες (κυτταρική επιμήκυνση- καθορισμός ύψους φυτού/ επαγωγή καρποφορίας)

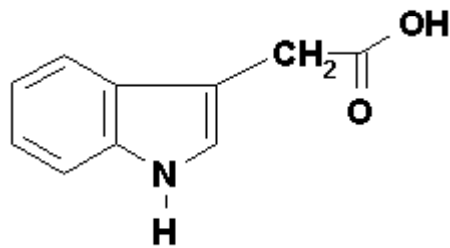
[4] αμπσιζικό οξύ (αυξητικοί αναστολείς) (αναστολή κυτταροδιαίρεσης-αποκοπή φύλλων και καρπών)

[5] αιθυλένιο (έλεγχος ωρίμανσης καρπών, λήθαργος)



Κύριες Φυτοορμόνες

αυξίνες



Παραγωγή κυρίως σε ακραία
μεριστώματα

ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ

Δομικά όμοιες με αδεΐνη



Zentia

Παραγωγή κυρίως σε αυξανόμενους
φυτικούς ιστούς, ρίζες, έμβρυα,
καρποί

αυξίνη < ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗ → βλαστοί

ΑΥΞΙΝΗ > κυτοκίνη → ρίζες

αυξίνη = κυτοκίνη → απο-διαφοροποίηση

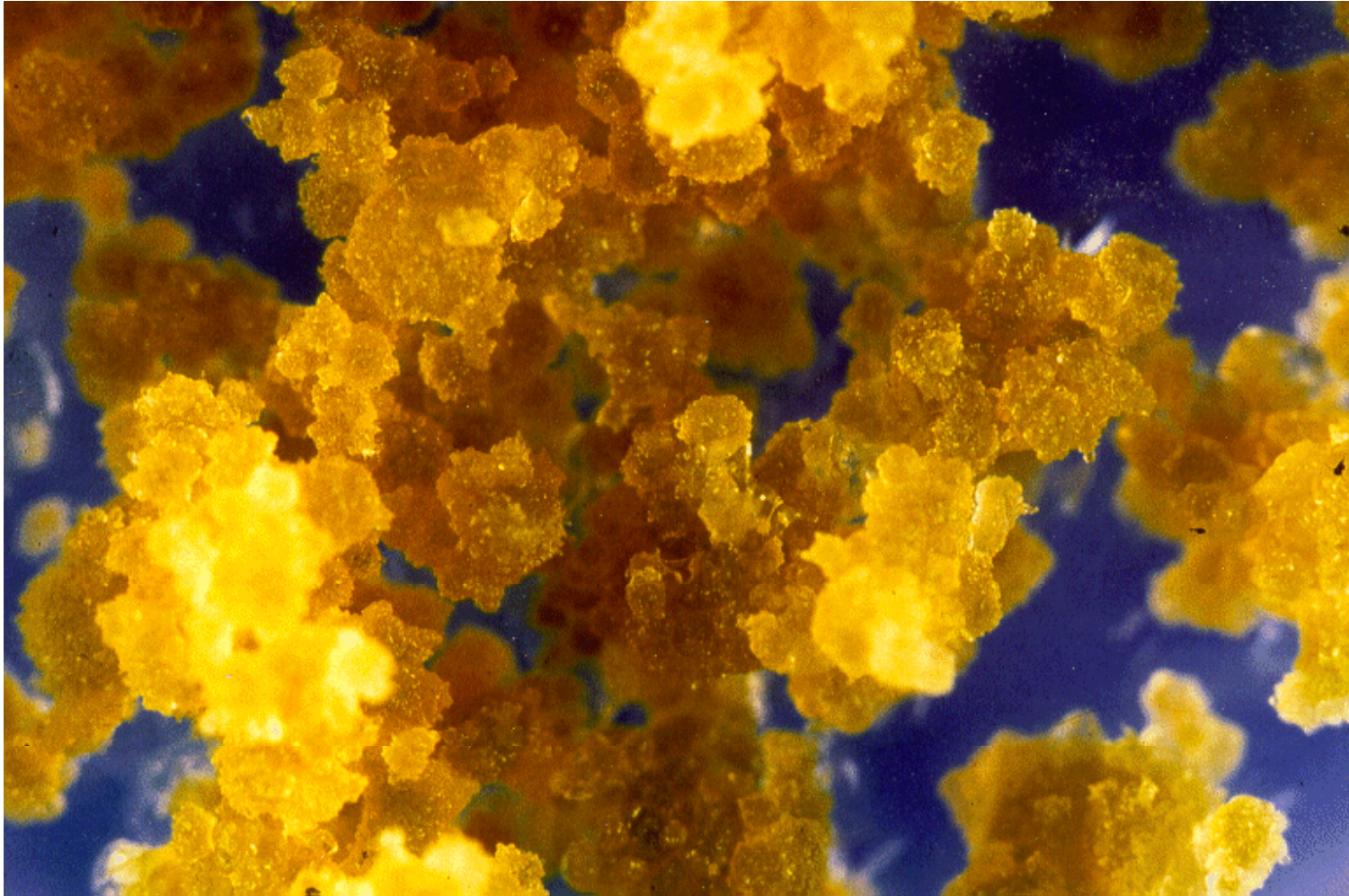


Τύποι κυτταροκαλλιέργειας φυτών

- Κάλλος
- Καλλιέργειες κυτταρικών αιωρημάτων (Υγρές καλλιέργειες φυτικών κυττάρων)
- Καλλιέργειες πρωτοπλαστών
- Καλλιέργειες ριζών
- Καλλιέργειες βλαστών (μεριστωμάτων)
- Καλλιέργειες εμβρύων
- Καλλιέργειες μικροσπορίων (γύρης ή ανθήρων)

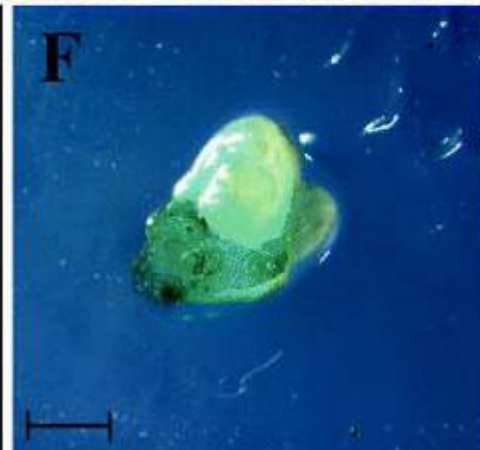
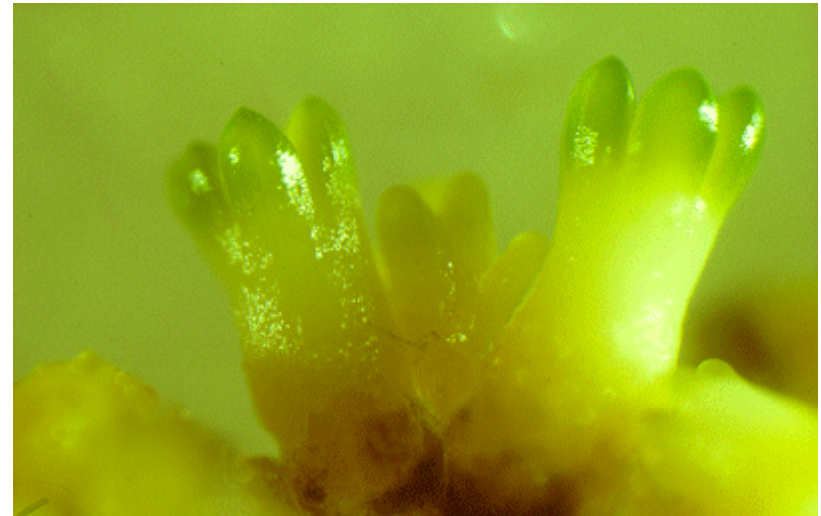
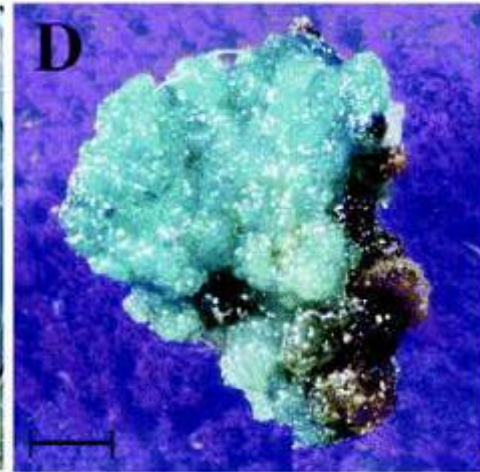
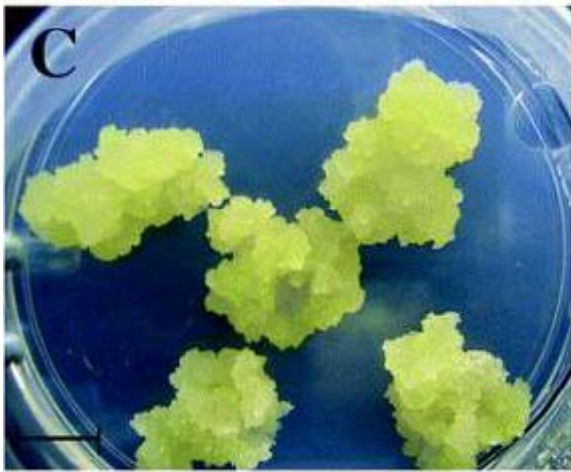
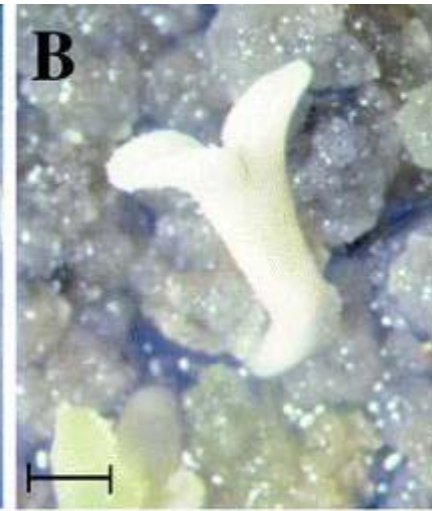
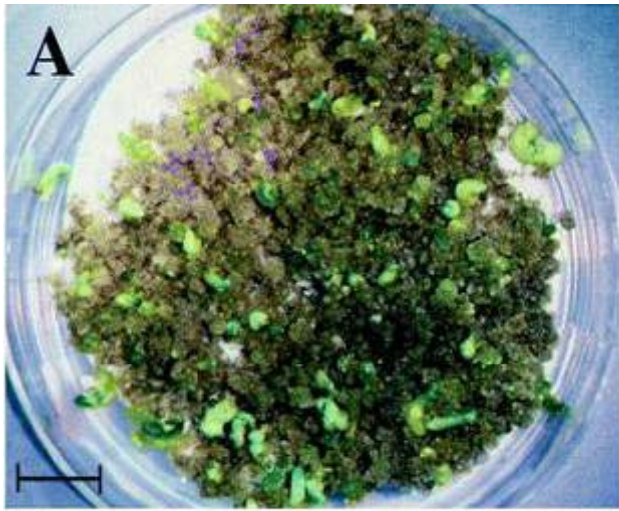


Κάλλος: μάζα μη οργανομένων, αδιαφοροποίητων κυττάρων με ικανότητα γρήγορης αύξησης και έντονης διαίρεσης

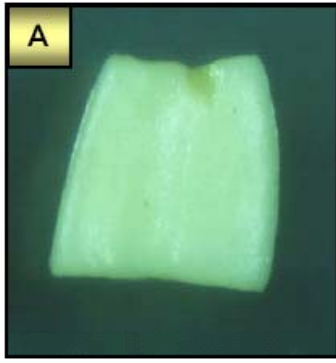


- Θεωρητικά κάθε τμήμα φυτικού ιστού (“έκφυτο”) μπορεί να μετατραπεί σε κάλλο υπό τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας
- Με περιοδικές ανακαλλιέργειες διατηρείται συνεχώς
- Δεν έχει τη δυνατότητα φωτοσύνθεσης
- Ο ρυθμός ανάπτυξης του καλλου εξαρτάται από
 - το είδος του φυτού,
 - το γενότυπο της ποικιλίας,
 - τη φυσιολογική κατάσταση του έκφυτου,
 - τις συνθήκες καλλιέργειας

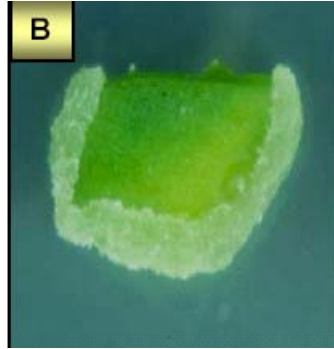




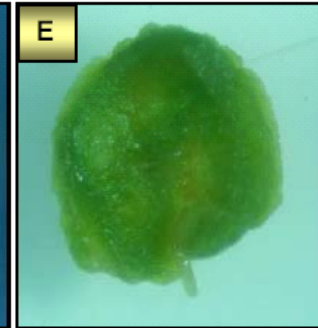
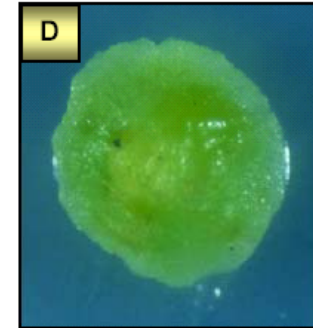
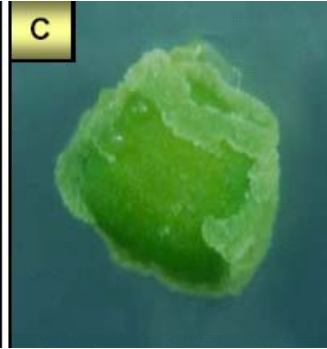
Δημιουργία υγρής καλλιέργειας φυτικών κυττάρων



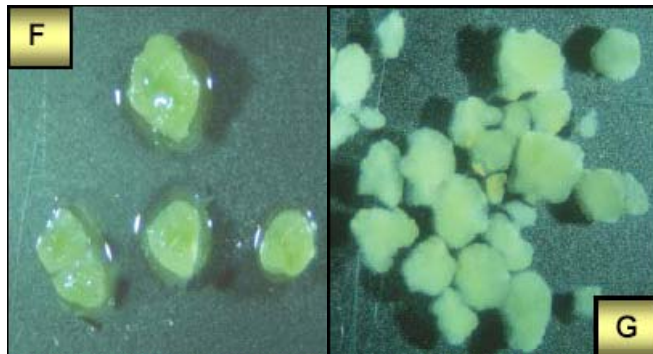
Έκφυτο κοτυληδόνας



Κάλλος 2 εβδομάδων

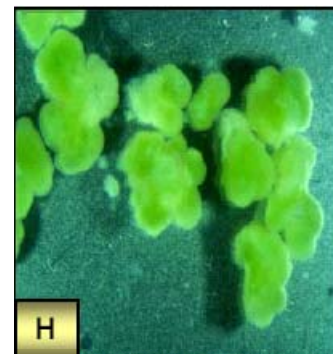
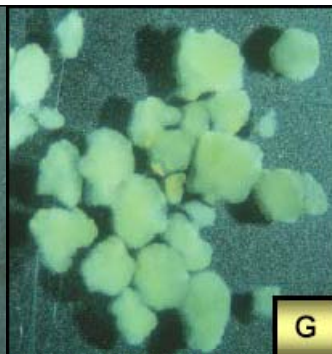


Κάλλος 3 εβδομάδων



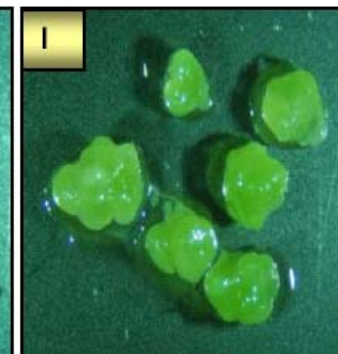
Υγρή καλλιέργεια ετεροτροφικών κάλλων

(MS, 3% σουκρόζη, 0.5 mg/l 2,4D, 0.05 mg/l kinetin, pH 5.8)



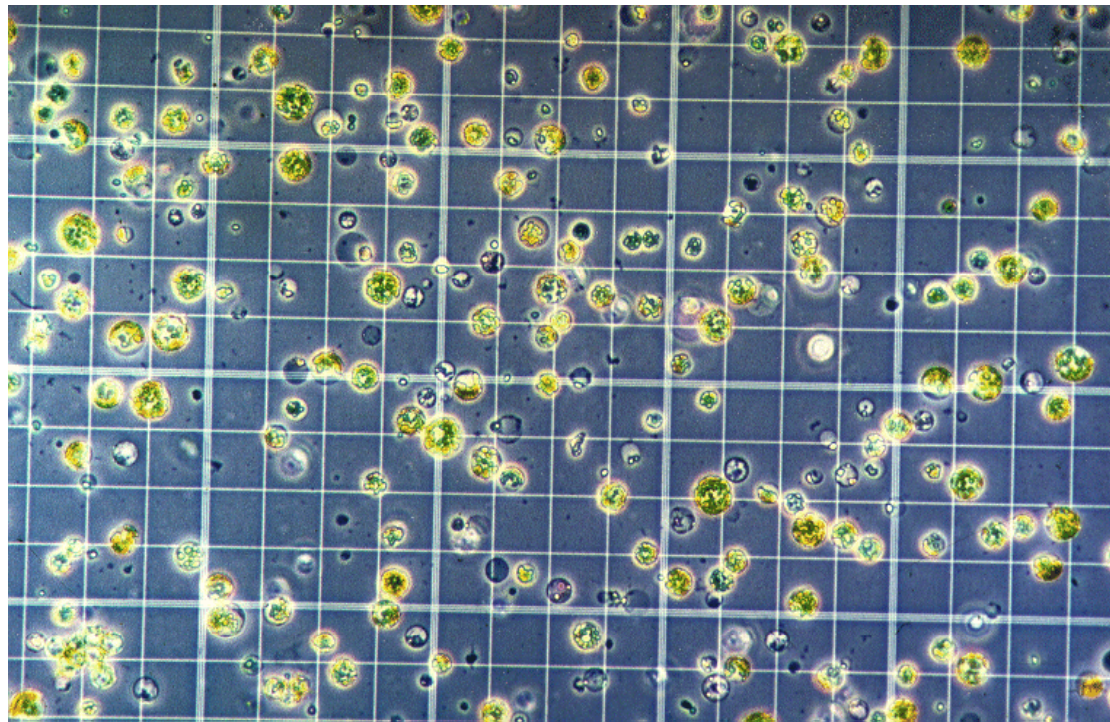
Υγρή καλλιέργεια φωτομιξοτροφικών κάλλων

(MS, 3% σουκρόζη, 5 mg/l IBA, 0.5 mg/l 2ip, pH 5.8)



Πρωτοπλάστες: φυτικά κύτταρα χωρίς το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αφαιρείται είτε με μηχανικό είτε –κυρίως- με ενζυμικό τρόπο (κυτταρινάσες και πεκτινάσες)

Σύντηξη πρωτοπλάστων: Δημιουργία σωματικών ή κυτταροπλασματικών εμβρύων



Καλλιέργειες ριζών: προέρχονται από έκφυτα ακροριζίου, σε σχετικά απλά θρεπτικά μέσα

Καλλιέργειες ακραίων βλαστικών μεριστωμάτων (οφθαλμών). Η κορυφαία κυριαρχία μπορεί να ξεπεραστεί παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης κυτοκινίνης και να σχηματιστεί σύμπλεγμα από αναπτυσσόμενους βλαστούς

- η κύρια μέθοδος μικροπολλαπλασιασμού/ κλωνικής παραγωγής φυτών *in vitro*



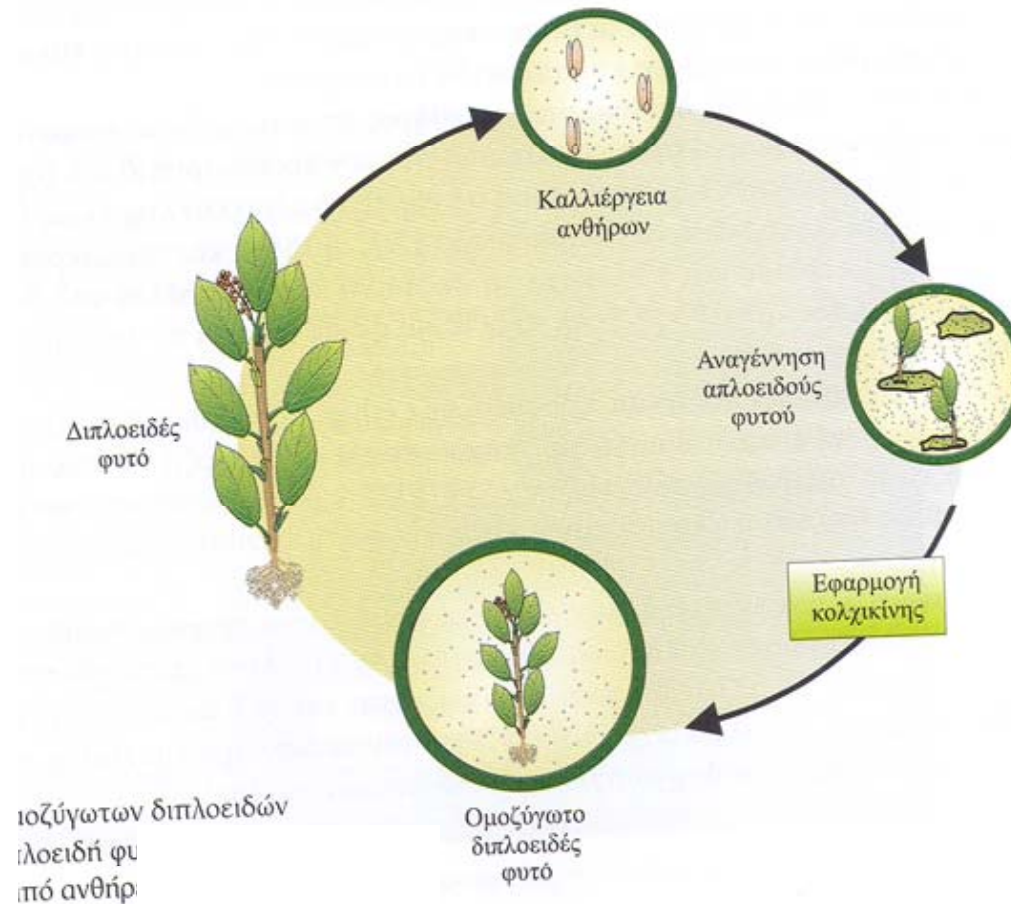
Καλλιέργειες ανθέρων: ως έκφυτα χρησιμοποιούνται απλοειδείς ιστοί για παραγωγή εμβρύου ή κάλλου.

Ανθήρες: σωματικοί ιστοί που περιβάλλουν τη γύρη (αρσενικό γαμετόφυτο).

Απαιτείται η αφαίρεση του κυτταρικού τοιχώματος του ανθήρα

Μη ώριμη γύρη: καλλιέργεια του αρσενικού γαμετόφυτου για την παραγωγή εμβρύου

Επιτυγχάνεται
η παραγωγή απλοειδών
και δι-απλοειδών φυτών.



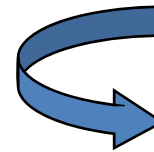
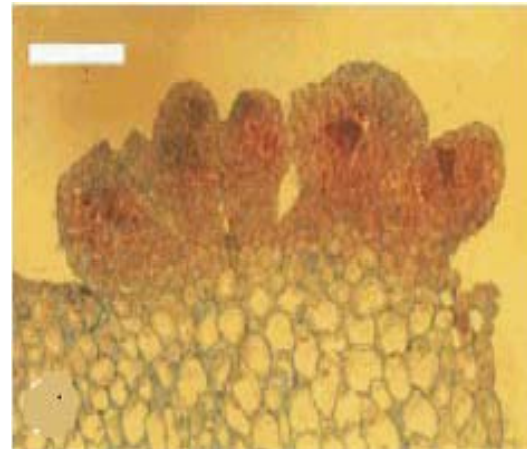
Αναγέννηση φυτών

- Οργανογένεση
- Σωματική εμβρυογένεση



Οργανογένεση: παραγωγή φυτικών οργάνων απευθείας από το έκφυτο ή από τον κάλλο. Εναλλακτικά επιγενείς οφθαλμοί, οι οποίοι αναπτύσσονται σε καλλιέργειες βλαστών και ακραίων ή μασχαλιαίων οφθαλμών, επίσης μπορούν να οδηγήσουν στην αναγέννηση ολόκληρων φυτών

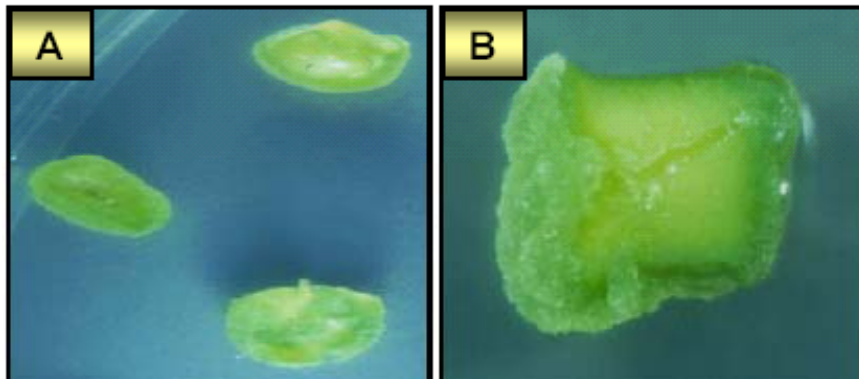
- Ρυθμίζεται από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου και κυρίως της αναλογίας αυξίνης: κυτοκινίνης



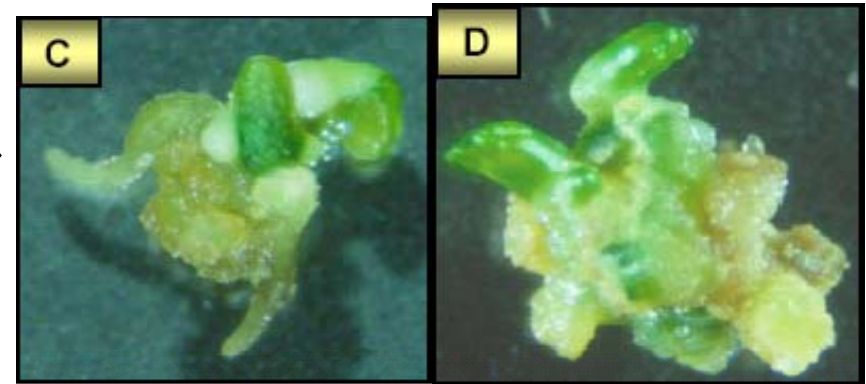
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



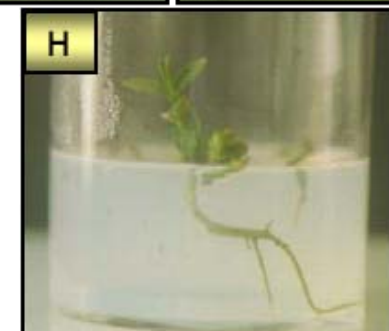
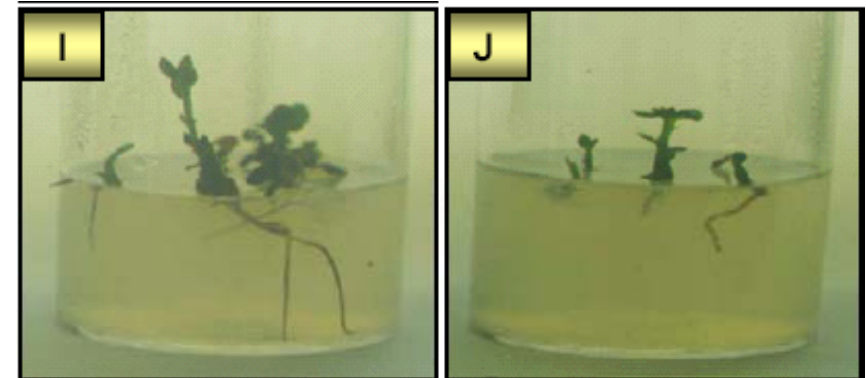
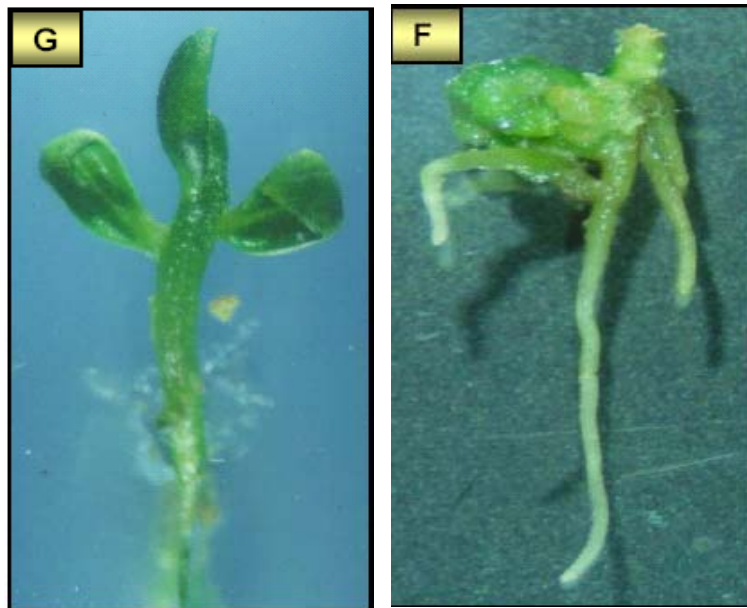
Επαγωγή κάλλου σε ιστό κοτυληδόνων



Επαγωγή βλαστογένεσης



Επαγωγή ριζογένεσης



Πλεονεκτήματα- Εφαρμογές της *in vitro* καλλιέργειας φυτών

- Παραγωγή υγιών φυτών, απαλλαγμένων από ασθένειες
- Ταχύτατη παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών με ίδιο γενότυπο με μικροπολλαπλασιασμό
- Δημιουργία απλοειδών φυτών
- Διατήρηση γενετικού υλικού
- Παραγωγή φυτών των οποίων η ανάπτυξη είναι δύσκολη από σπόρο.
- Παραγωγή φυσικών προϊόντων από υγρές καλλιέργειες φυτικών κυττάρων
- Δημιουργία νέων υβριδίων από γενετικώς απομονωμένα είδη
- Επίτευξη ομοζυγωτίας σε προγράμματα βελτίωσης
- Αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών



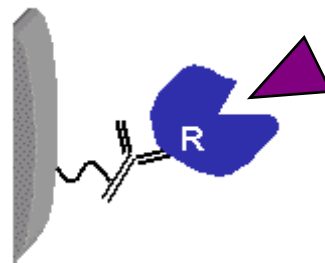
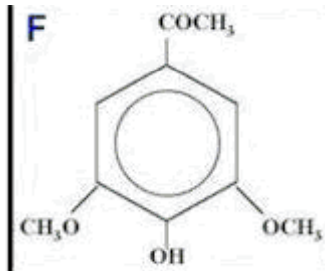
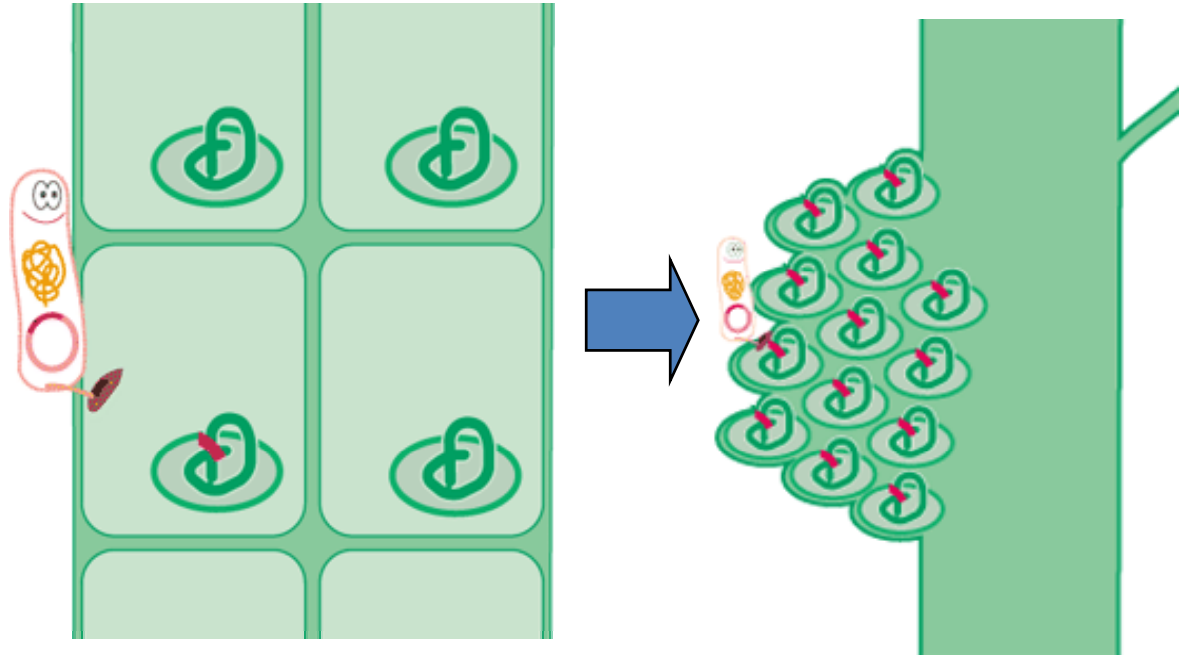
Agrobacterium tumefaciens

- Gram-αρνητικό βακτήριο της ριζόσφαιρας
- παθογόνο: υπεύθυνο για την ασθένεια του 'κορωνοτού κάλλου', η οποία εξαρτάται από την παρουσία του Ti (tumour-inducing) πλασμιδίου στο *A. tumefaciens*,



Η βιολογία του *A. tumefaciens*

- Το *A. tumefaciens* τρέφεται με εκκρινόμενες ουσίες της ρίζας του φυτού
- μολύνει μέσω τραυματισμένων ιστών του φυτού: το φυτό παράγει στις θέσεις τραυματισμού ενώσεις (μόρια-σινιάλα), όπως η ακετοσυριγγόνη

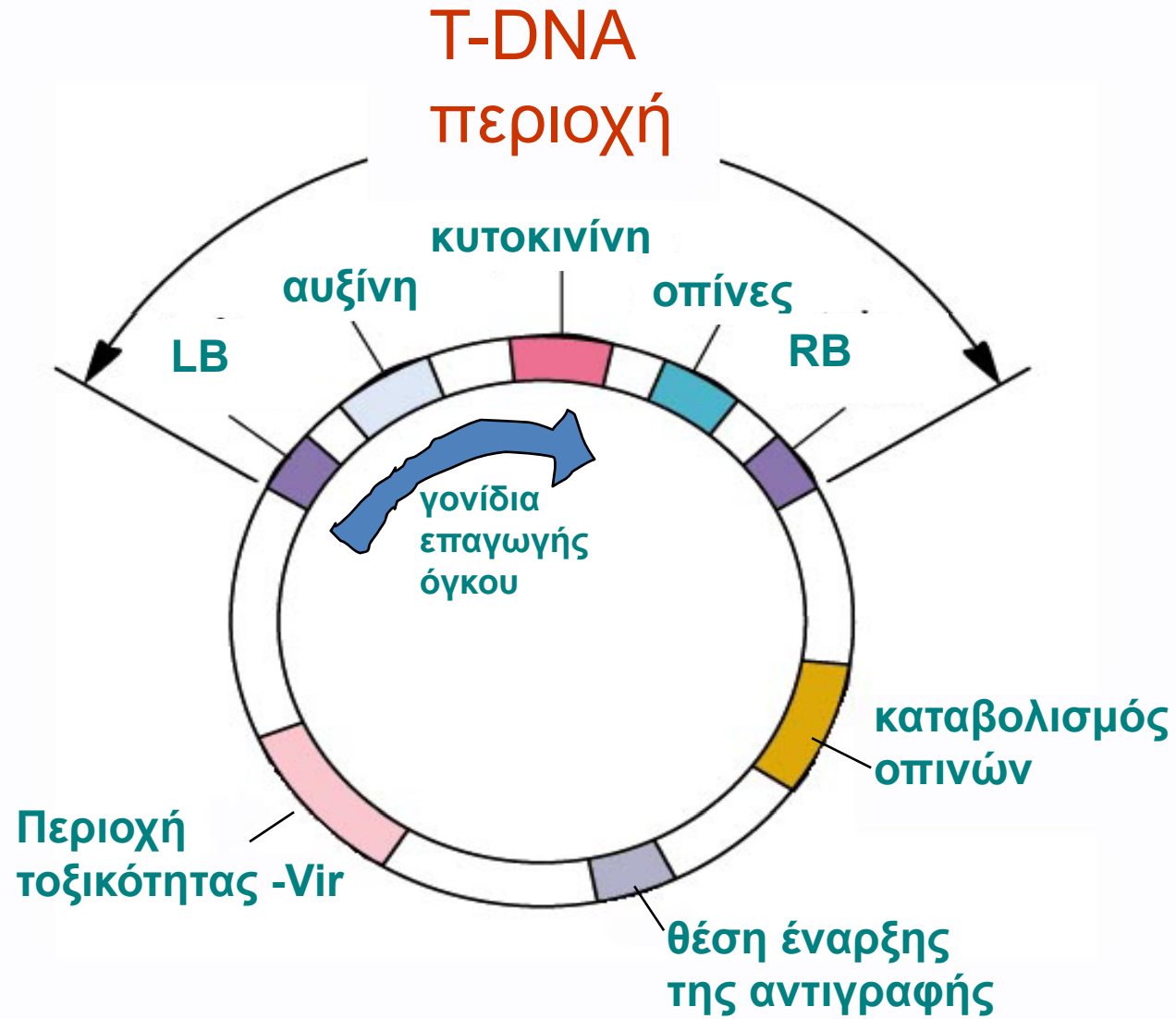


Το βακτηριακό Τί πλασμίδιο παράγει και υποδοχείς για αυτές τις ενώσεις και το βακτήριο κινείται χημειοτακτικά προς αυτές

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Το Ti πλασμίδιο



Το T-DNA

- ✚ το T-DNA οριοθετείται από ευθέως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 25 bp
επαναλαμβανόμενα συνοριακά Left Border- LB
Right Border- RB
- ✚ Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι πλασμιδίων

Νοπαλίνης (ένα συνεχές τμήμα 22 Kb)

TG(G/A)CAGGATATAT(-/T)G(T/G)(G/C)G(T/G)GTAAAC

Οκτοπίνης (δύο τμήματα 14 και 7 Kb: TL και TR)

(C/T)GGCAGGATATA(T/A)C(A/C)(A/G)TTGTAA(A/T)T

TAAGTCGCTGTGTATGTTTGTTTG ("overdrive" / ενισχυτής)



Το T-DNA

Γονίδια *onc* (*oncogenes*)

- Γονίδια *auxA* (*tms1/ iaaM*) και *auxB* (*tms2/ iaaH*) :
παραγωγή της αυξίνης, ινδολυλ οξικό οξύ (IAA)
- Γονίδια *cyt* (*tmr/ ipt*) :
κωδικοποιεί για την ισοπεντενυλική τρανφεράση (παραγωγή κυτοκινίνης)

Γονίδια παραγωγής οπινών (*ocs*)

οπίνες: παράγωγα αμινοξέων / αγροπίνες: παράγωγα σακχάρων
οκτοπίνη ή νοπαλίνη (και μαννοπίνη, αγροπίνη, φρουκτοπίνη)



Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 80, pp. 4803–4807, August 1983
Genetics

Expression of bacterial genes in plant cells

(plant protoplasts/transformation/foreign DNA/antibiotic resistance/selectable markers)

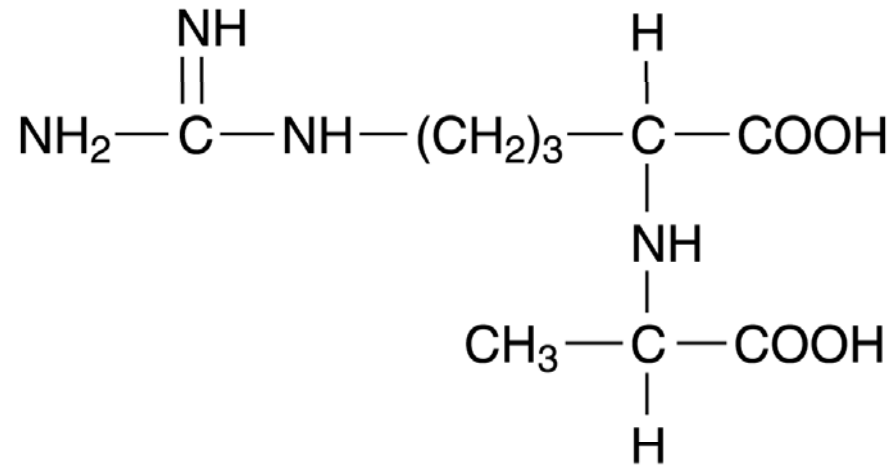
ROBERT T. FRALEY, STEPHEN G. ROGERS, ROBERT B. HORSCH, PATRICIA R. SANDERS, JEFFERY S. FLICK, STEVEN P. ADAMS, MICHAEL L. BITTNER, LESLIE A. BRAND, CYNTHIA L. FINK, JOYCE S. FRY, GERALD R. GALLUPPI, SARAH B. GOLDBERG, NANCY L. HOFFMANN, AND SHERRY C. WOO

Monsanto Company, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167

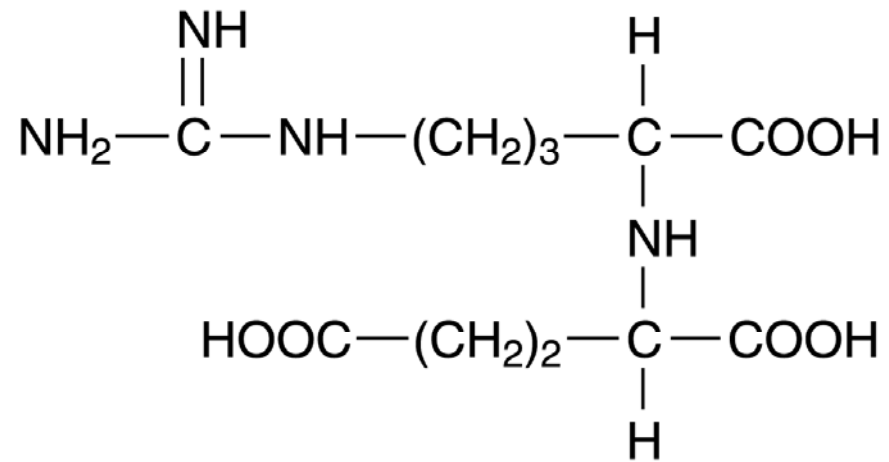
DeBlock M, Herrera-Estrella L, vanMontagu M, Schell J, Zambryski P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* 3: 1681–89

Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandak V, Hohn T, et al. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3:2717–22



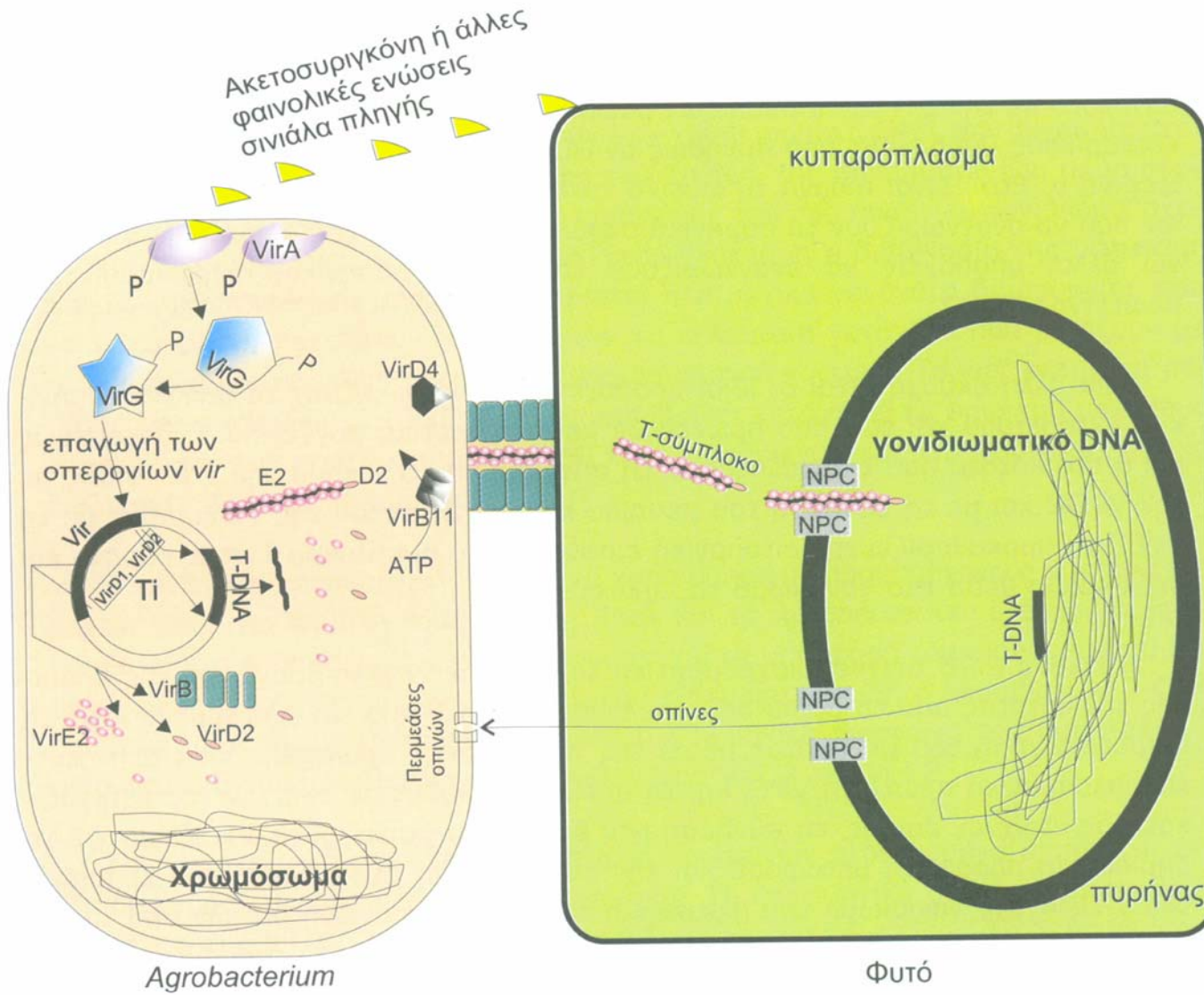


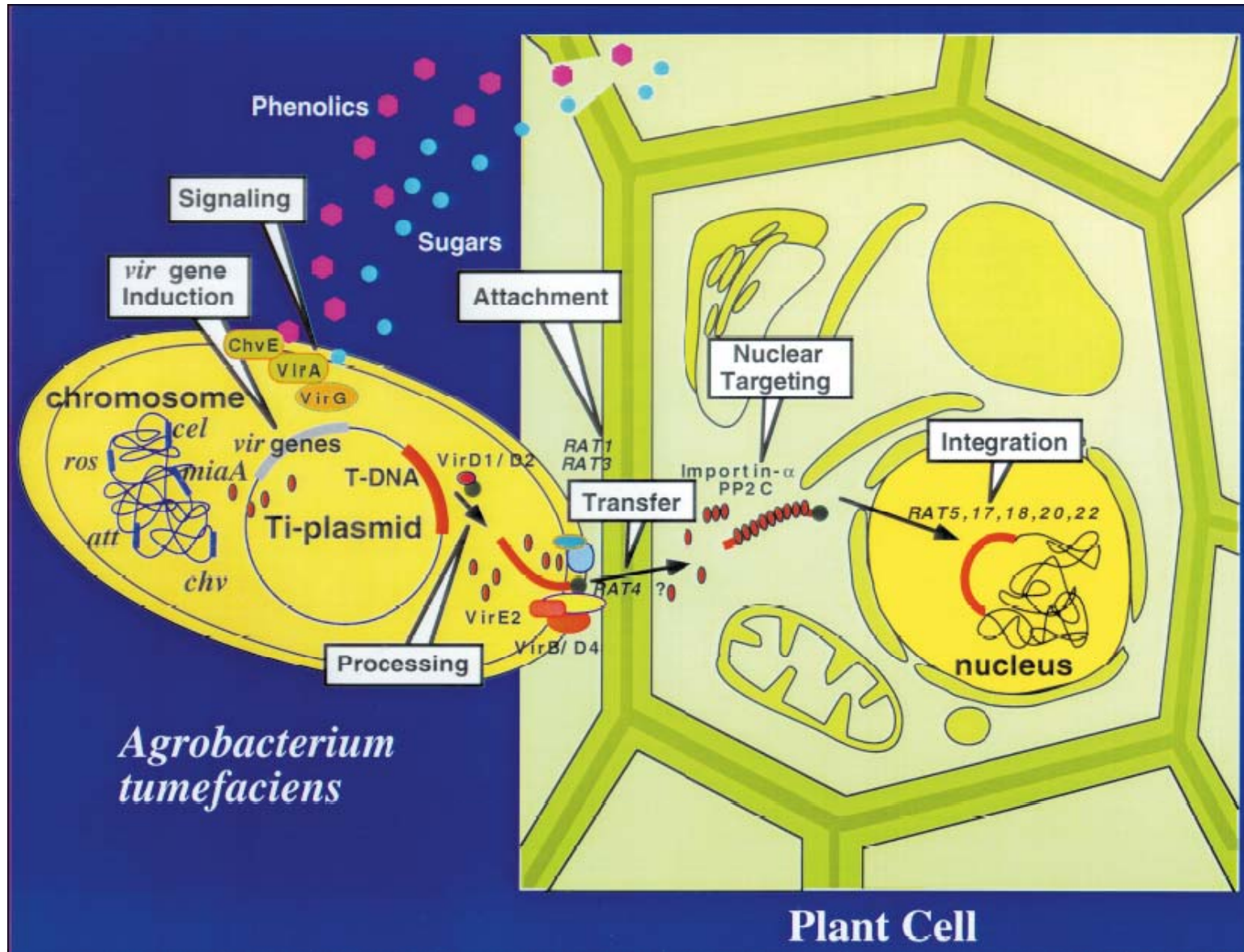
Octopine



Nopaline



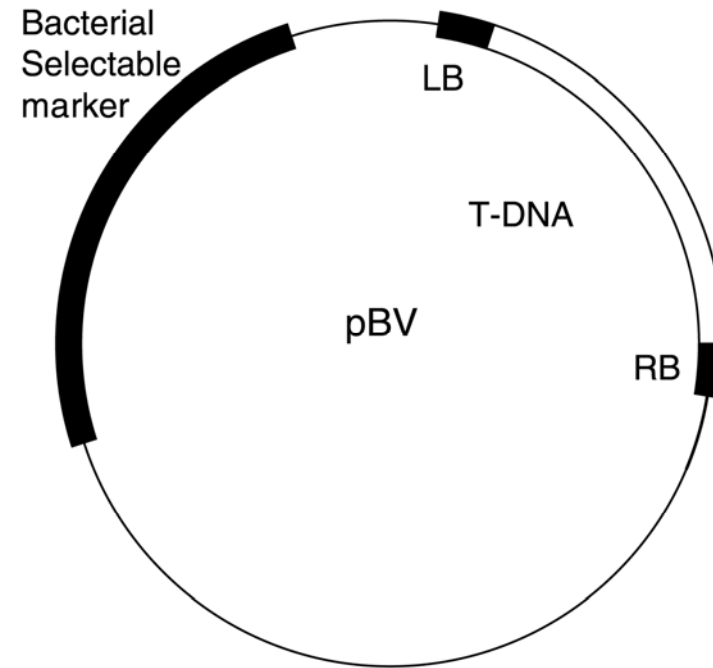
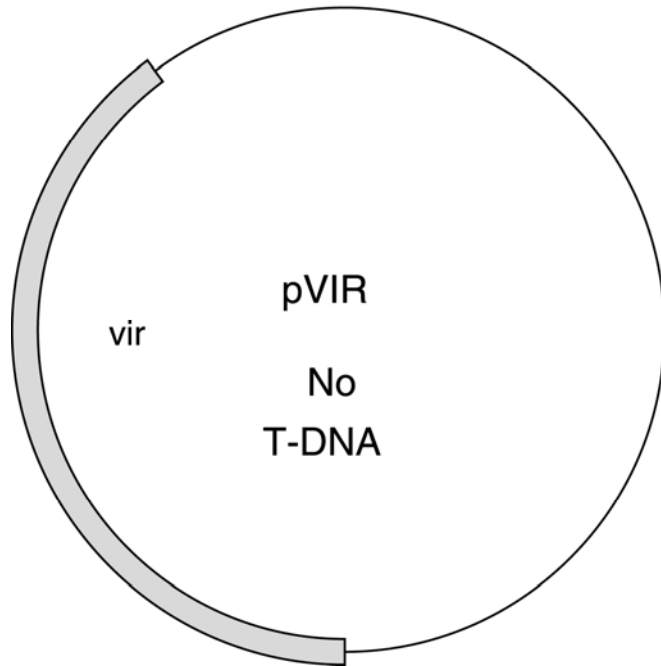


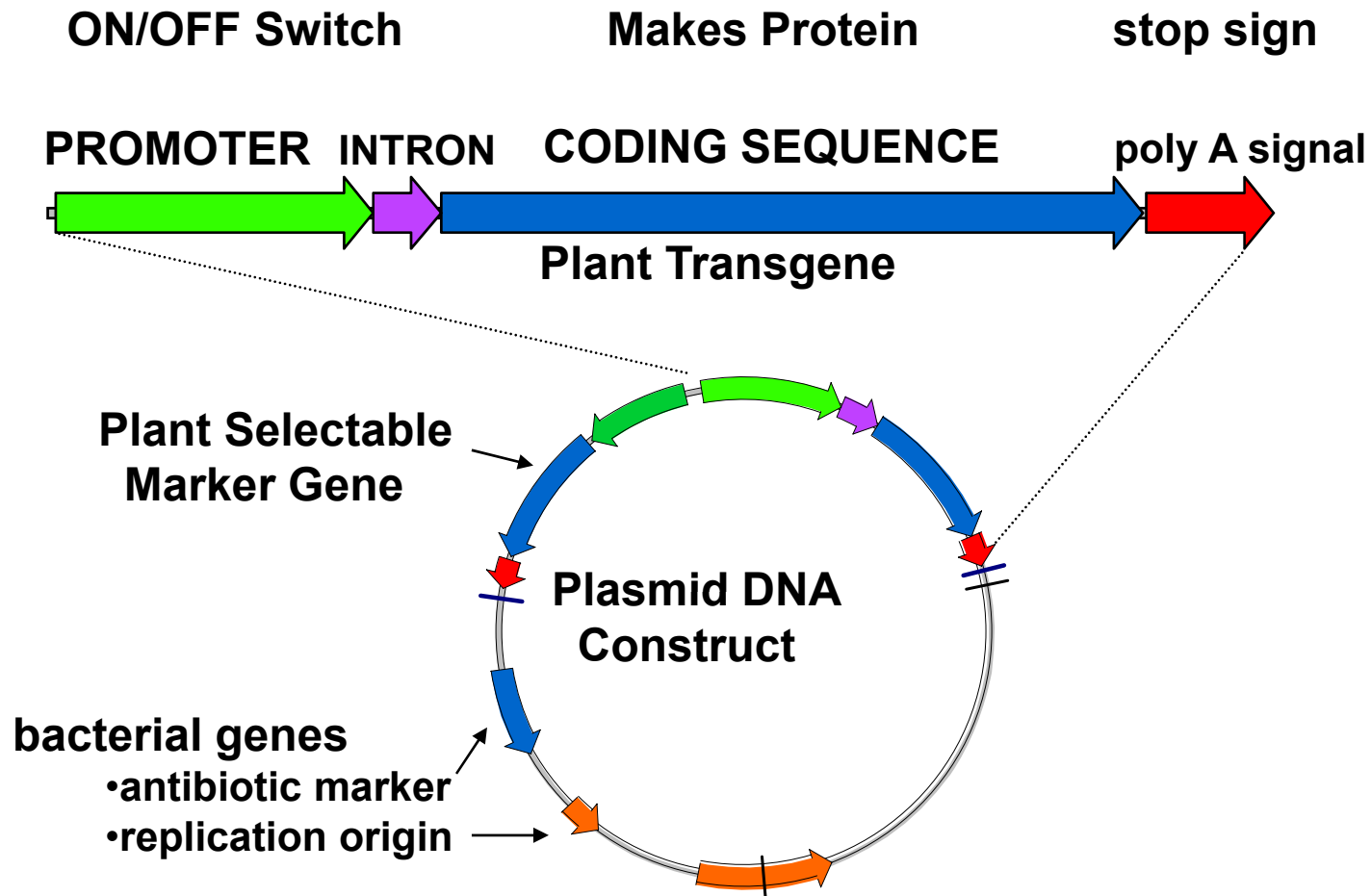


Διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσης του T-DNA

- ✚ Χημειοτακτική αναγνώριση θέσεων τραυματισμού του φυτού από όπου εκκρίνονται μόρια-σινιάλα. Προσκόληση και αποικισμός με τη μεσολάβηση των *attR* (πολυσακχαρίτης), *chvA & B*, *chvB* (κυκλικές β-1,2-γλυκάνες, *rscA* (σουκινογλυκάνη) χρωμοσωμικών γονιδιακών τόπων
- ✚ Επαγωγή της περιοχής τοξικότητας *vir*: Η *virA* πρωτεΐνη (μεμβρανική κινάση-υποδοχέας) αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί την *virG* και η τελευταία όλα τα υπόλοιπα γονίδια του ρεγουλόνιου
- ✚ Δημιουργία- παραγωγή του T-DNA συμπλόκου: αποκοπή από το Ti πλασμίδιο μονόκλωνης αλυσίδας (T-DNA strand) στα συνοριακά (LB & RB) από τις D1/D2, σύνδεση με D2/E2
- ✚ Μεταφορά του T-DNA/D2 και της *virE2* στο κύτταρο ξενιστή μέσω ειδικού μεμβρανικού συστήματος έκκρισης
- ✚ Μεταφορά του T-DNA strand/D2 στον πυρήνα (σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού D2, E2). Ενσωμάτωση στην χρωματίνη (*VirE2* σε συνεργασία με *VIP1 & 2* του φυτού και *importins*, *cyclophilins*) με "ανορθόδοξο ανασυνδυασμό" (*illegitimate recombination*)







Συστατικοί προαγωγείς στα διαγονιδιακά φυτά

προκαθορίζουν την έκφραση του γονιδίου σε όλους σχεδόν τους ιστούς σε παραπλήσια επίπεδα ανεξάρτητα από αναπτυξιακούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες

Παραδείγματα

35S από CaMV (ιός του μωσαϊκού του καπνού): ιδανικός για την έκφραση των γονιδίων επιλογής και αναφοράς

nos (συνθάση της νοπαλίνης), *ocs* (συνθάση της οκτοπίνης), *mas* από *Agrobacterium*

ubiquitin I (καλαμπόκι) / *actin* (ρύζι) για μονοκότυλα

Ρυθμιζόμενοι κατά συνθήκη προαγωγείς

- ✓ Ιστοειδικοί
- ✓ Επαγώμενοι
- ✓ Αναπτυξιακοί



Μεταμόρφωση φυτών μέσω του *Agrobacterium*

- ✚ Κλωνοποίηση του γονιδίου (ή τμήματός του) στη πολυδύναμη θέση κλωνοποίησης του κατάλληλου φορέα
- ✚ Εισαγωγή του γονιδίου σε ένα κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens*
- ✚ Συν-καλλιέργεια του τροποποιημένου γενετικά *A. tumefaciens* με τα κατάλληλα έκφυτα φυτών από τα οποία μπορεί να προέλθουν ολόκληρα φυτά
- ✚ Καλλιέργεια έκφυτου, αρχικώς στην παρουσία κάποιου βακτηριοστατικού παράγοντα που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *Agrobacterium* αλλά όχι των φυτικών κυττάρων (π.χ. cefotaxime) και σε παράγοντα επιλογής για την επιλογή των μεταμορφωμένων φυτικών κυττάρων/ τμημάτων
- ✚ Επιλογή των αναγεννημένων φυτών για την έκφραση των δεικτών επιλογής ή αναφοράς
- ✚ Ανάπτυξη των απογόνων των μεταμορφωμένων φυτών και καθορισμός της κληρονομικότητας του εισαχθέντος γονιδίου

✓ Σταθερός μετασχηματισμός φυτών



Agrobacterium-Mediated Rice Transformation



+

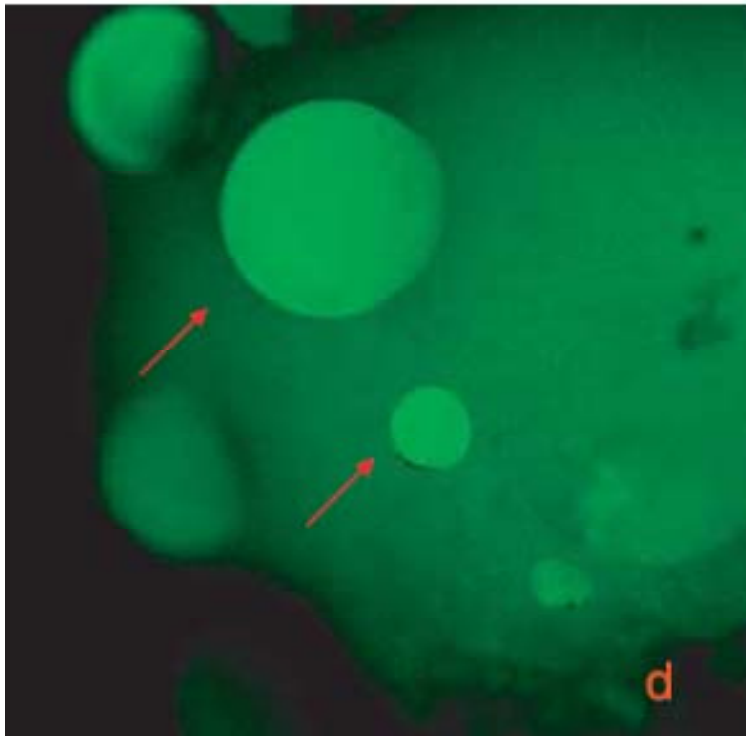
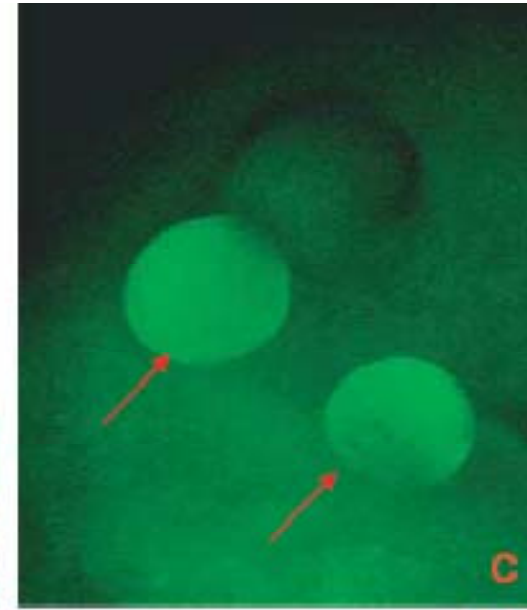
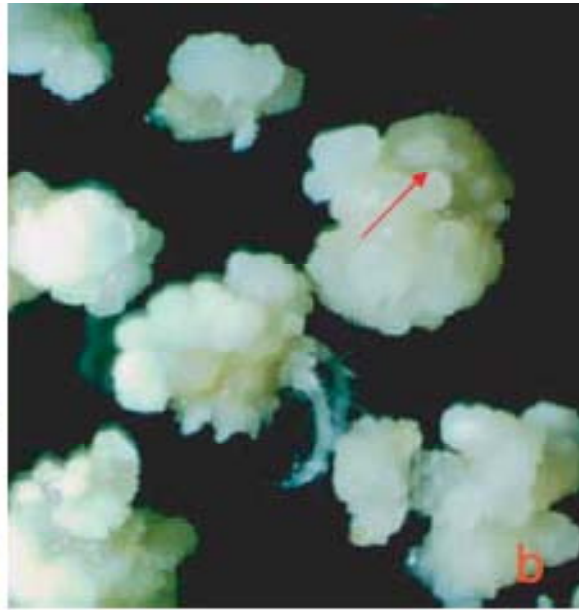
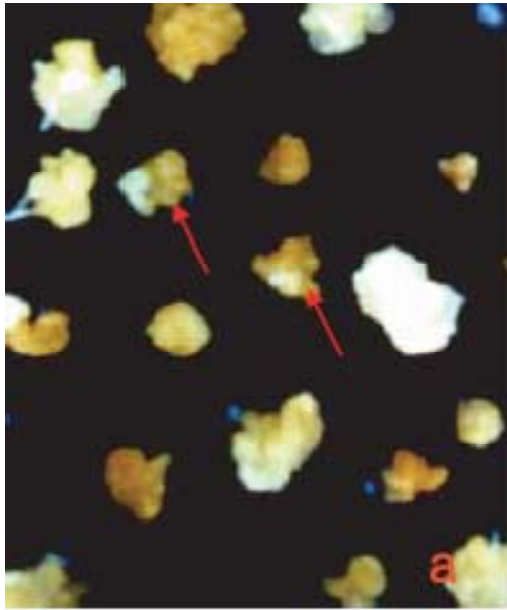


co-cultivation
and selection



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας





Βομβαρδισμός σωματιδίων

(βιολιστική, βομβαρδισμός προεξοχών, επιταχυντής σωματιδίων, γονιδιακό όπλο, όπλο σωματιδίων)

Χρήση επιταχυνόμενων με μεγάλη ταχύτητα σωματιδίων –προεξοχών (απο χρυσό ή βολφράμιο) στα οποία συνδέεται το DNA προς μεταφορά έτσι ώστε να διαπερνώνται οι εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισέρχεται το DNA στο κύτταρο

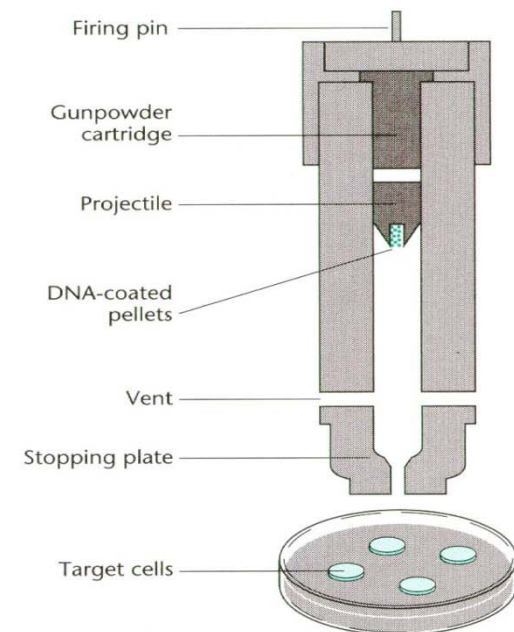


Figure 15.3

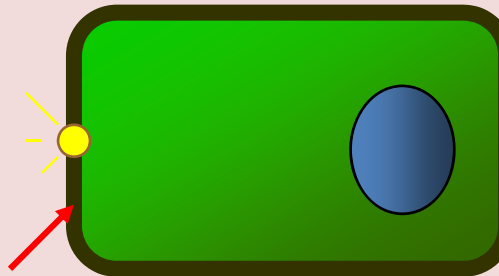
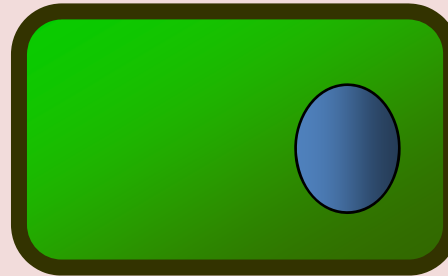
DNA Particle Gun. The DNA particle gun, developed by John C. Sanford of Cornell University, fires tiny pellets coated with DNA into plant cells. The pellets are held by a plastic microprojectile, which is accelerated by a gunpowder charge. The plate stops the microprojectile; momentum sends the DNA-coated pellets into target. The instrument shown is the Biolistic® system from Bio-Rad, but other instruments using variations of this basic principle have been developed.



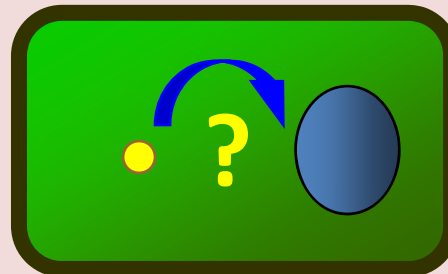
Βιολιστική



Σωματίδια χρυσού
επικαλυμμένα με
DNA



Κυτταρικό τοίχωμα



Βομβαρδισμός σωματιδίων

Φυσικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- ❖ χημική σύσταση σωματιδίων
- ❖ μέγεθος και σχήμα σωματιδίων ($0.6-1.2 \mu m$)
- ❖ ταχύτητα σωματιδίων (*επιτάχυνση, απόσταση στόχου, κενό*)
- ❖ αριθμός μικροσφαιριδίων ανά μονάδα εισαγωγής (ικανοποιητική κάλυψη του κυτταρικού επιπέδου στόχου και εισχώρηση στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα χωρίς την υπερβολική νέκρωση των επιφανειακών κυτταρικών ιστών)
- ❖ διάμετρος στόχευσης

Βιολογικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- 🌸 απαραίτητως κύτταρα ή ιστοί με δυναμικότητα αναγέννησης (*μεριστωματικός ιστός ή έκφυτα που βομβαρδίζονται και κατόπιν επάγονται για εμβρυογένεση ή κύτταρα κάλλου και εμβρυογενών καλλιιεργειών, έμβρυα, γύρη*)
- 🌸 στάδιο κυτταρικού κύκλου
- 🌸 δομή και μέγεθος DNA
- 🌸 συγκέντρωση DNA (bead-loading rate): *μέχρι 5 $\mu g/ mg$ σωματιδίων*



Βομβαρδισμός σωματιδίων

Πλεονεκτήματα

⌘ Αποτελεσματική και για σταθερό μετασχηματισμό (μεταμόρφωση) κυττάρων- ιστών –οργάνων **αλλά και οργανιδίων** (χλωροπλάστες)

⌘ Αποτελεσματική σε περιπτώσεις όπου οι άλλες προσεγγίσεις αποτυγχάνουν

π.χ. * μεταμόρφωση μονοκοτυλήδων φυτών

* *in planta* μετασχηματισμός βλαστών ή άνθων με βομβαρδισμό μεριστωμάτων

Μειονεκτήματα

⌘ πολλαπλότητα των ενθέσεων

⌘ ανακατατάξεις των εισαχθέντων γονιδίων

Ένθεση ως single copy event, plasmid concatamers, interspersed clusters



Μεταμόρφωση χλωροπλαστών

Γονιδίωμα πλαστιδίων (plastome- ptDNA)

ο Στα ανώτερα φυτά πολύ συντηρημένο, με μικρή ποικιλομορφία στην οργάνωση και τη

ο 120-130 γονίδια ανήκουν σε δύο κατηγορίες:

γονίδια του γενετικού συστήματος (rRNAs, tRNAs, ριβοσωμικές υπομονάδες, RNA πολυμεράση)

γονίδια φωτοσύνθεσης

ο Γονίδια οργανωμένα σε οπερόνια και έκφρασή τους σε πολυκιστρονικά mRNAs

*Μέθοδοι μεταμόρφωσης
Βομβαρδισμός σωματιδίων
(φορείς που επιτρέπουν ομόλογο ανασυνδυασμό με το ptDNA)*



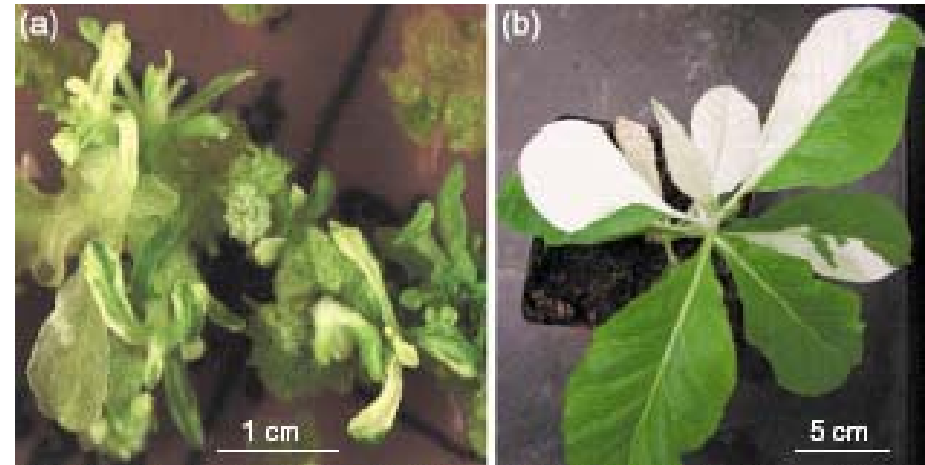
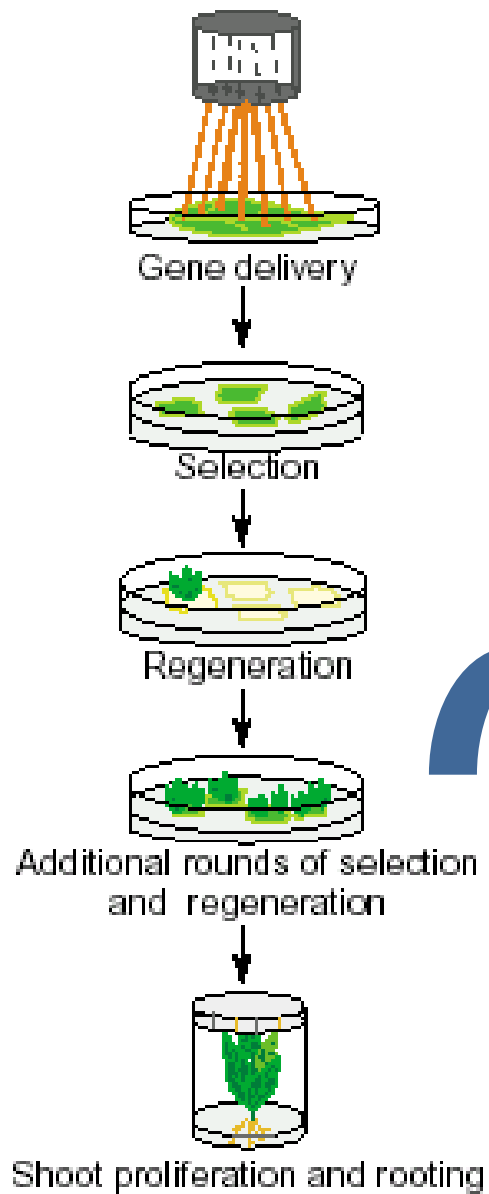
Πλεονεκτήματα γενετικής μεταμορφωσης πλαστιδίων

- ο Υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών (μέχρι και 46% της ολικής διαλυτής πρωτεΐνης) λόγω της μεγάλης πολυπλοειδίας του ptDNA (π.χ.10-14 νουκλεοειδή ανά χλωροπλάστη, μέχρι και 100 χλωροπλάστες ανά κύτταρο)
- ο Απουσία επιγενετικών επιδράσεων (γονιδιακή σίγηση, επίδρασης θέσης)
- ο Τοποθέτηση πολλαπλών γονιδίων σε οπερόνια
- ο Κληρονόμηση πλαστιδίων από το θηλυκό γονέα και όχι από τη γύρη

Μειονεκτήματα- Προβλήματα

- ο περιορισμένος αριθμός ειδών είναι επιδεκτικός σε μεταμόρφωση χλωροπλαστών (καπνός, τομάτα, πατάτα, *Brassica napus*, *Oryza sativa* με πολλά προβλήματα γονιμότητας και ετεροπλασμίας)
- ο απαιτούνται πολλές γενεές σε κυτταροκαλλιέργεια πριν την απόκτηση γενετικά σταθερών διαγονιδιακών φυτών



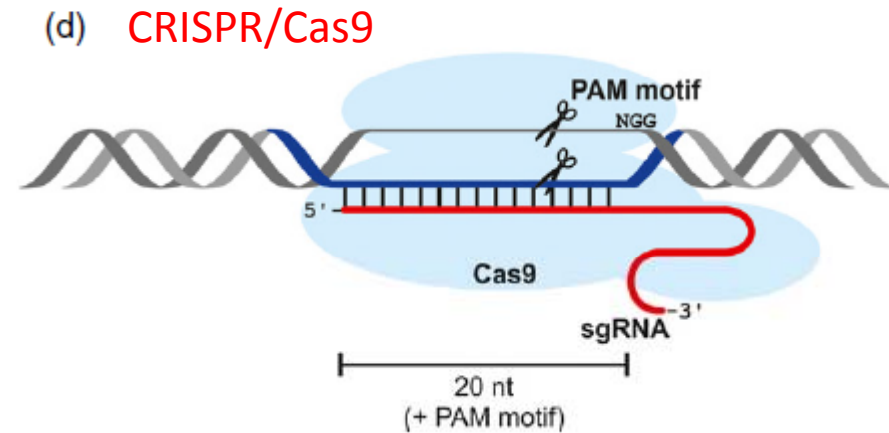
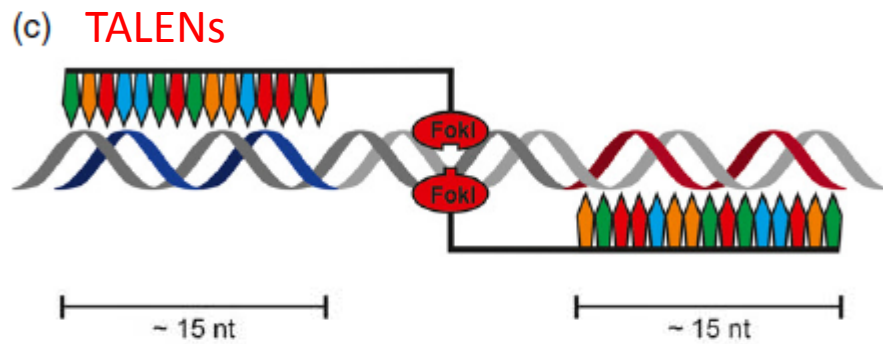
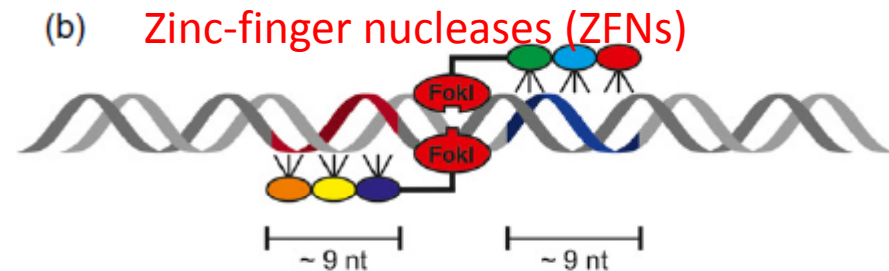
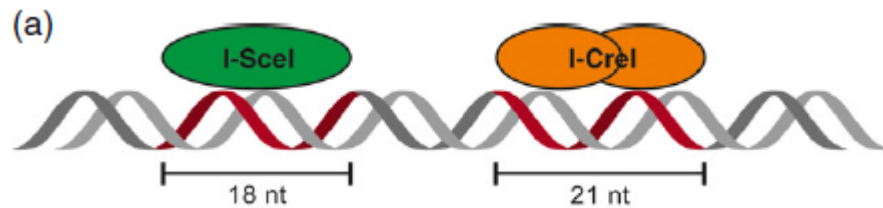


Απαλοιφή των γονιδιωμάτων άγριου-τύπου και εγκαθίδρυση γενετικής τροποποίησης σε κάθε αντίγραφο του χλωροπλαστικού γονιδιώματος σε κάθε φυτικό κύτταρο :

Ομοιοπλασμία (homoplasmly)



Συνθετικές Νουκλεάσες για Γονιδιωματική Μηχανική



ενσωμάτωση με ακρίβεια θέσης του επιθυμητού
γενετικού υλικού σε πολύ καθορισμένες θέσεις μέσα
στο γονιδίωμα (genome editing)



Διαγονιδιακά Φυτά στο εμπόριο

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



Βιοτεχνολογικές εφαρμογές- Α

Διαγονιδιακά Φυτά με βελτιωμένα αγρονομικά χαρακτηριστικά

- ✓ Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα
- ✓ Ανθεκτικότητα σε έντομα
- ✓ Ανθεκτικότητα σε ασθένειες (βακτήρια, μύκητες, ιοί)
- ✓ Αντοχή σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



✓ Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα



Στρατηγικές

1. Αποτοξικοποίηση ζιζανιοκτόνου με εισαγωγή γονιδίων βακτηριακής (κυρίως) ή φυτικής προέλευσης

απαραίτητες ιδιότητες γονιδίων

- απόλυτη εξειδίκευση
- μονογονιδιακός χαρακτήρας
- να μην απαιτεί πολύπλοκα συνένζυμα
- καλή ενζυμική κινητική
- απουσία τοξικότητας του προϊόντος αντίδρασης

Δεν είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον τρόπο δράσης

2. Υπερπαραγωγή της φυσιολογικής, μη-τροποποιημένης πρωτεΐνης-στόχου

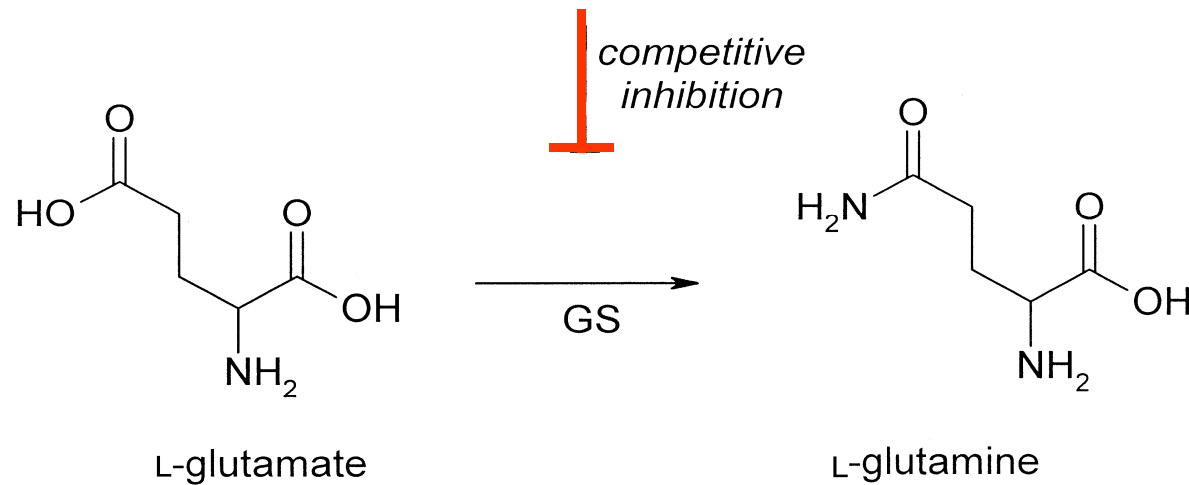
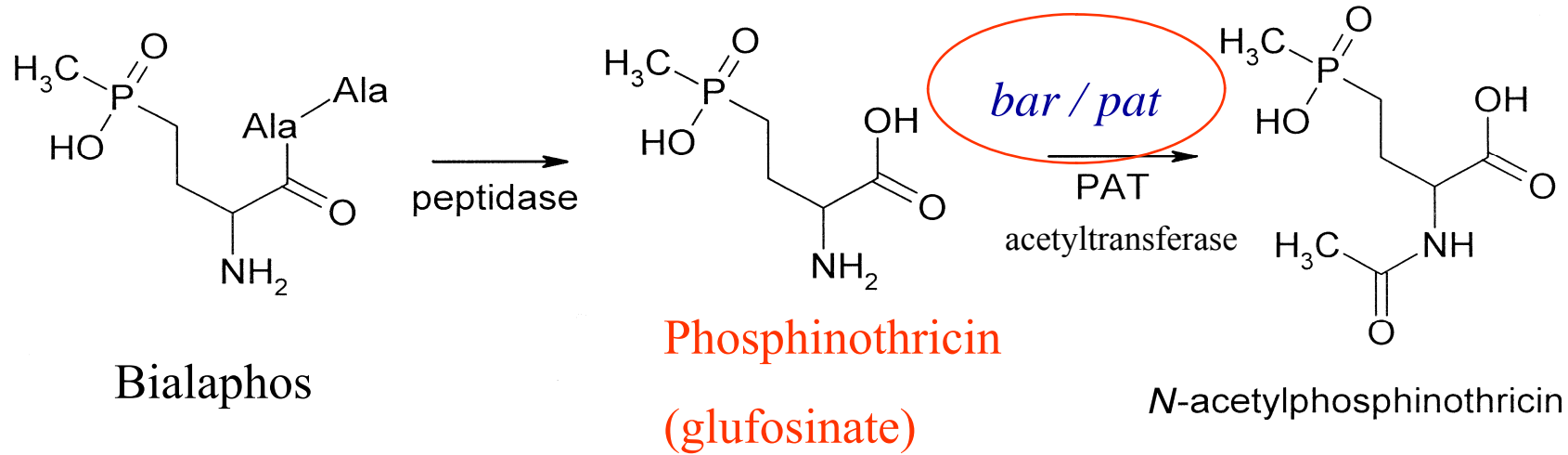
3. Τροποποίηση της πρωτεΐνης-στόχου

- γνωστή η βιοχημική θέση δράσης
- δυνατότητα στη μοριακή μηχανική τροποποίησης?
- εντοπισμός σε υποκυτταρικά διαμερίσματα
- πολυμερή ένζυμα

4. Ενίσχυση της αποτοξικοποίησης από ενδογενείς μηχανισμούς του φυτού (κυτοχρωμα P450, μεταφοράση S της γλουταθειόνης, GST)



Ανθεκτικότητα στο glufosinate (phosphinothricin)- BASTA

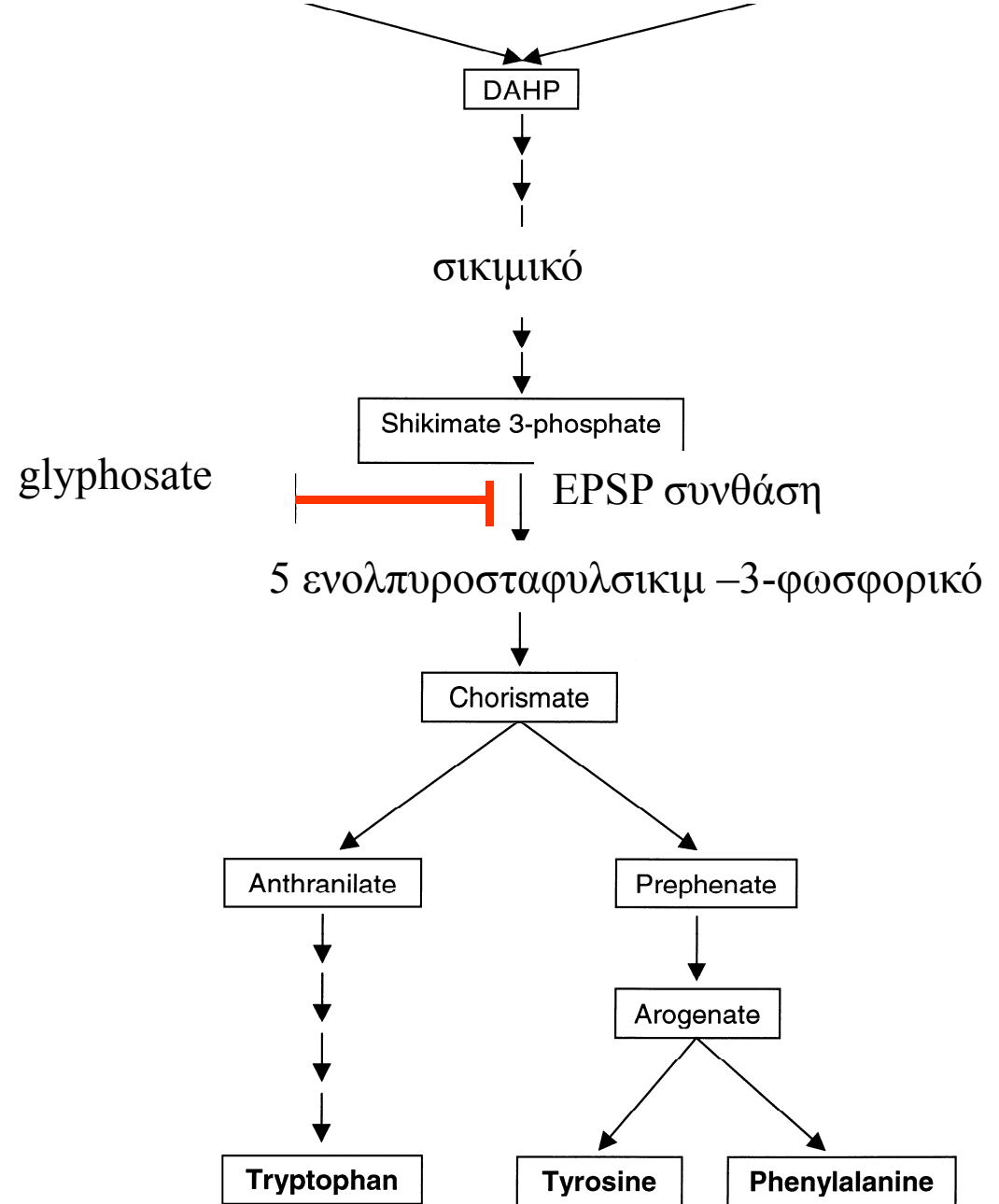


στρατηγική 1: εισαγωγή γονιδίων αποτοξικοποίησης
 βακτηριακής προέλευσης



Βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων

φωσφορική ερυθρόζη φωσφοενολπυροσταφυλικό οξύ





Roundup Ready Soybeans



Traditional Soybeans



Ανθεκτικότητα στο glyphosate

στρατηγική 2: υπερέκφραση μη τροποποιημένου φυτικού γονιδίου

CaMV 35S	Pet CTP	Petunia EPSP synthase cDNA	3' nos
----------	---------	----------------------------	--------

στρατηγική 3: υπερέκφραση τροποποιημένης πρωτεΐνης-στόχου



CaMV 35S	Pet CTP	Pet N	<i>E. coli</i> mutant EPSPS	3' nos
----------	---------	-------	-----------------------------	--------



CaMV E35S	CTP 4	Gly96Ala/ Pro101Ala <i>A. tumefaciens</i> CP4 mutant EPSPS	3' nos
-----------	-------	---	--------

Rice <i>actin</i>	Maize CTP	Maize mutant EPSPS T102I/ P106S	3' nos
-------------------	-----------	---------------------------------	--------



✓ Ανθεκτικότητα σε έντομα



Ανθεκτικότητα σε έντομα



εισαγωγή γονιδίων βακτηριακής προέλευσης

B. thuringiensis:

cry γονίδια - insecticidal crystal protein

(ICP/ Cry/ Bt/ δ-ενδοτοξίνη)



Στρατηγικές

εισαγωγή γονιδίων βακτηριακής προέλευσης



- προκαλούν ωσμωτική λύση επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού σωλήνα των εντόμων

Καμία επίπτωση σε άλλους οργανισμούς

- τουλάχιστον 40 διαφορετικές οικογένειες γονιδίων



Ανθεκτικότητα σε ιούς

- Με υπερέκφραση των CP (coat protein) σε διαγονιδιακά φυτά
- Anti-sense RNA/ Ribozymes
- Gene silencing



Διαγονιδιακά φυτα 2ης γενιάς



**Συσσωρευμένα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας
σε ζιζανιοκτόνα και έντομα**

- **SmartStax™ αραβόσιτος** (MON 89034 x TC1507 x MON 88017x DAS-59122-7)

- **RReady2Yield™ σόγια**



Εξάλειψη γονιδίων επιλογής (ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά)







“Εθνικά” προϊόντα

Π.χ. Bt Huahui-1 και Bt Shanyou Shanyou-63 ρύζι, Huazhong Agricultural
University, Κίνα

Bt βαμβάκι και Bt brinjal (eggplant) , Ινδία



Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”

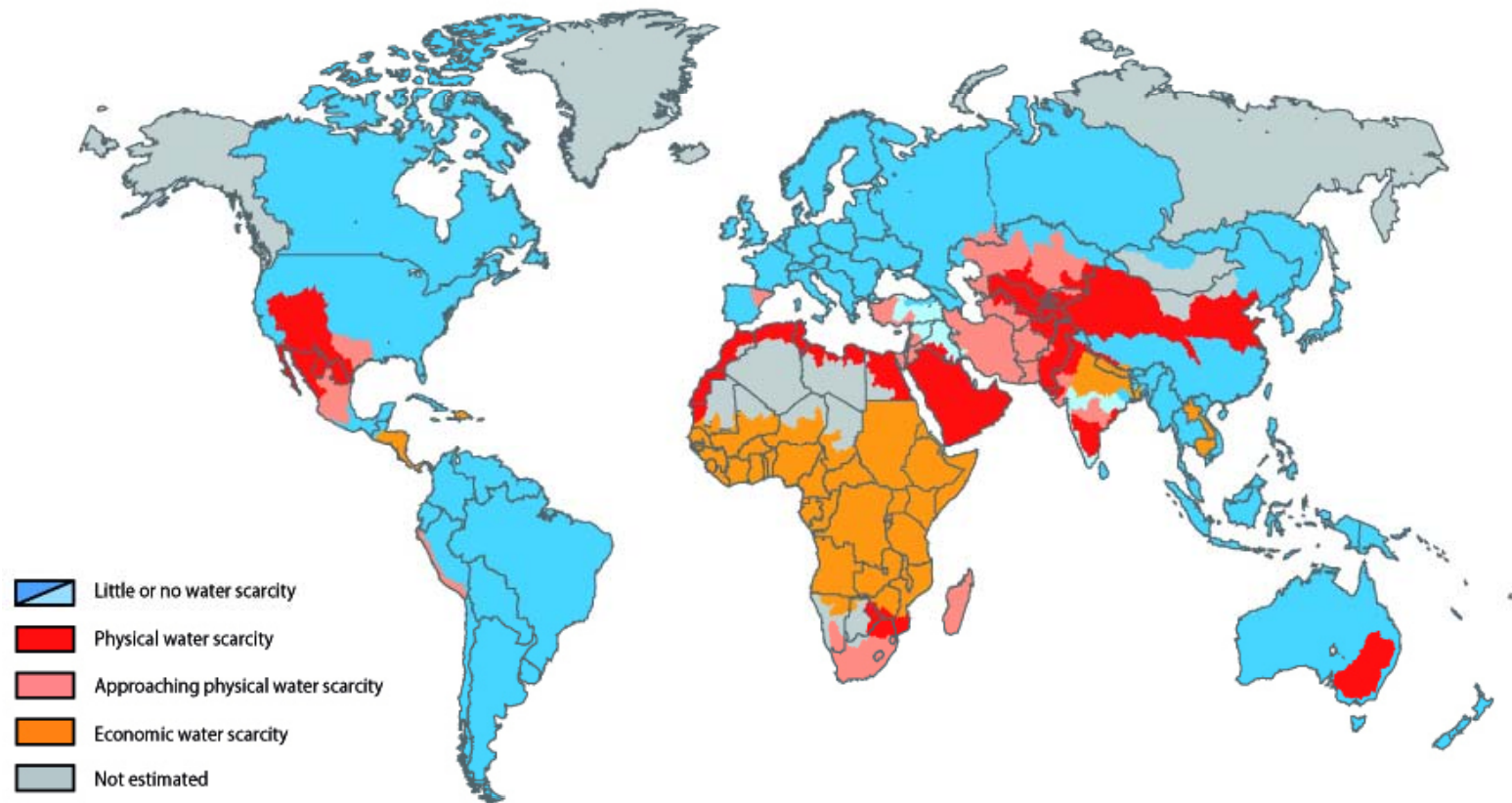
-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις: ξηρασία / αλατότητα / έλλειψη θρεπτικών στοιχείων – κυρίως N / P
-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε ασθένειες
-  Βιοκαύσιμα
-  Φυτοαπορρύπανση/ Φυτοαποκατάσταση

Περιβάλλον και Αειφορική Γεωργία



Η ανάπτυξη των φυτών αναστέλλεται από την ξηρασία

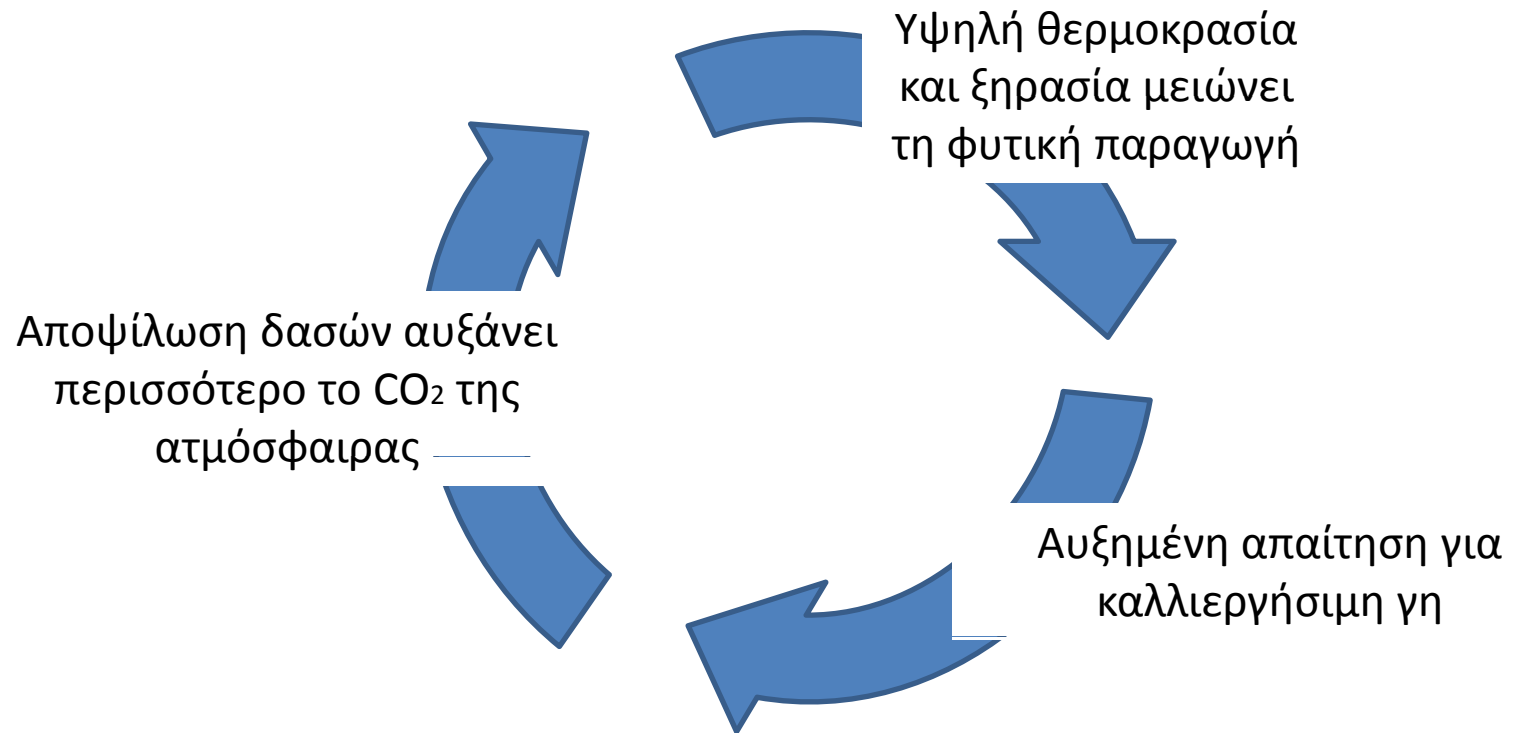
Areas of physical and economic water scarcity



Source: IAMI report, Insights from the Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture, 2006 / p8



Υπάρχει ανάγκη για καλλιέργεια φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης



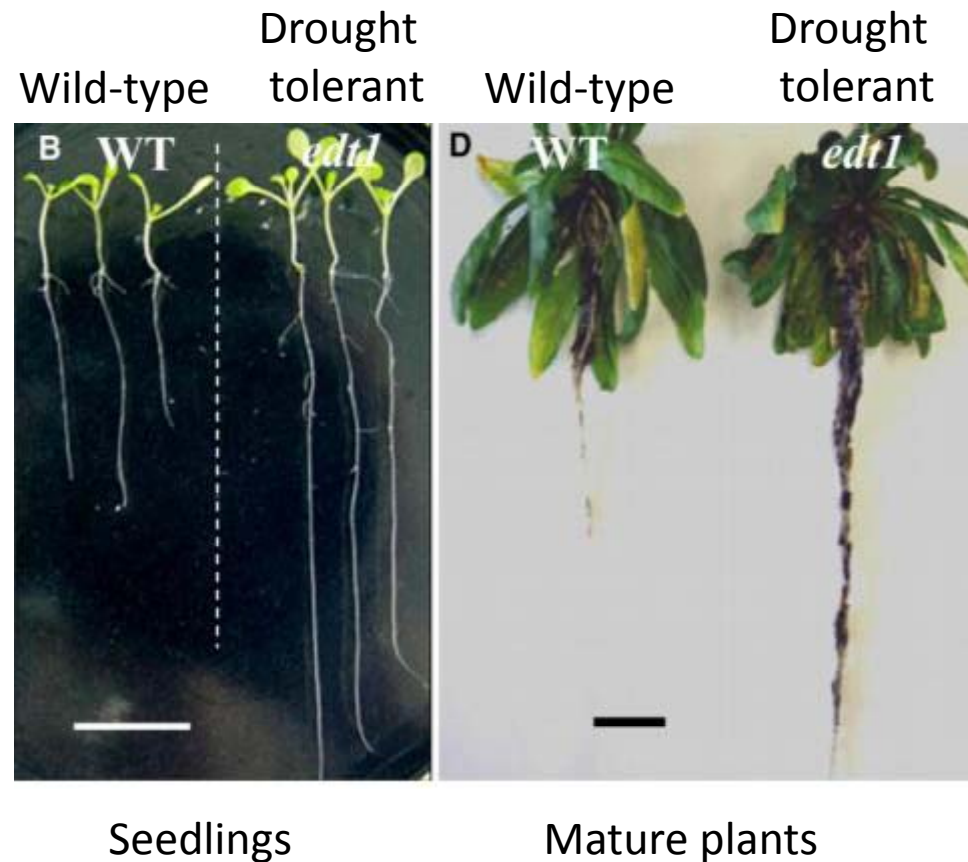
Η αλλαγή ενός και μόνο γονιδίου αυξάνει την αντοχή στην ξηρασία



Yu, H., Chen, X., Hong, Y.-Y., Wang, Y., Xu, P., Ke, S.-D., Liu, H.-Y., Zhu, J.-K., Oliver, D.J., Xiang, C.-B. (2008)
Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *Plant Cell* 20: [1134-1151](#).

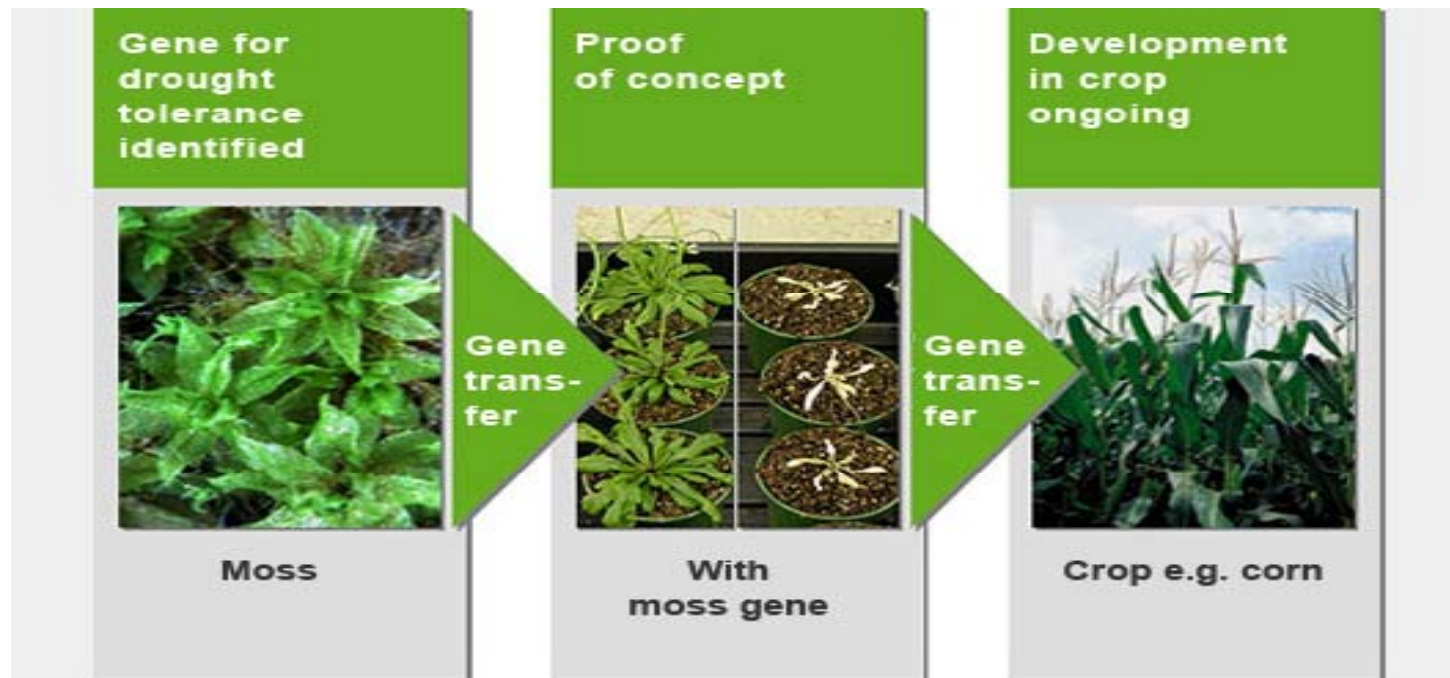


Ένα μεγαλύτερο ριζικό σύστημα συνεισφέρει στην αντοχή στην ξηρασία



Yu, H., Chen, X., Hong, Y.-Y., Wang, Y., Xu, P., Ke, S.-D., Liu, H.-Y., Zhu, J.-K., Oliver, D.J., Xiang, C.-B. (2008) Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *Plant Cell* 20:[1134-1151](#).





Π.χ. DroughtGard™ Hybrids system Monsanto, 2013 για καλλιέργεια σε U.S.A. Western Corn Belt

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization

Trait category ^a	Earlier R&D stages	Advanced R&D	Regulatory pipeline	Commercial pipeline	Commercial GM crops	Total by 2015 ^b
	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development		
Insect resistance	21	2	11	25	59	
Herbicide tolerance	11	5	4	13	33	
Product quality ^c	2	1	5	12	20	
Virus resistance	5	0	2	3	10	
Abiotic stress tolerance	0	0	1	6	7	
Other	0	0	2	11	13	

Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη

➔ Αραβόσιτος, ανθεκτικότητα σε ξηρασία (*cspB*, *Bacillus subtilis*)

**-Ρυζι, ανθεκτικότητα σε μύκητες / ιούς / ξηρασία/ αλατοτητα
 -Αραβόσιτος, αμυλάση/ φυτάση
 -Πατάτα, αμυλοπηκτίνη/ PYV ανθεκτικότητα**

**-Σογια, τροποποιημένα λιπαρα (ελαικο / στεαριδονικό – ω-3-) ανθεκτικότητα σε νηματώδεις
 -Πατατα ανθεκτικότητα σε μύκητες/ τροποποιημένο άμυλο
 -Golden Rice**



Τα πολυετή φυτά προσλαμβάνουν θρεπτικά στοιχεία και νερό καλύτερα από τα καλλιεργούμενα φυτά



Photo credit: Jodi Torpey, westerngardeners.com

Η διασταύρωση
καλλιεργούμενων φυτών
αυτά μπορεί να
ελαττώσει την εξάρτησή
τους σε νερό και
λιπάσματα

Thinopyrum intermedium



Η λίπανση είναι μια ενεργοβόρα λύση

- Τα καλλιεργούμενα φυτά χρειάζονται λίπανση- κάλιο, φώσφορο, άζωτο και άλλα θρεπτικά στοιχεία
- Το κάλιο και ο φώσφορος είναι μη ανανεώσιμα
- Η σύνθεση των αζωτούχων λιπασμάτων είναι ενεργοβόρα

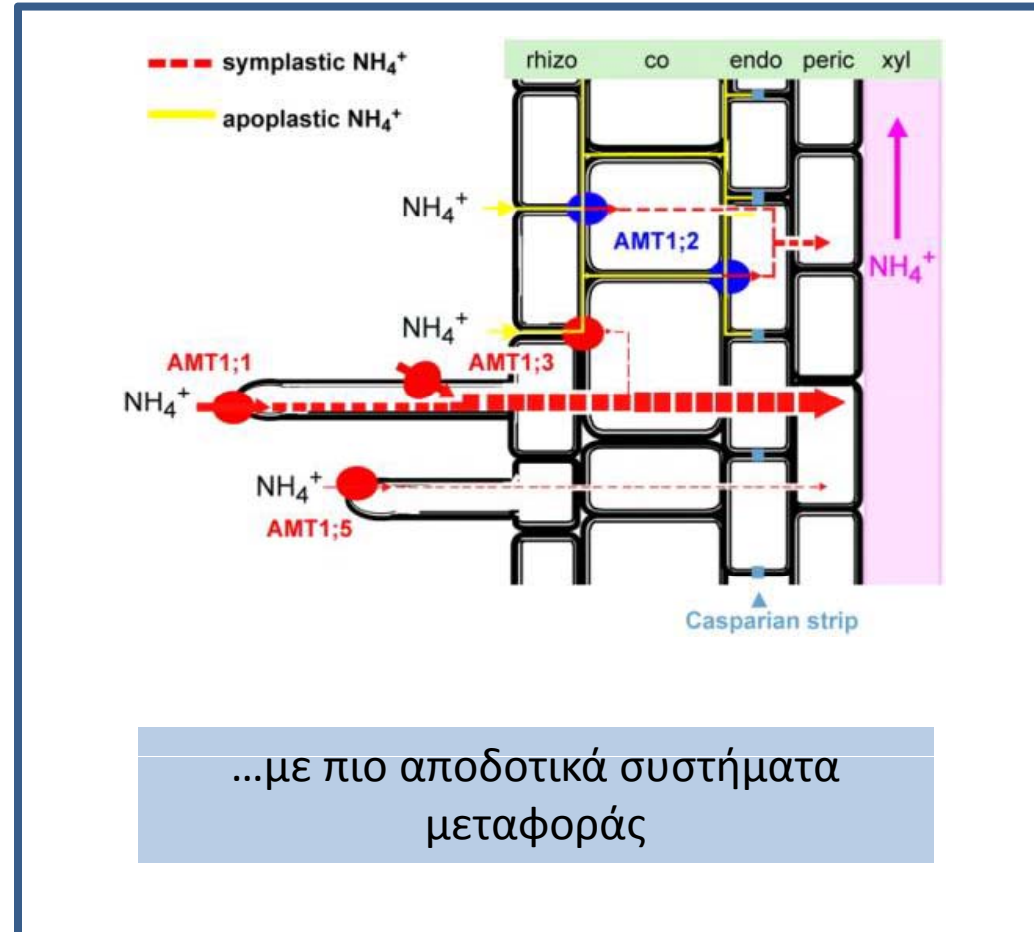


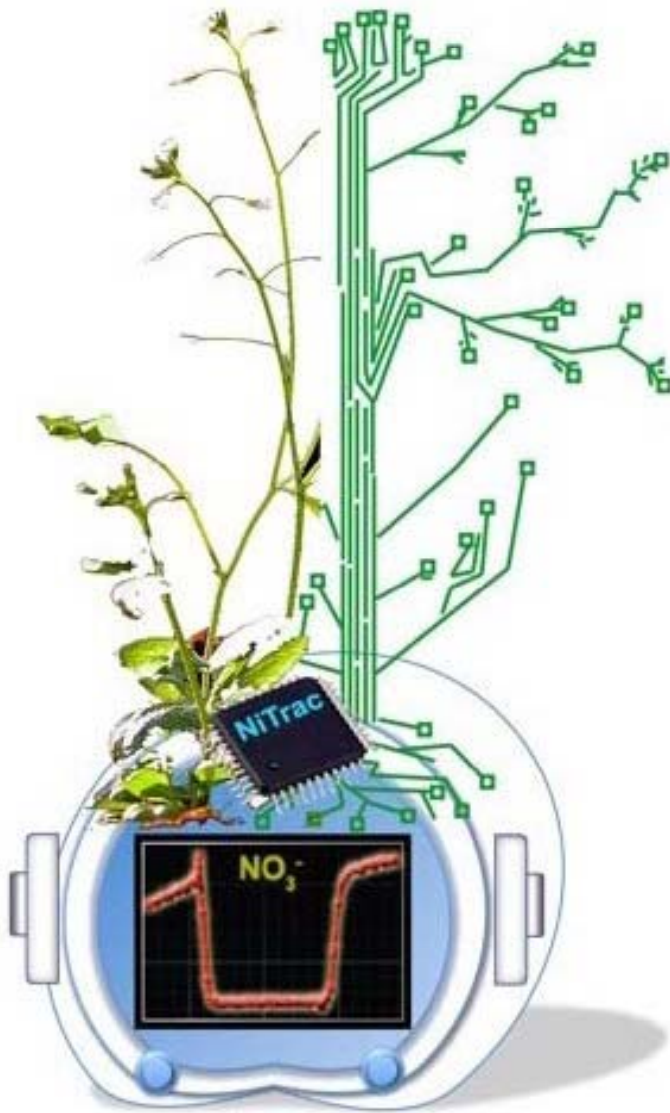
Photo credits: Mining Top News; Library of Congress, Prints & Photographs Division, FSA-OWI Collection, [LC-USZ61-374](#)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Η πρόσληψη θρεπτικών από ειδικούς μεταφορείς μπορεί να βελτιωθεί









...με τη δημιουργία βιο-αισθητήρων

Οι ανάγκες του φυτού υπό τις διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος μπορούν να καταγράφονται και να γίνεται ανάλογη προσαρμογή στη διαχείριση των καλλιεργειών



Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”

-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις: ξηρασία / αλατότητα / έλλειψη θρεπτικών στοιχείων – κυρίως N / P
-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε ασθένειες
-  Βιοκαύσιμα
-  Φυτοαπορρύπανση/ Φυτοαποκατάσταση

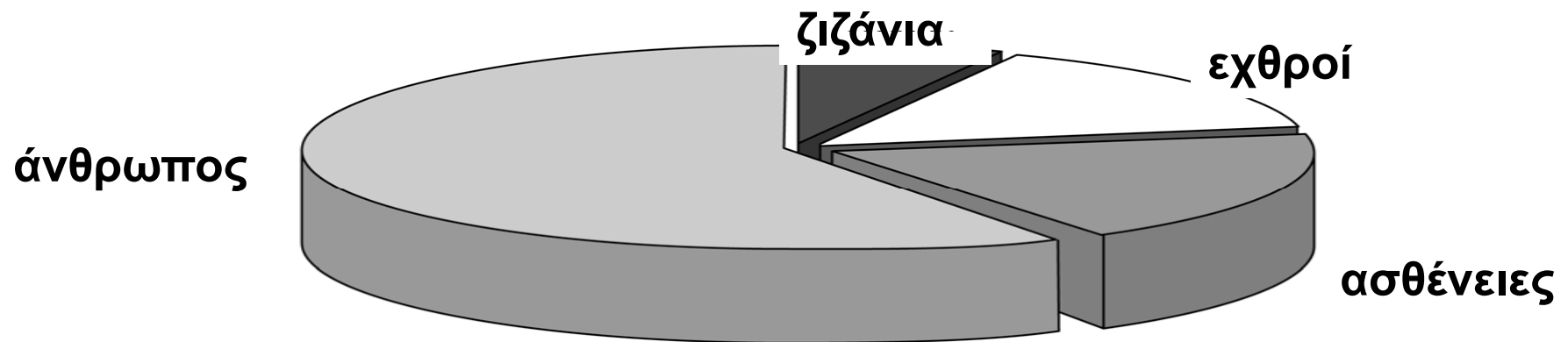
Περιβάλλον και Αειφορική Γεωργία



Στοιχεία της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”



Αγρονομικά χαρακτηριστικά:
ανθεκτικότητα σε ασθένειες (μύκητες, βακτήρια, ιοί)

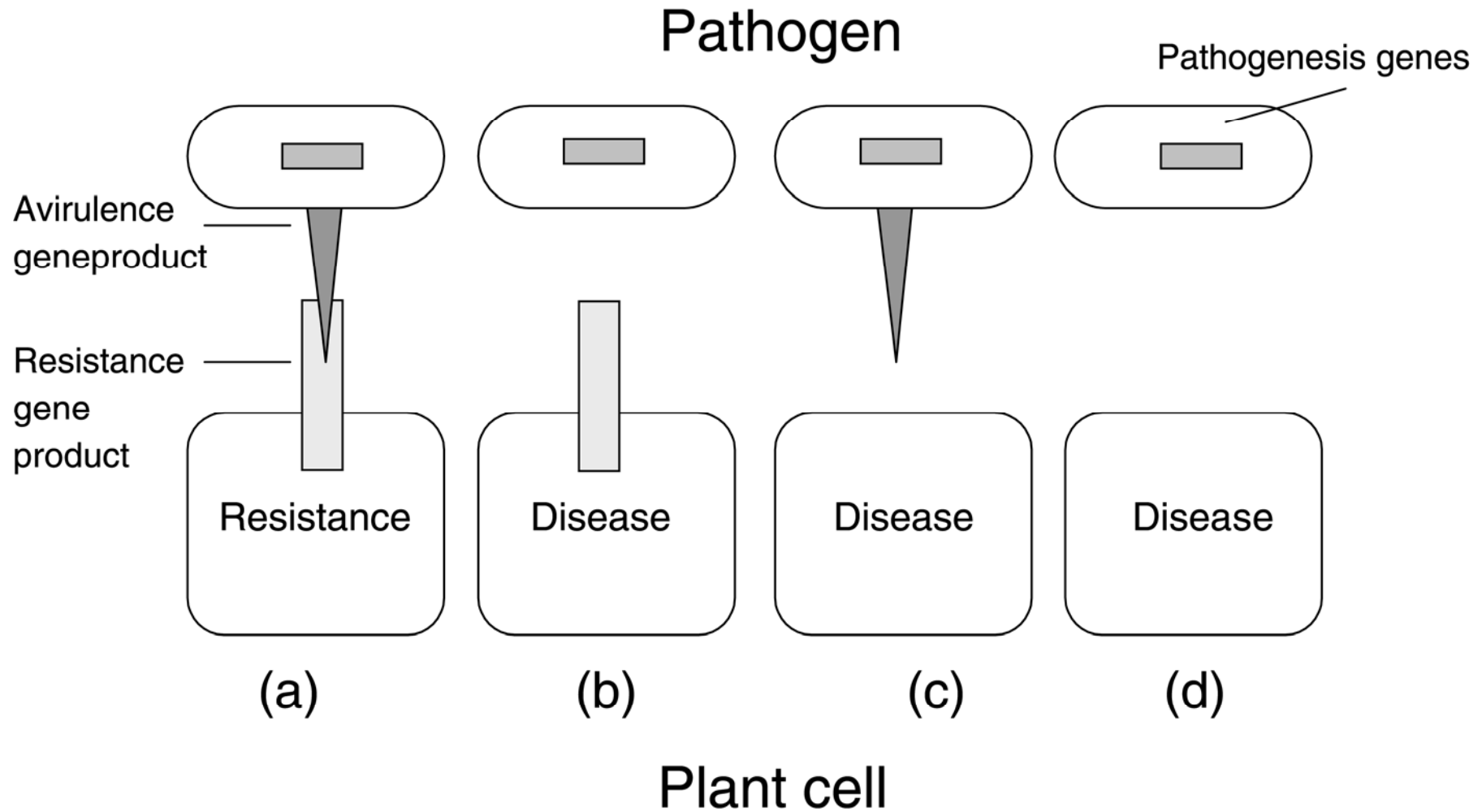


Φυσική άμυνα φυτών

- Ανατομικά χαρακτηριστικά (φελλοί, κηροί κ.τ.λ.)
- Προσχηματισμένοι μεταβολίτες και χημική προστασία (αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, π.χ.defensins, δευτερογενείς μεταβολίτες, φυτοαντισιπίνες και φυτοαλεξίνες)
- Επαγώμενα συστήματα
- Διασυστηματική αντοχή

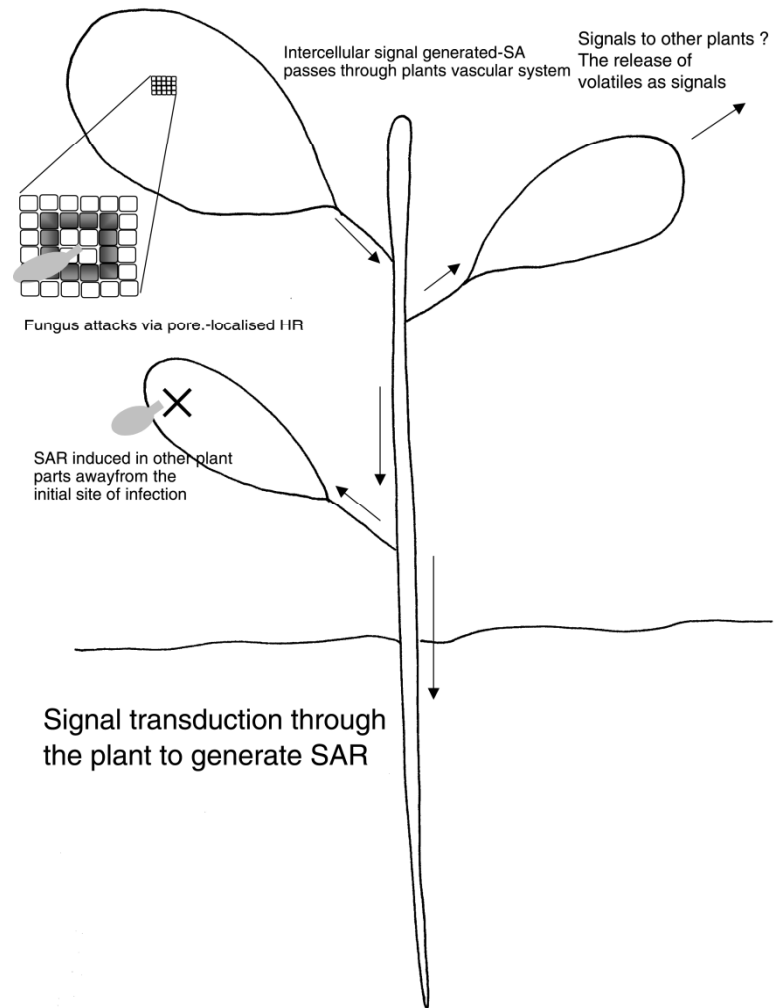


Γονίδια ανθεκτικότητας R και αντίδραση υπερευαισθησίας HR



Διασυστηματική αντοχή

- Επίκτητη ανθεκτικότητα (SAR)
- Επαγόμενη ανθεκτικότητα (ISR)



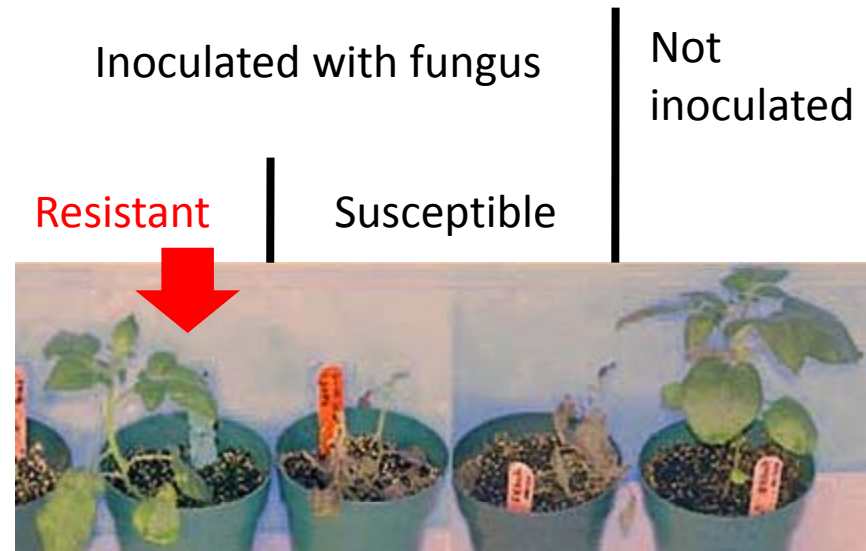
Στρατηγικές για “διαρκή” ανθεκτικότητα

- “πυραμίδα” R γονιδίων (marker-assisted selection)

π.χ. *Oryza sativa* – *Xanthomonas oryzae pv oryzae*, Υπερέχοντα γονίδια *Χα21*, *Χα4* και υποτελή *χα5*, *χα13*

- στόχος συντηρημένοι avirulence loci

π.χ. *Bs2-anrBs2*, πιπεριά-
Xanthomonas campestris pv. vesicatoria



Phytophthora infestans -
πατάτα



Puccinia graminis tritici-
σιτάρι

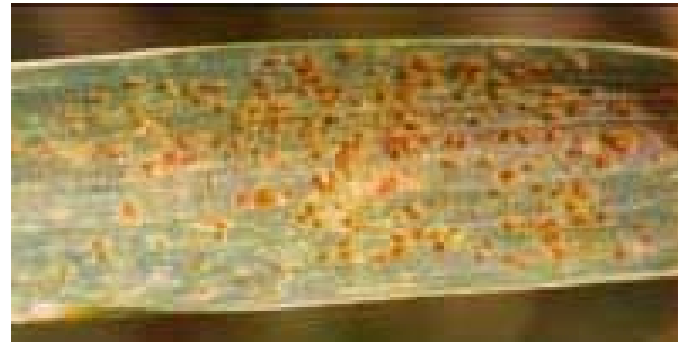


Photo credits: www.news.cornell.edu; www.fao.org



Μετασυλλεκτική φυσιολογία



Photo credits: [Cornell University](#) ; [ARC](#)

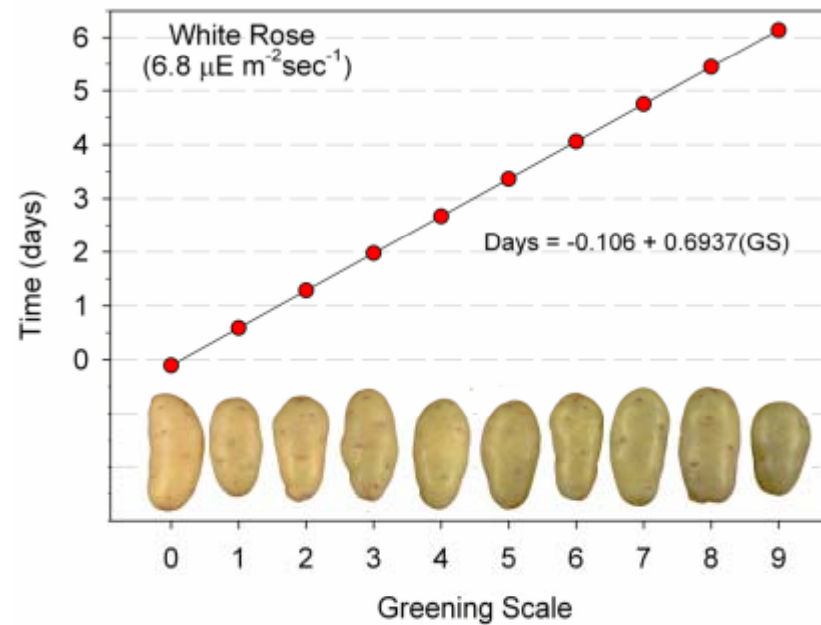
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Μετασυλλεκτικές
απώλειες φτάνουν το
50% της παραγωγής



Aspergillus mold growing on corn kernels.



«πρασίνισμα» πατάτας λόγω της
σολανίνης, τοξική σε μεγάλες
ποσότητες

Photo credits: [Dr. C.M. Christensen, Univ. of Minnesota.](#); [WSU](#); [Pavalista, A.D. 2001](#)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization

Trait category ^a	Earlier R&D stages	Advanced R&D	Regulatory pipeline	Commercial pipeline	Commercial GM crops	Total by 2015 ^b
	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development		
Insect resistance	21	2	11	25		59
Herbicide tolerance	11	5	4	13		33
Product quality ^c	2	1	5	12		20
Virus resistance	5	0	2	3		10
Abiotic stress tolerance	0	0	1	6		7
Other	0	0	2	11		13

Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη





Αραβόσιτος, ανθεκτικότητα σε ξηρασία (*cspB*, *Bacillus subtilis*)

**-Ρυζι, ανθεκτικότητα σε μύκητες / ιούς / ξηρασία/ αλατοτητα
 -Αραβόσιτος, αμυλάση/ φυτάση
 -Πατάτα, αμυλοπηκτίνη/ PYV ανθεκτικότητα**

**-Σογια, τροποποιημένα λιπαρά (ελαϊκό / στεαριδονικό – ω-3-)
 ανθεκτικότητα σε νηματώδεις
 -Πατάτα ανθεκτικότητα σε μύκητες/ τροποποιημένο άμυλο
 -Golden Rice**



Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”

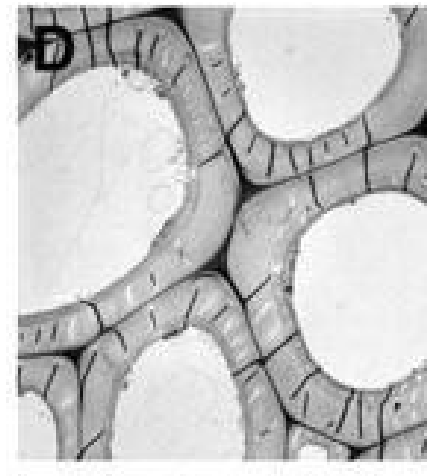
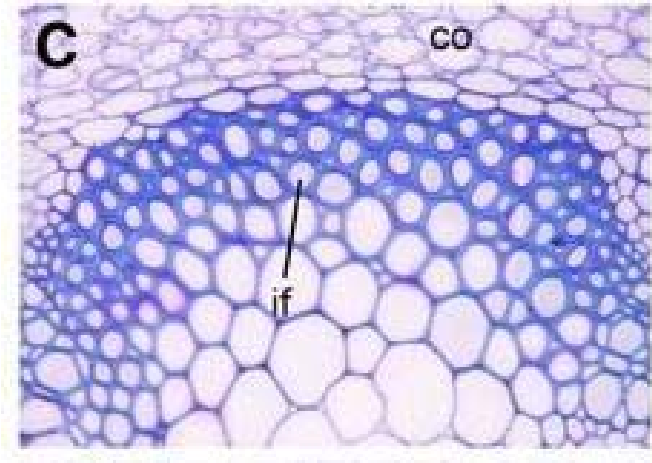
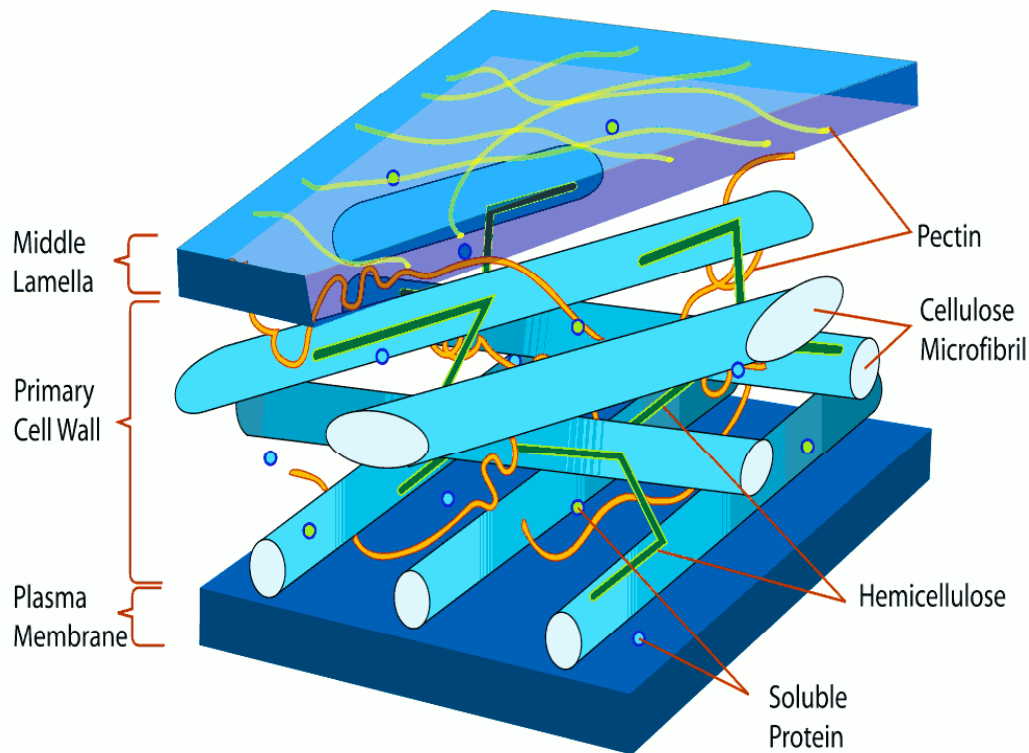
-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις: ξηρασία / αλατότητα / έλλειψη θρεπτικών στοιχείων – κυρίως N / P
-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε ασθένειες
-  Βιοκαύσιμα
-  Φυτοαπορρύπανση/ Φυτοαποκατάσταση

Περιβάλλον και Αειφορική Γεωργία



Κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων

Αποτελούνται κυρίως από υδατάνθρακες και πρωτεΐνες.

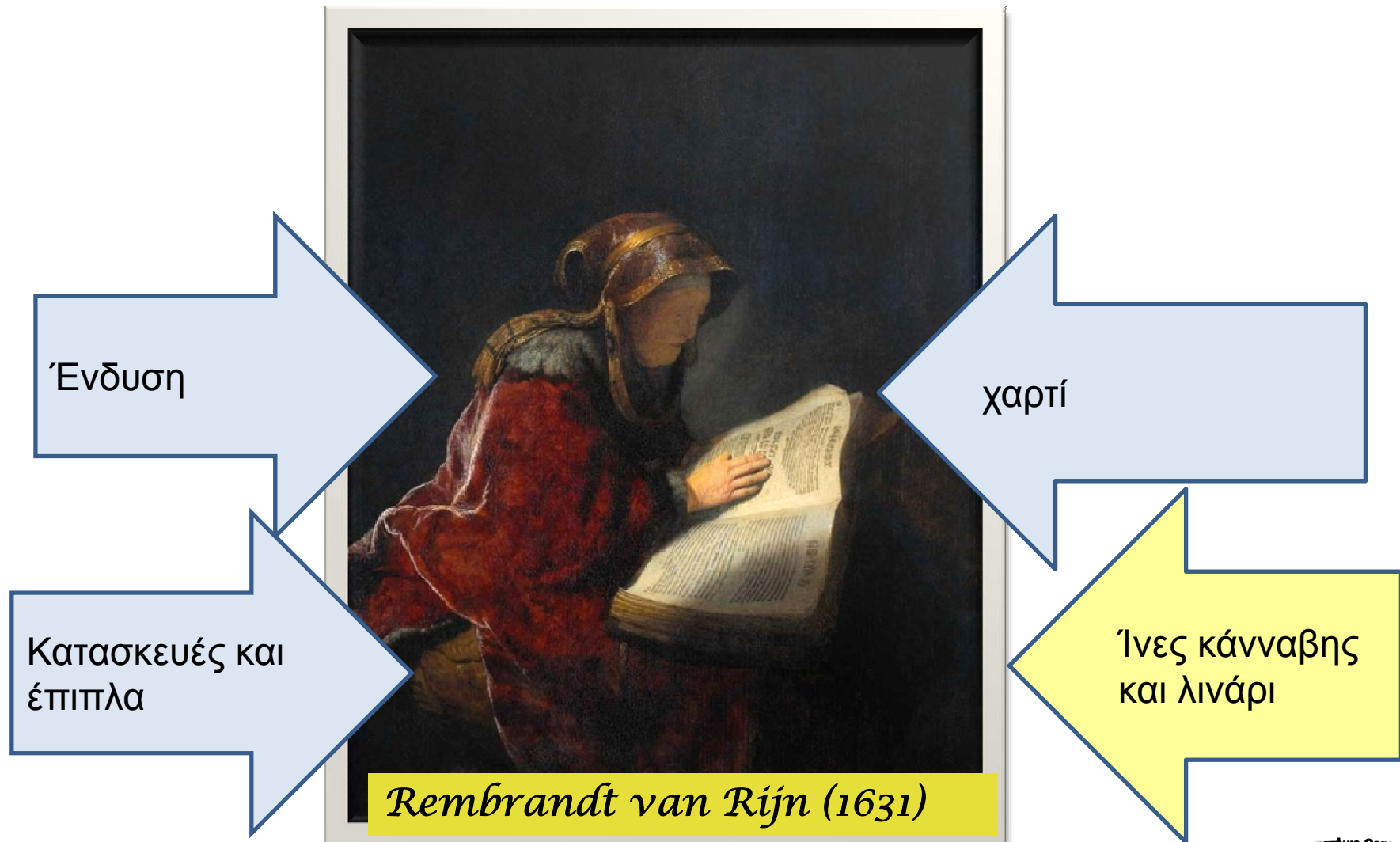


Το δευτερογενές τοίχωμα περιλαμβάνει λιγνίνη

credit: www.wpclipart.com/plants; Zhong, R., et al., (2008) Plant Cell 20:2763-2782 .



Το ξύλο αποτελεί βασική πρώτη ύλη με πολλαπλές χρήσεις



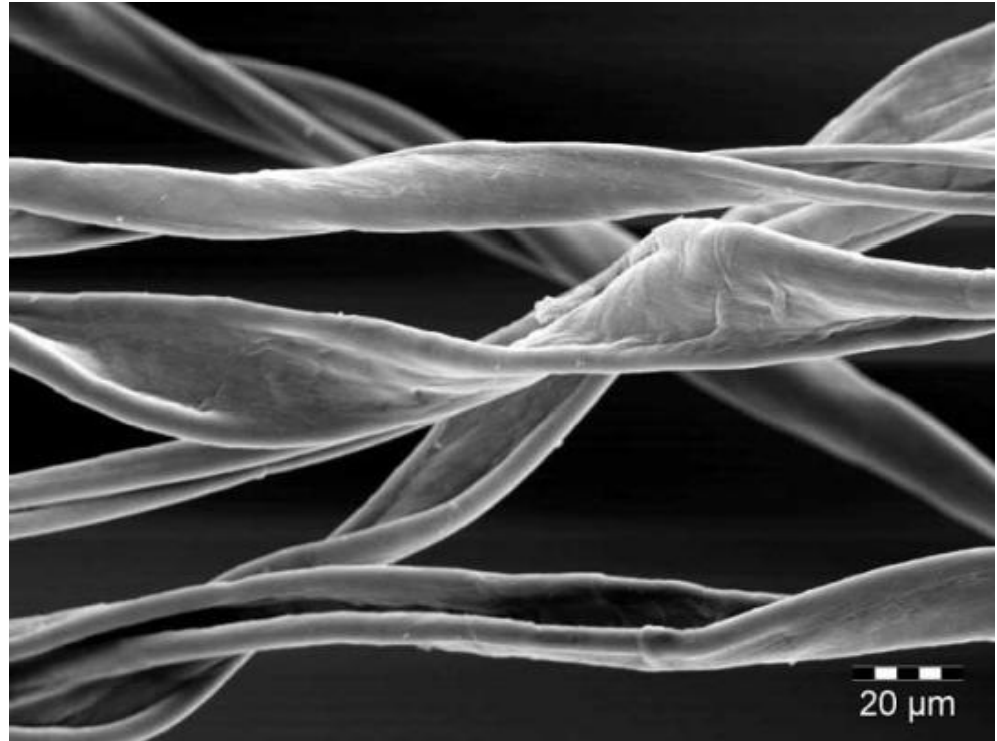


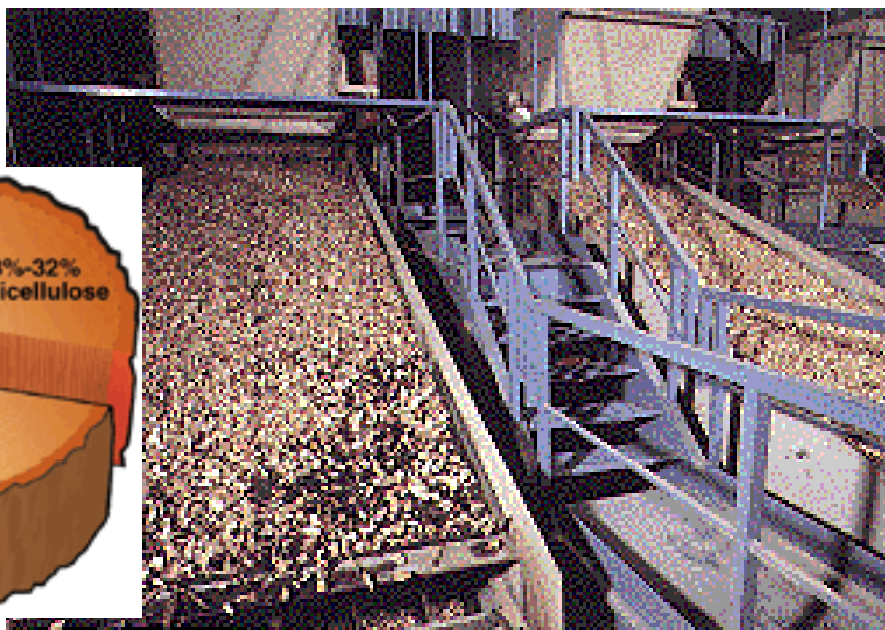
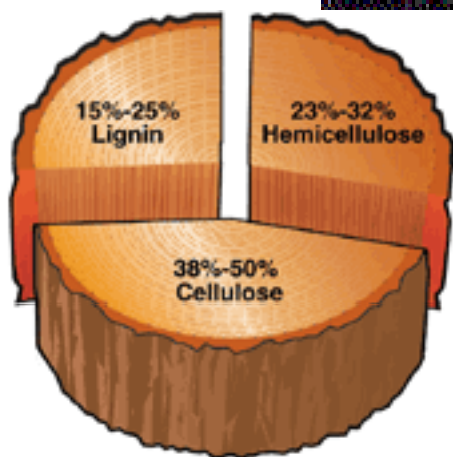
Photo credits: [Chen Lab](#); [IFPC](#)

Ποικιλίες βαμβακιού επιλέγονται σε προγράμματα βελτίωσης για ανθεκτικότητα σε εχθρούς και καλύτερη ποιότητα ίνας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Το γονιδίωμα της λεύκας είναι διαθέσιμο



Pulp bleaching

The dark colour of the pulp is mainly due to residual lignin. This is removed gradually during bleaching.

After cooking O_2 Bleaching



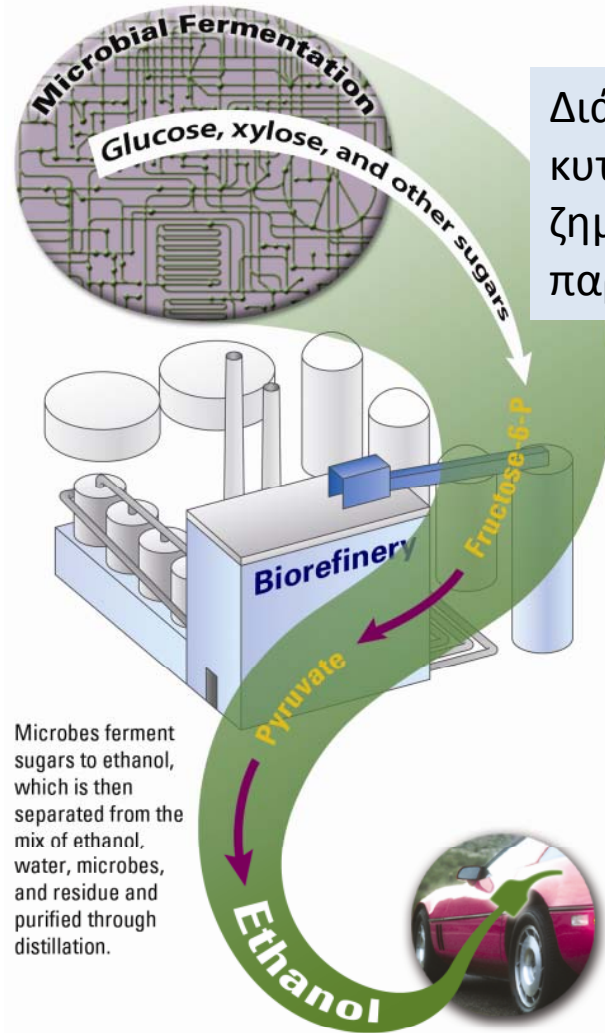
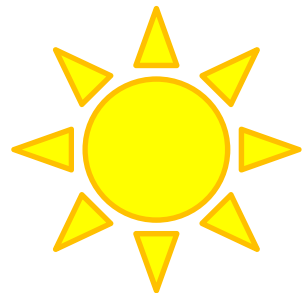
Photo credit: ChmlTech.com



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



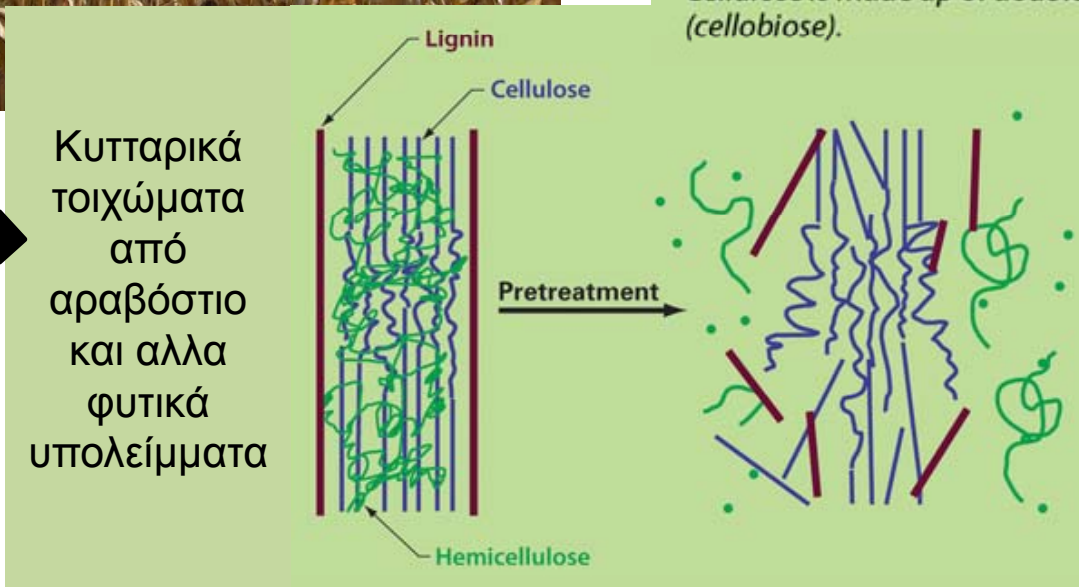
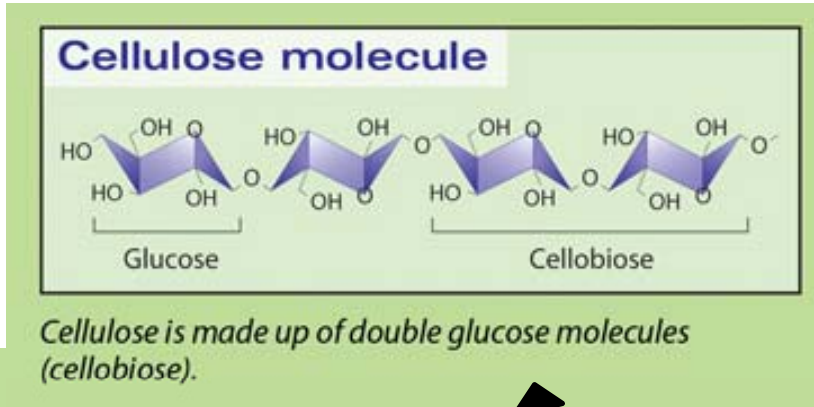
Βιοκαύσιμα- Αιθανόλη



Διάφορα σάκχαρα και κυτταρίνη μπορούν να ζημωθούν προς παραγωγή αιθανόλης

Image source: [Genome Management Information System, Oak Ridge National Laboratory](http://www.genome.gov)





Ethanol

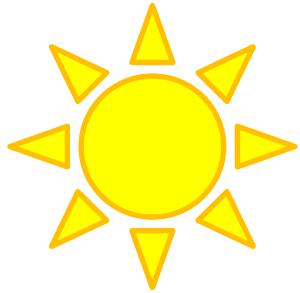


Image source: Genome Management Information System, Oak Ridge National Laboratory

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Βιοκαύσιμα-Βιοντιζελ



Παραγωγή βιοντίζελ από ελαιοκομικά φυτά
(σόγια, ελαιοκράμβη, άλγες)



Image sources: [Tilo Hauke](#), University of Minnesota, Iowa State University Extension.



Τα «ενεργειακά» φυτά διαφέρουν ως προς το περιεχόμενό τους σε χρήσιμες πρώτες ύλες για παραγωγή βιοκαυσίμων

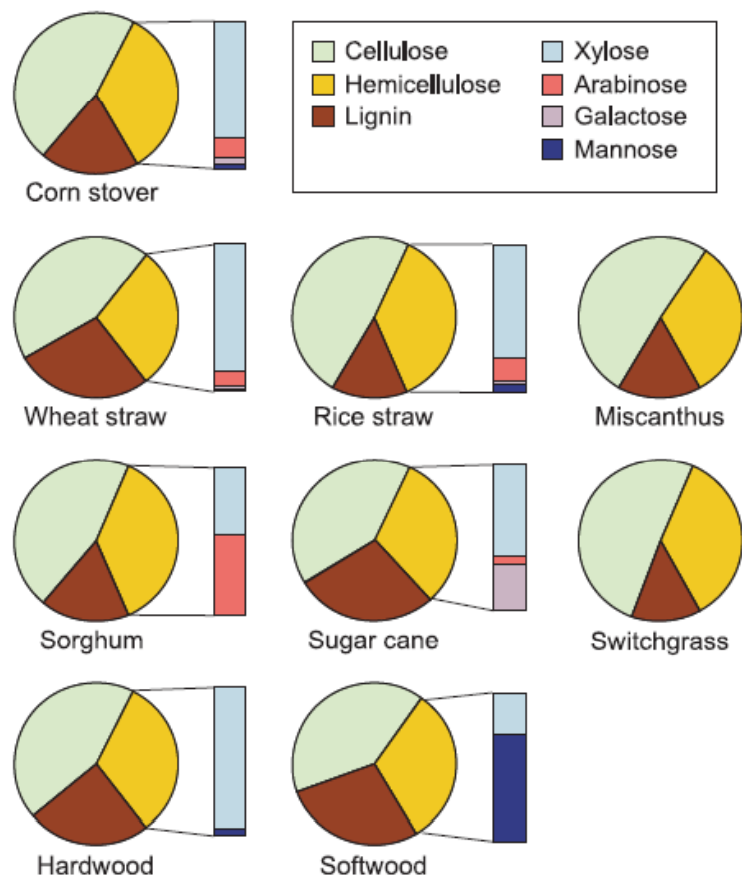




Photo Illustration courtesy S. Long Lab, University of Illinois, 2006

Miscanthus giganteus:
ένα ενεργειακό φυτό που
αναπτύσσεται ταχύτατα
και καλλιεργείται σε
εδάφη ακατάλληλα για
φυτά-παραγωγείς
τροφής






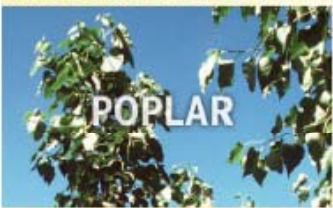
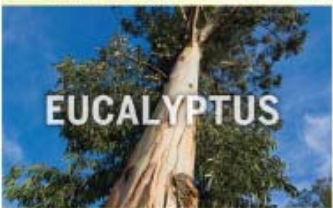

Από την παραγωγή βιοκαυσίμων μπορούν να παραχθούν και πολλά άλλα
προϊόντα αυξημένης προστιθέμενης αξίας
(με την περίσσεια της βιομάζας πχ αξιοποίηση λιγνίνης)



Primary Product

'Value Added' Products



Plant resource	% Hemicellulose	% Cellulose	% Lignin*
 MISCANTHUS	24-33	45-52	9-13
 SWITCHGRASS	26-33	37-32	17-18
 CORN STOVER	31	37	18
 POPLAR	16-22	42-48	21-27
 EUCALYPTUS	24-28	39-46	29-32
 PINE	23	46	28

*Typical aromatic polymer containing:

Syringyl

Cc1cc(C)cc(OC)c1

Guaiacyl

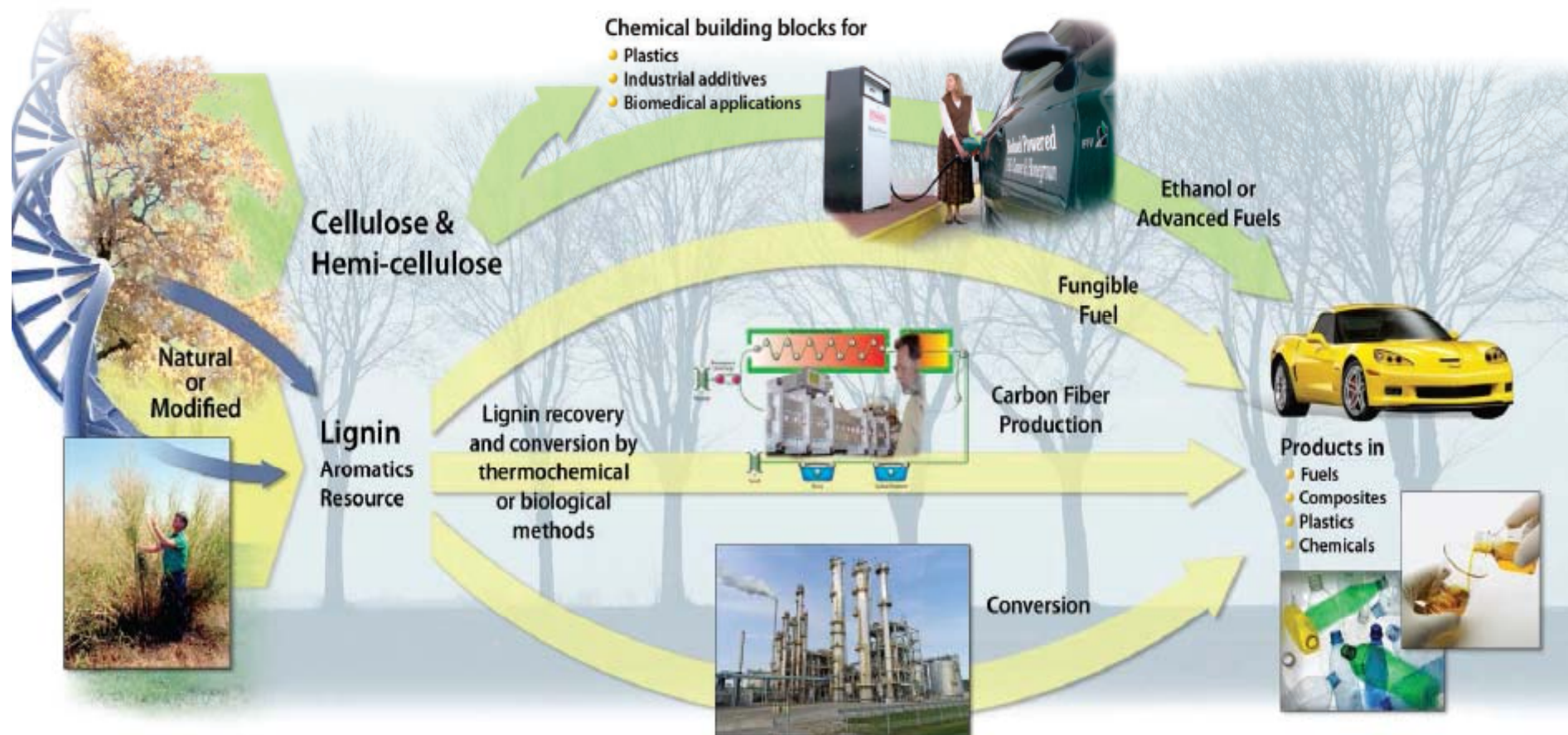
Cc1cc(OC)ccc1

Hydroxyphenyl

Oc1ccccc1

Depending on the bioreource and isolation methodology, molecular weights for native lignin have been reported from 78,400 [in spruce (118)] to 8300 [in Miscanthus (119)] g mol⁻¹, which are derived from C9 monolignols as described in Fig. 2.





Ragauskas et al, 2014



Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”



Φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά ποιότητας
(βιοεμπλουτισμός σε βιταμίνες, σίδηρο κ.α.)



Φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά απόδοσης

τροποποίηση μεταβολισμού



Η κακή διατροφή και η έλλειψη τροφής: ένα παγκόσμιο πρόβλημα

In 2004, 60 million people worldwide died.

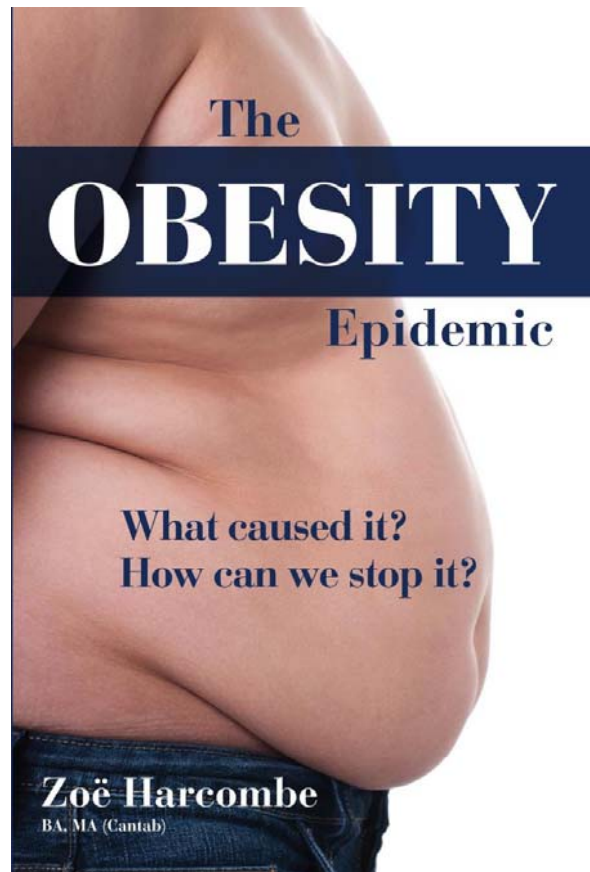
10 million of them were children under 5 years of age, of which 99% lived in low- or middle-income countries

5 million children under the age of 5 die each year due to **undernutrition** and related causes. **That's one preschool-aged child dying a preventable death every six seconds.**

A lack of adequate vitamin A kills one million children a year



.....Και η άλλη όψη του νομίσματος



Βελτίωση του περιεχομένου σε θρεπτικά συστατικά στα φυτά μπορεί να βοηθήσει την έλλειψη / κακή διατροφή

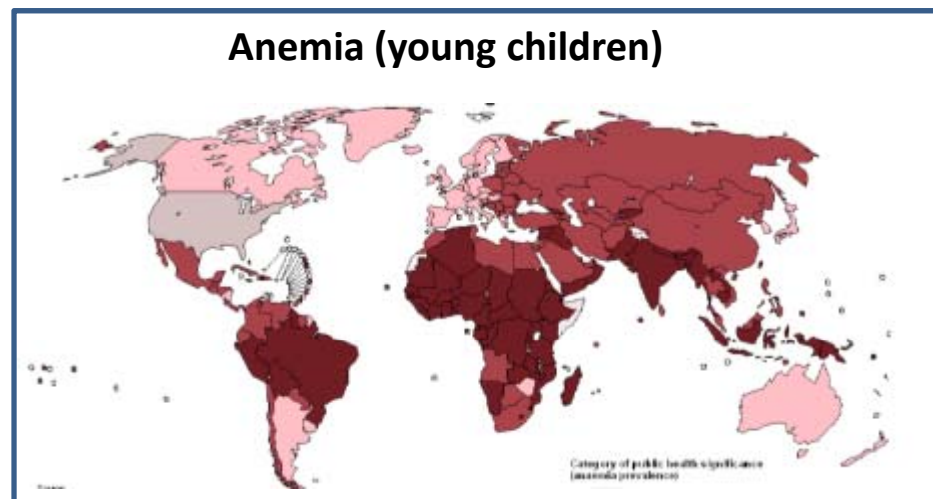
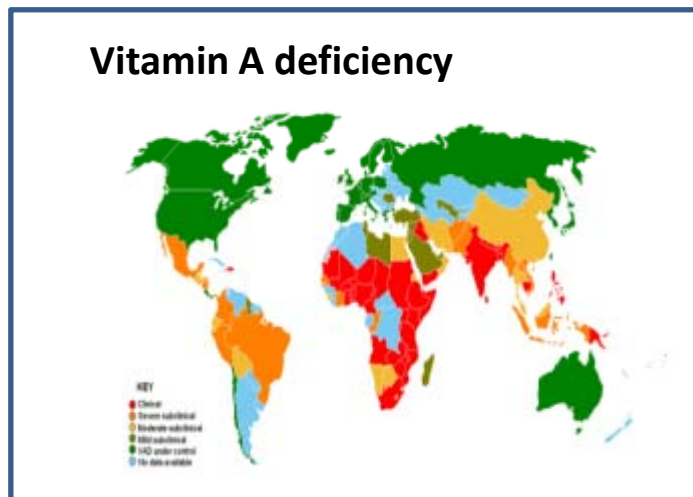
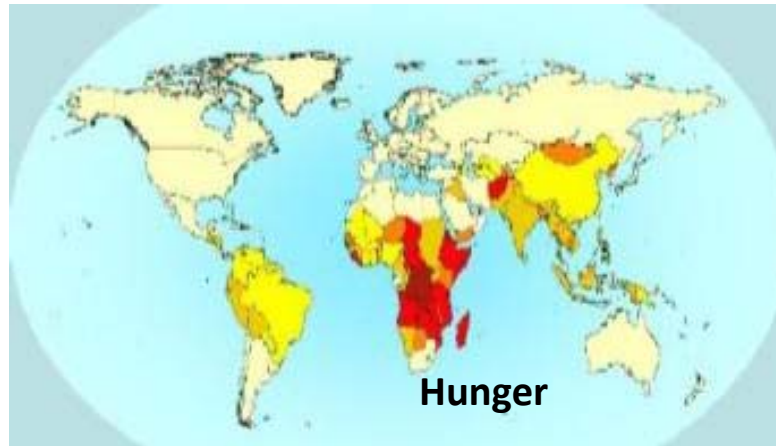


Image sources: [Petaholmes](#) based on [WHO data](#); [WHO](#)



Cassava: η βασική τροφή στην Αφρική είναι φτωχή σε θρεπτικά συστατικά

Ποικιλία ευρέως καλλιεργούμενη



Νέα ποικιλία με αυξημένη παραγωγή βιταμίνης A



Εμπλουτισμός με γενετική τροποποίηση



Ρύζι με αυξημένη
συγκέντρωση σιδήρου

Golden Rice



Ντομάτες με αυξημένη
συγκέντρωση αντιοξειδωτικών
ανθοκυανινών

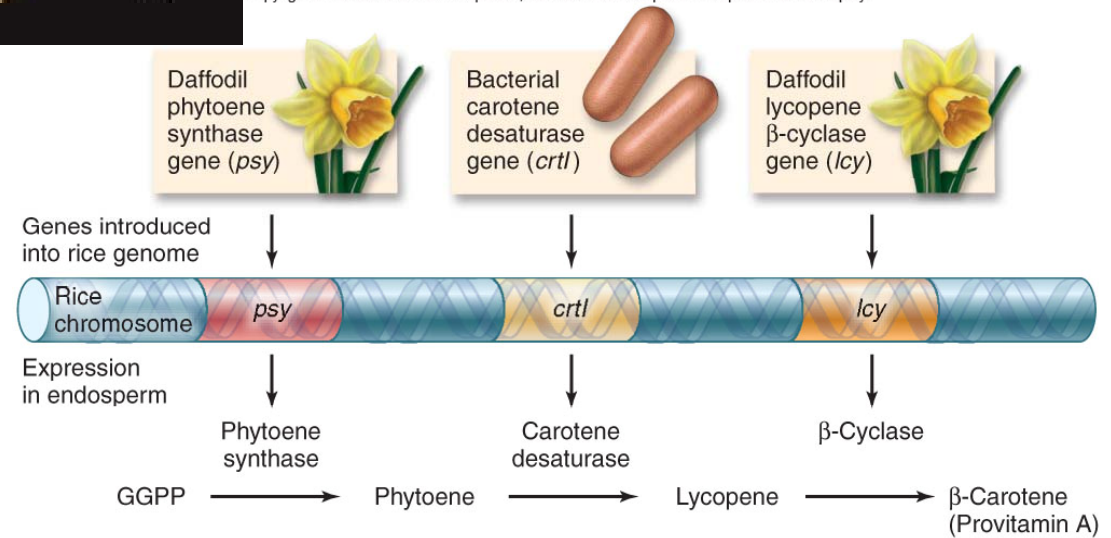
Photo credits: [Golden Rice Humanitarian Board](#) © 2007; Credit: [ETH Zurich / Christof Sautter](#); Reprinted by permission from Macmillan Publishers, Ltd: Butelli, E., et al., Nature Biotechnology 26, [1301 - 1308](#) copyright (2008).

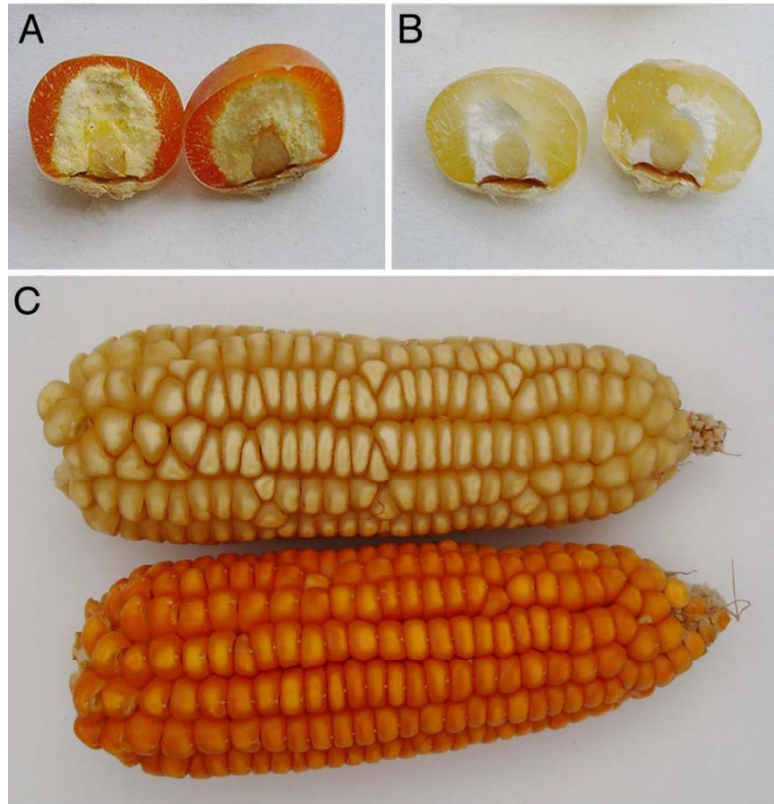




= 25 mg/g β -carotene
 + εμπλουτισμός σε
 βιταμίνη E και σίδηρο

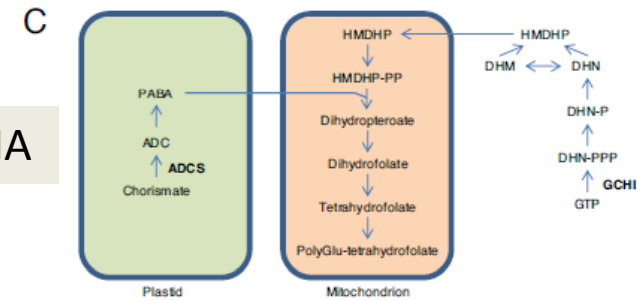
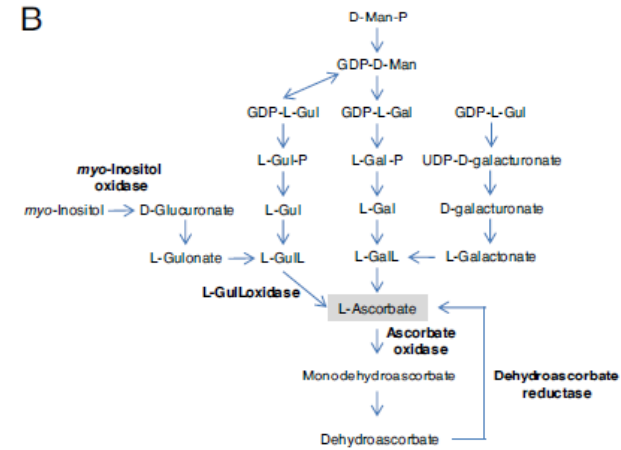
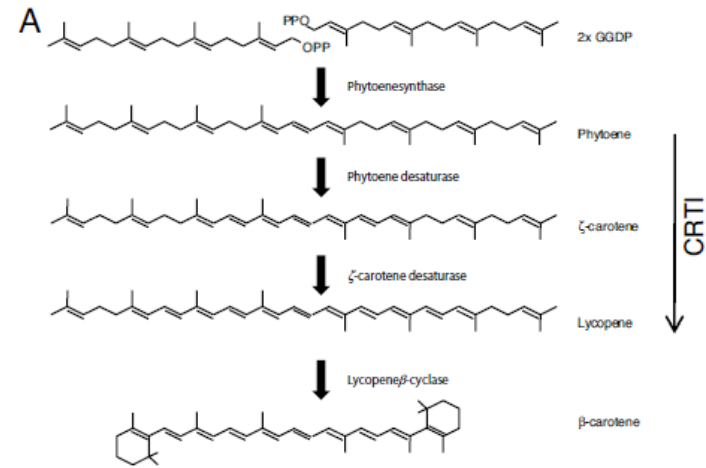
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.





**Αύξηση 169X στην ποσότητα α-καροτενίου,
6X ασκορβικού οξέος και 2X φολικού οξέος**

Μέσω σπονδυλωτής μεταφοράς DNA

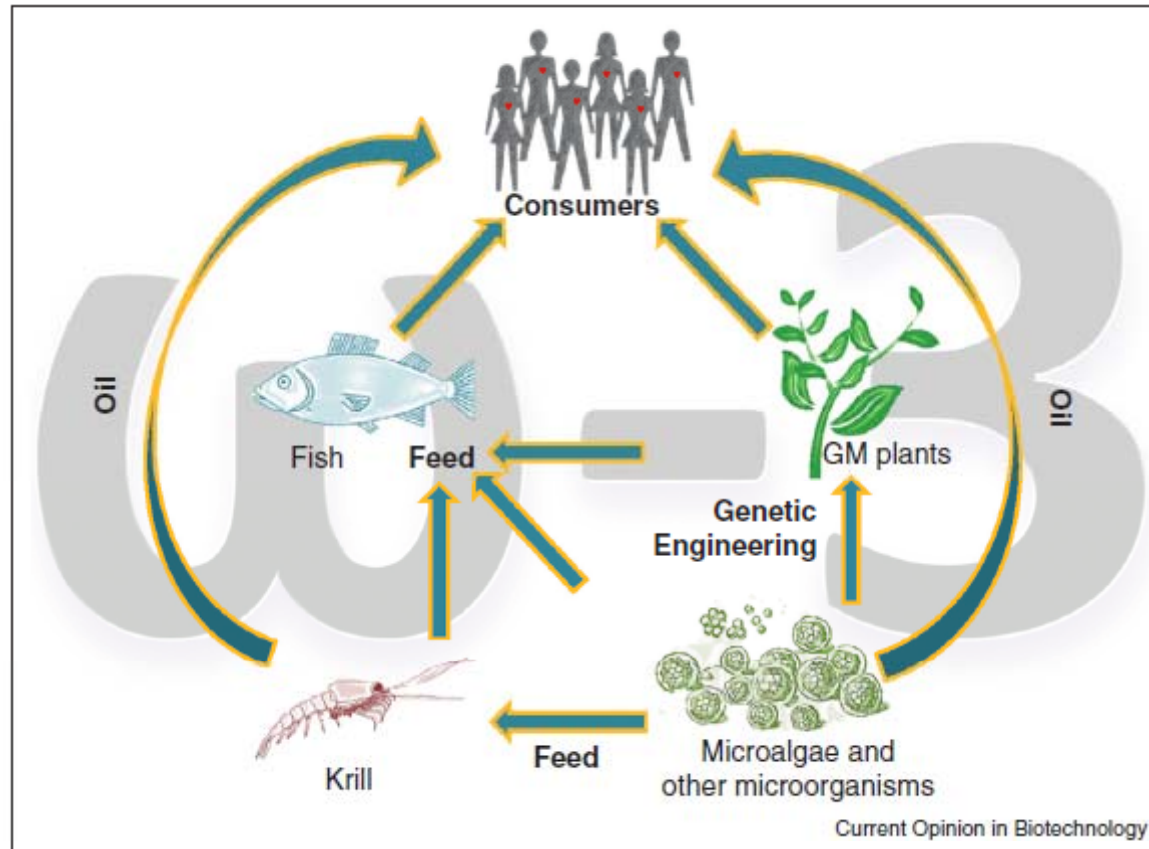


Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors



NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 26 NUMBER 11 NOVEMBER 2008

Παραγωγή ω -3 και ω-6 λιπαρών οξέων σε διαγονιδιακά φυτά



C20:5 eicosapentaenoic acid (EPA) and C22:6 docohexaenoic acid (DHA)



Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization

Trait category ^a	Earlier R&D stages	Advanced R&D	Regulatory pipeline	Commercial pipeline	Commercial GM crops	Total by 2015 ^b
	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development		
Insect resistance	21	2	11	25		59
Herbicide tolerance	11	5	4	13		33
Product quality ^c	2	1	5	12		20
Virus resistance	5	0	2	3		10
Abiotic stress tolerance	0	0	1	6		7
Other	0	0	2	11		13

➔ Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη

Αραβόσιτος, ανθεκτικότητα σε ξηρασία (*cspB*, *Bacillus subtilis*)

-Ρυζι, ανθεκτικότητα σε μύκητες / ιούς / ξηρασία/ αλατοτητα
 -Αραβόσιτος, αμυλάση/ φυτάση
 -Πατάτα, αμυλοπηκτίνη/ ΡΥV ανθεκτικότητα

➔ -Σογια, τροποποιημένα λιπαρά (ελαϊκό / στεαριδονικό – ω-3-) ανθεκτικότητα σε νηματώδεις

-Πατάτα ανθεκτικότητα σε μύκητες/ τροποποιημένο άμυλο

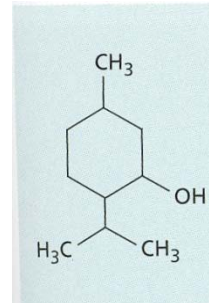
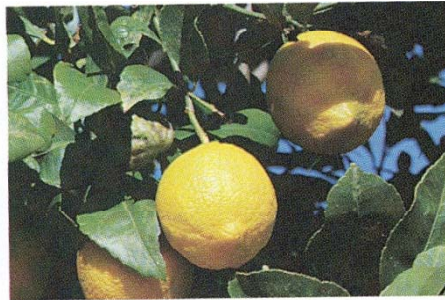
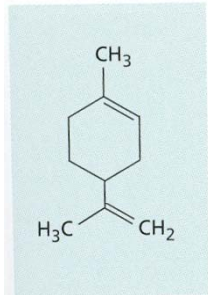
➔ -Golden Rice



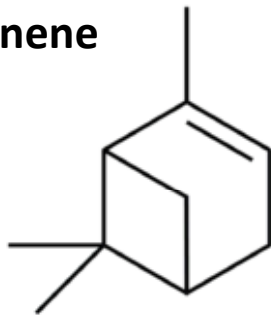
Φυσικά προϊόντα- εξειδικευμένοι μεταβολίτες των φυτών



Τερπένια



Pinene



Eucalyptol

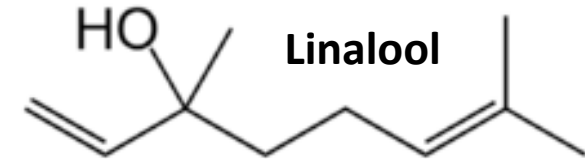
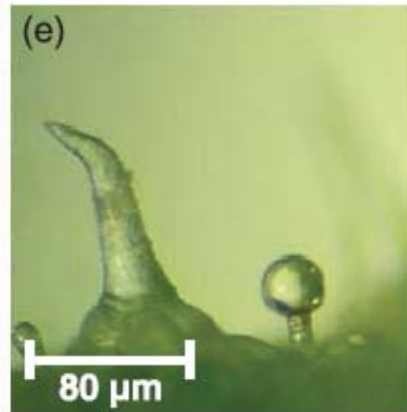
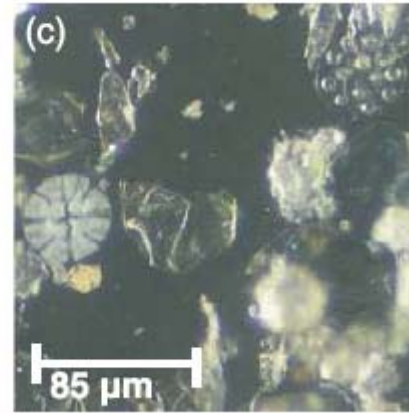
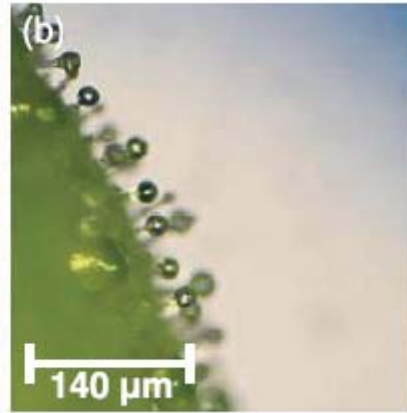
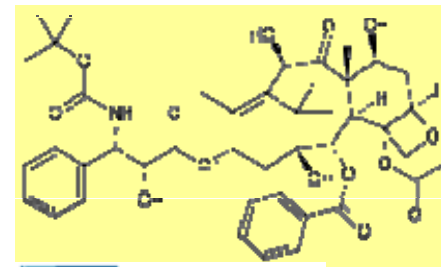
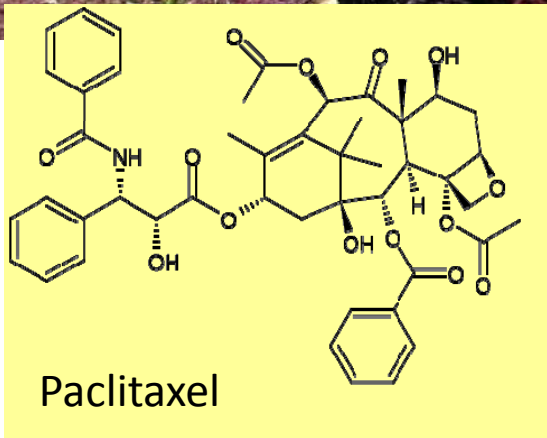


Image sources: [Calvero](#); [Wilhelm](#), [Lorenz](#), [Susan A. Rawlins](#), University of Georgia









AXOTERE[®]
(docetaxel)
Injection Concentrate



Φαινολικές ενώσεις: φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, τανίνες κτλ

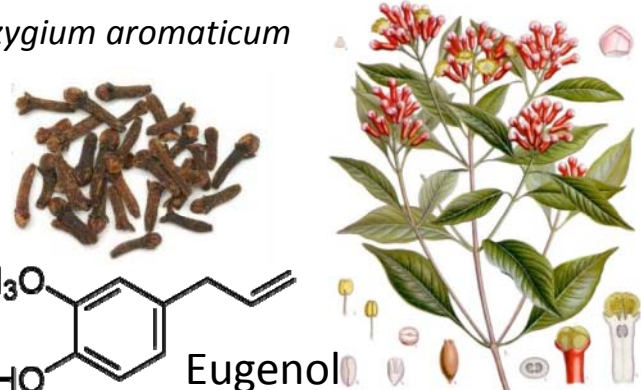
Oc1c(O)c(O)c(O)c(O)c1O[C@@H]2[C@@H](OC(=O)c3c(O)c(O)c(O)c(O)c3O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O

Epigallocatechin gallate (EGCG), a flavonoid from green tea

Oc1ccc(cc1)-c2c(O)c(O)c(O)c2O


Genistein an isoflavonoid from soy beans

Syzygium aromaticum

COc1ccc(C=C)cc1O

Eugenol

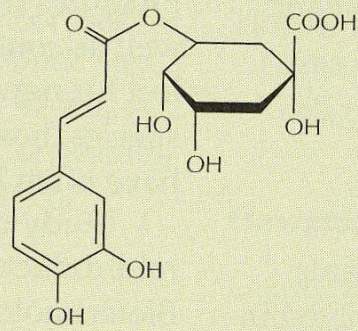
Tannins Found in tea, wine, nuts and many plants

COc1ccc(O)cc1/C=C/C(=O)/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/C(O)C=C/C1=CC(OC)=C(O)C=C1

Curcumin from the spice turmeric

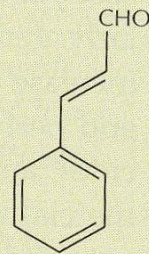
Oc1c(O)c(O)c(O)c(O)c1O[C@@H]2[C@@H](OC(=O)c3c(O)c(O)c(O)c(O)c3O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O

Coffee beans



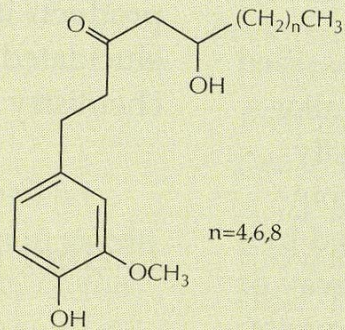
Chlorogenic acid

Cinnamon bark



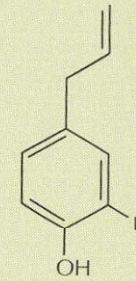
Cinnamaldehyde

Ginger rhizome



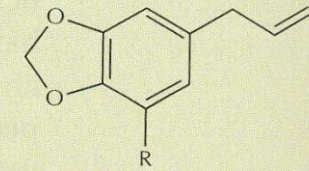
Gingerols

Cloves



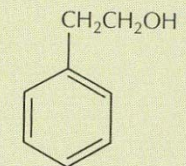
R = H Chavicol
R = OCH₃ Eugenol

Nutmeg



R = H Safrole
R = OCH₃ Myristicin

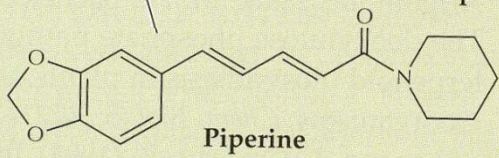
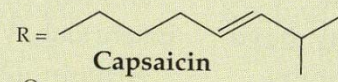
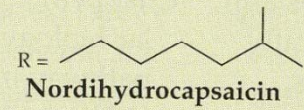
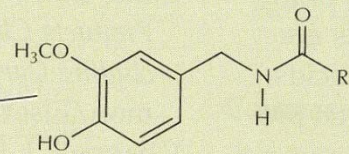
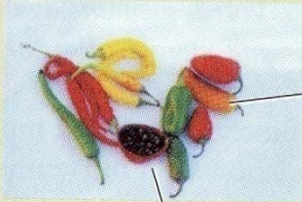
Orchid



Phenylethyl alcohol

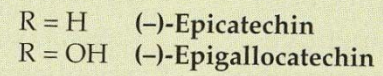
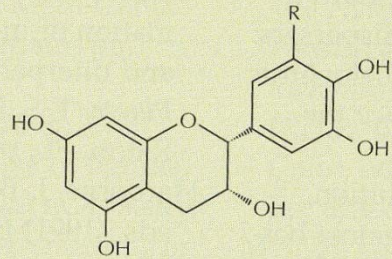


Red and black peppers

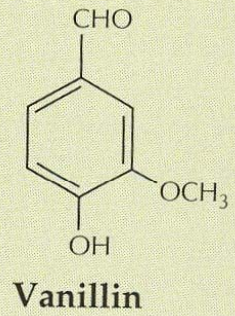


Piperine

Green tea



Vanilla

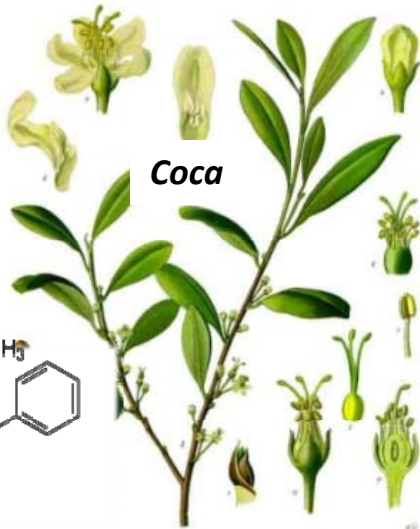
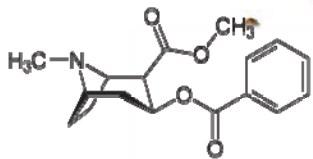


Vanillin



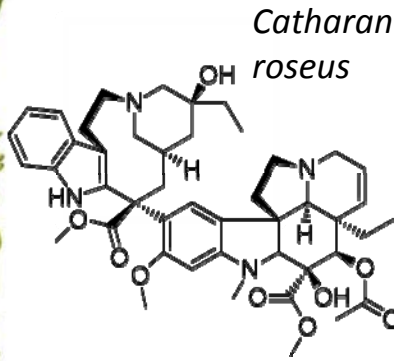
Αλκαλοειδή

Cocaine



Coca

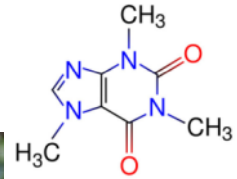
Vincristine



Catharanthus roseus

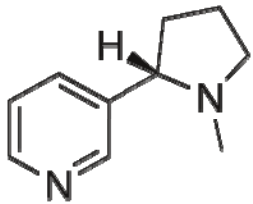


Coffee

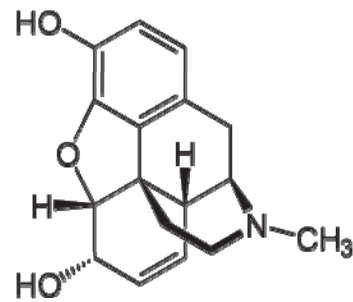


Caffeine

Nicotine



Nicotiana tabacum



Morphine

Papaver somniferum



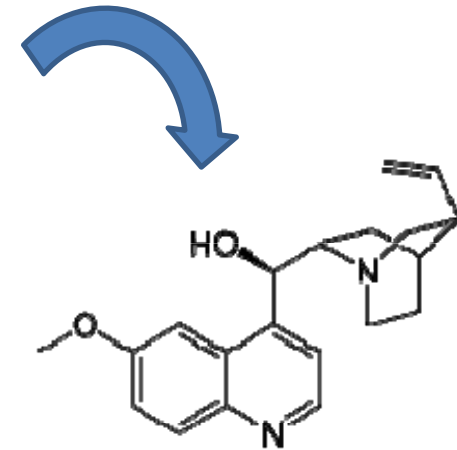
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



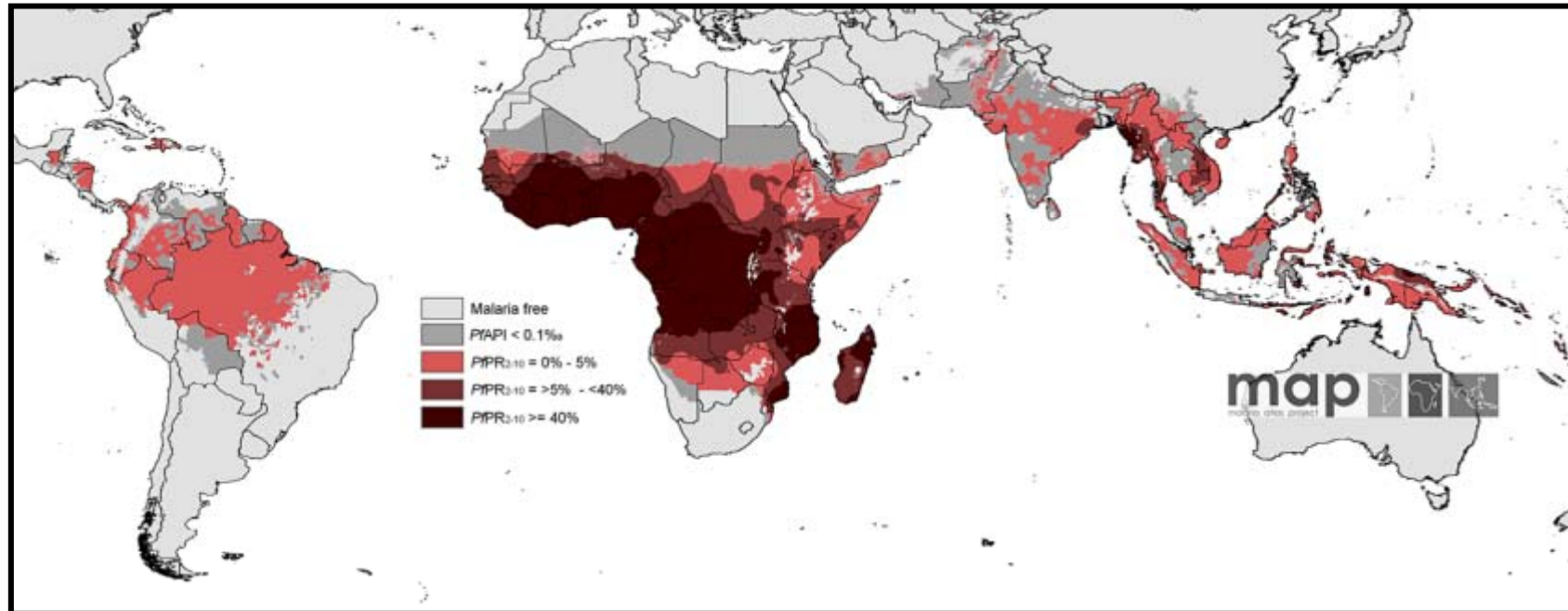
Cinchona: παραγωγή κινίνης στον κορμό - καταπολέμηση *Plasmodium*



Image credits: [Köhler](#); [CDC](#)



Ελονοσία



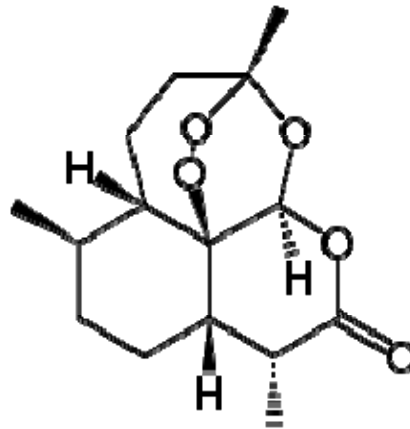
The regions of the world with highest risk for malaria.



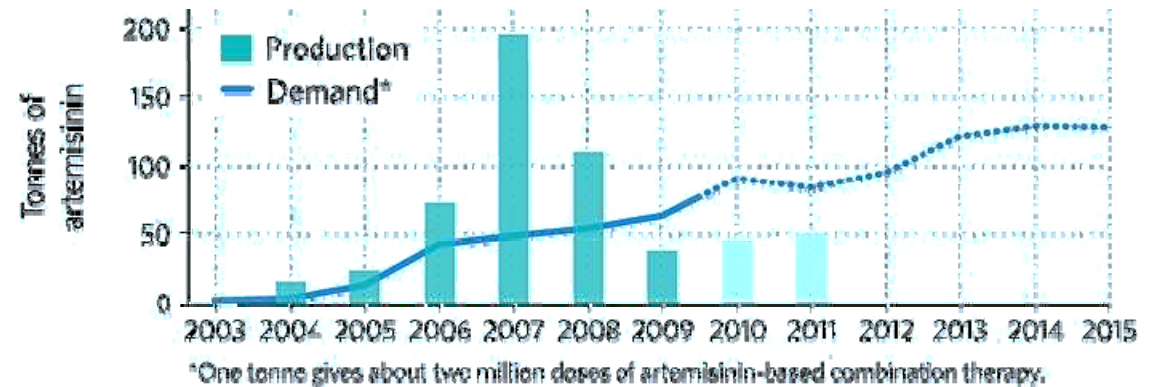
Artemisia annua: παράγει αρτεμισίνη, ένα αποτελεσματικό τριτερπένιο για την καταπολέμηση της ελονοσίας



Artemisinin



Οι απαιτήσεις για αρτεμισίνη ξεπερνούν την παραγωγή



Δημιουργία γενοτύπων *Artemisia* με αυξημένη παραγωγή



15 JANUARY 2010 VOL 327 SCIENCE

The Genetic Map of *Artemisia annua* L. Identifies Loci Affecting Yield of the Antimalarial Drug Artemisinin

Ian A. Graham,^{1*} Katrin Besser,¹ Susan Blumer,¹ Caroline A. Branigan,¹ Tomasz Czechowski,¹ Luisa Elias,¹ Inna Guterman,¹ David Harvey,¹ Peter G. Isaac,² Awais M. Khan,¹ Tony R. Larson,¹ Yi Li,¹ Tanya Pawson,¹ Teresa Penfield,¹ Anne M. Rae,¹ Deborah A. Rathbone,¹ Sonja Reid,¹ Joe Ross,¹ Margaret F. Smallwood,¹ Vincent Segura,¹ Theresa Townsend,¹ Darshna Vyas,¹ Thilo Winzer,¹ Dianna Bowles^{1*}

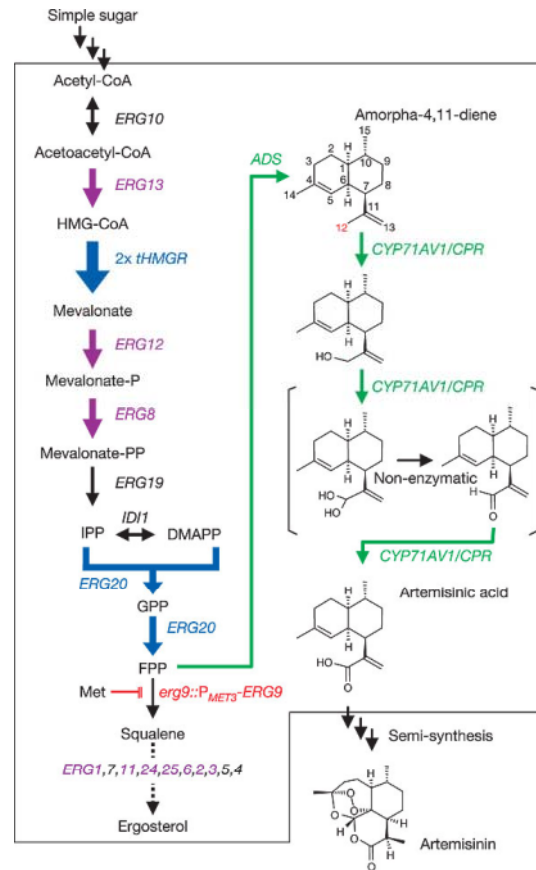
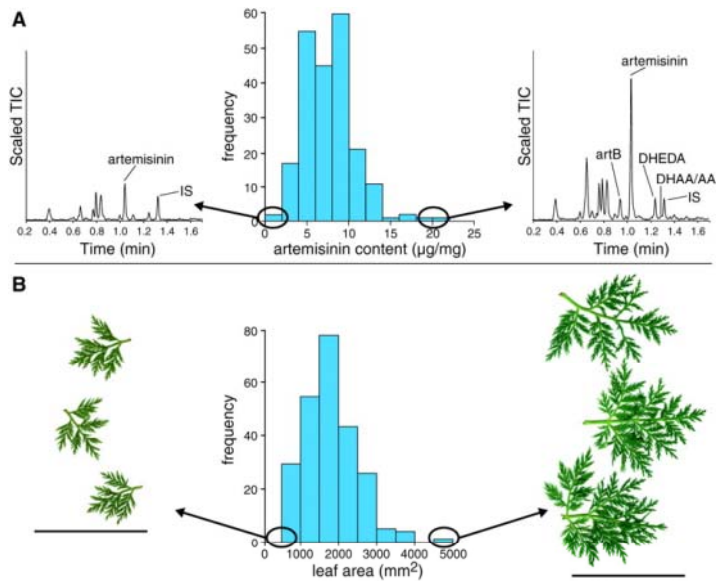
Photo credit: www.york.ac.uk/org/cnap/artemisiaproject/

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Διάφορες προσεγγίσεις για την αύξηση της παραγωγής αρτεμισίνης

Γενετική Βελτίωση



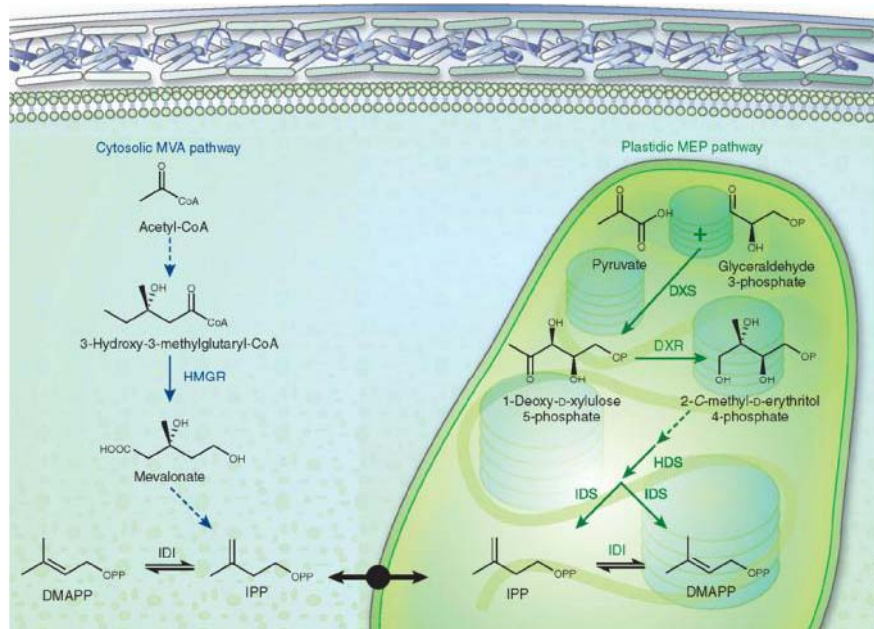
Ημισυνθετική παραγωγή: Έκφραση των φυτικών γονιδίων σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ζύμης

Reprinted from Graham, I.A., et al. and Bowles, D. (2010). The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. *Science*. 327: [328-331](#) with permission from AAAS; Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd from Ro, D.-Ket al and Keasling, J.D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*. 440: [940-943](#); see also Westfall, P.J. et al. and Paddon, C.J. (2012). Production of amorphaadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: [E111-E118](#). Covello, P.S. (2008). Making artemisinin. *Phytochemistry*. 69: [2881-2885](#). Lévesque, F. and Seeberger, P.H. (2012). Continuous-Flow Synthesis of the Anti-Malaria Drug Artemisinin. *Angewandte Chemie International Edition*. 51: [1706-1709](#)



Μεταβολική Μηχανική σε φυτά και καλλιέργειες φυτικών κυττάρων

Τα ένζυμα που επηρεάζουν την παραγωγή φυσικών προϊόντων έχουν ενισχυθεί ή τροποποιηθεί σε φυτικά κύτταρα και σε ολόκληρα φυτά



Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd from Roberts, S.C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* 3: [387-395](#); Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R. and Segura, J. (2006). Up-regulation of 1-oxo-d-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.* 142: [890-900](#).

Γενετισμικό Θεσσαλίας

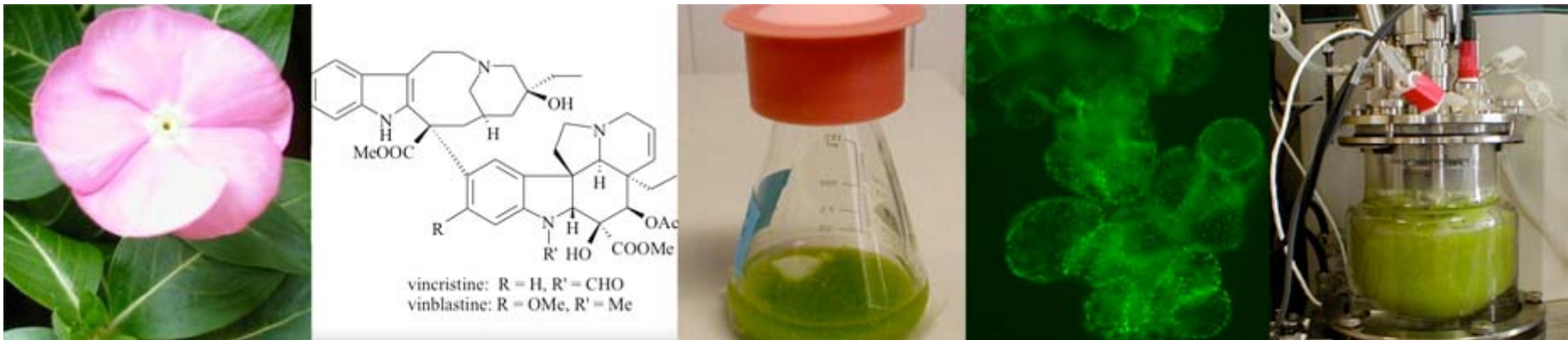




Πχ αύξηση της βιοσύνθεσης του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP), πρόδρομου μορίου για την παραγωγή τερπενίων αυξάνει την παραγωγή αιθεριων ελαίων στη λεβάντα



Π.χ. παραγωγή των αντικαρκινικών ενώσεων βινκριστίνη και βινμπλαστίνη σε κύτταρα *Cantharanthus roseus*



Π.χ. παραγωγή ανθοκυανινών – φυσικών χρωστικών στην τεχνολογία τροφίμων σε καλλιέργειες κυττάρων

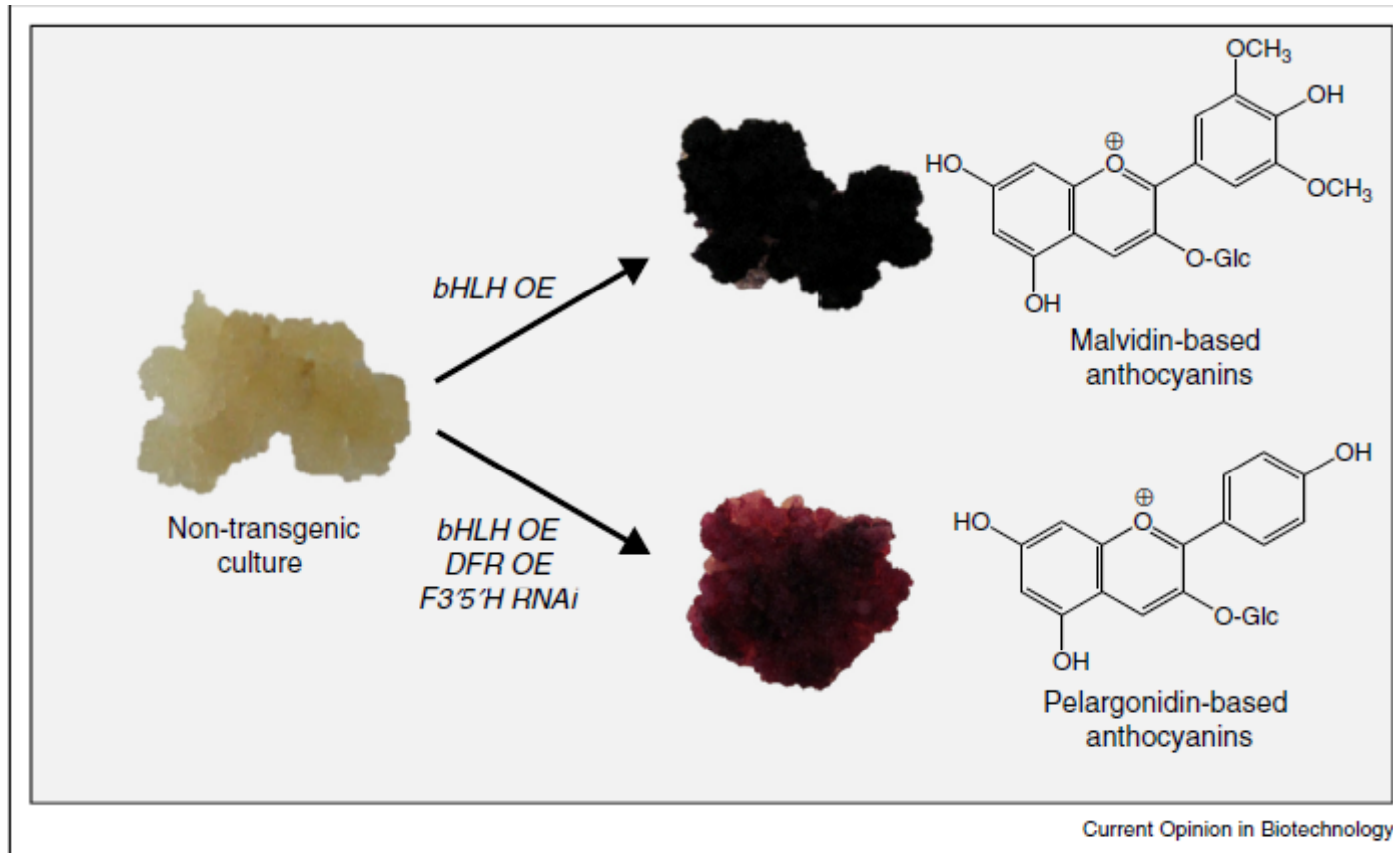


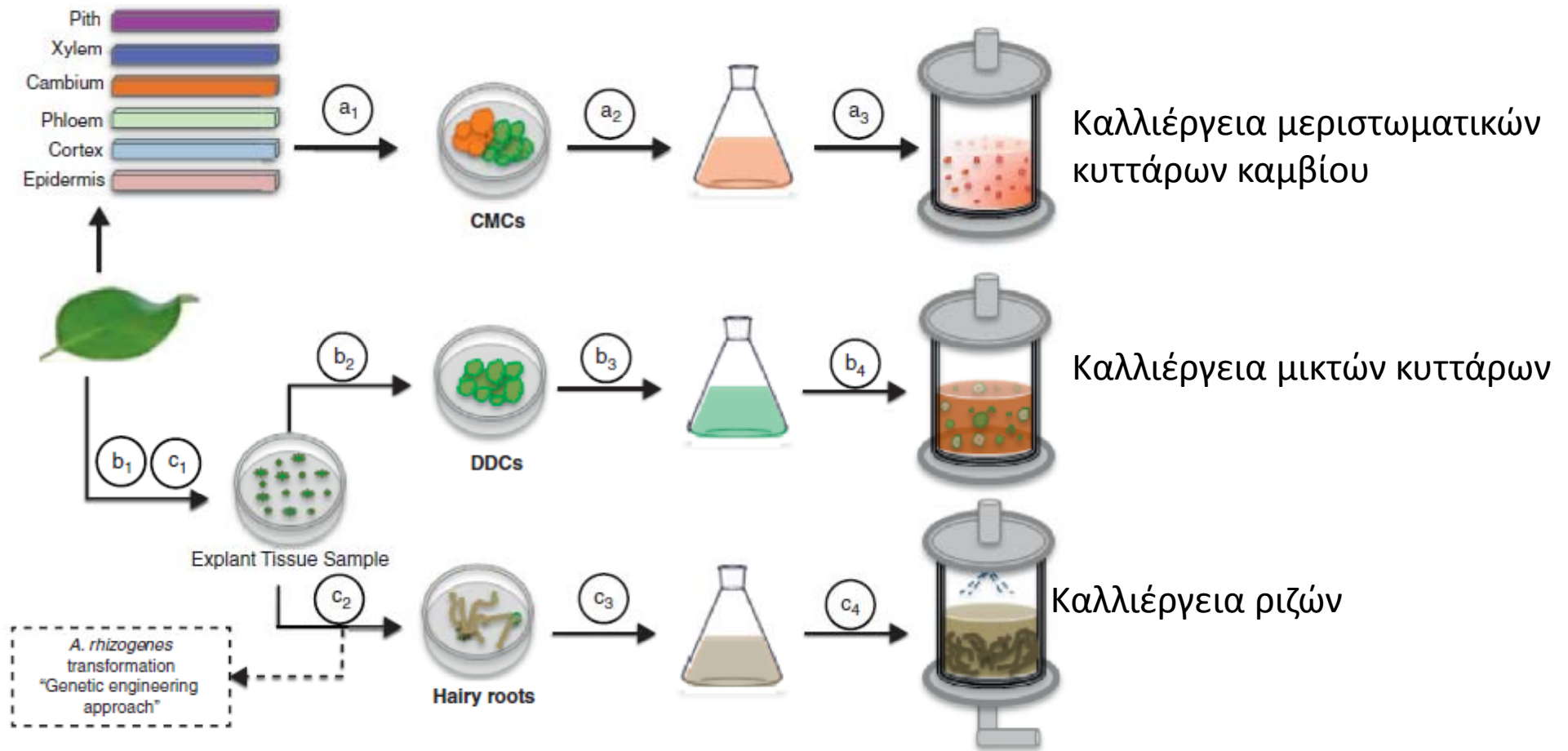
Table 1

Examples of food and health compounds that are potential targets for production in plant cell cultures.

Compound	Compound type	Use	Common plant sources
Anthocyanins	Flavonoids	Colourant (e.g. E163)	Grape (<i>Vitis vinifera</i>) skins, sweet potatoes, various fruits
Betacyanins	Betalains	Colourant (e.g. E162)	<i>Beta vulgaris</i> roots, <i>Amaranthus</i> flowers
Carthamin		Colourant (Natural Red 26)	<i>Carthamus tinctorius</i> (safflower) petals
Capsaicin	Capsaicinoid	Flavour	<i>Capsicum</i> fruits
Ferulic acid	Phenylpropanoid	Food ingredient preparations	Many sources, for example, cereal brans
Ginsenosides	Triterpene saponins	Health food extract	<i>Panax</i> spp. roots
Lavender oil	Terpenes and other compounds	Flavour	<i>Lavandula</i> spp. flowers
Noni root extract	Anthraquinones, alkaloids	Health food extract	<i>Morinda citrifolia</i> roots
Nootkatone	Sesquiterpene	Flavour	<i>Citrus × paradisi</i> (grapefruit) fruits
Phytosterols	Phytosterols such as β -sitosterol	Health ingredient	Seed oils, especially from legumes
Resveratrol	Stilbene	Health food extract	Grape seed extract, legume shoots
Saffron (crocetin, safranal)	Apocarotenoids	Flavour and colourant	<i>Crocus sativus</i> (saffron) stigmas and styles
Vanillin	Phenylpropanoid	Flavour	Seed pods of <i>Vanilla planifolia</i>



Διάφορα συστήματα καλλιέργειας φυτικών κυττάρων



Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”



Φυτά για παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων τεχνικών προϊόντων

Plant –made pharmaceuticals και plant-made industrial products
MP(I)P



Διαγονιδιακά φυτά για παραγωγή προϊόντων (molecular farming/ μοριακή αγροκαλλιέργεια)

- ✓ Εμβόλια- Αντισώματα- άλλα Φαρμακευτικά προϊόντα
- ✓ Βιομηχανικά ένζυμα
- ✓ Βιοπλαστικά



Πλεονεκτήματα

- ✓ Μεγάλη βιομάζα με μικρό κόστος επέκτασης παραγωγής
- ✓ Απουσία παθογόνων και μη επιθυμητών DNA αλληλουχιών
- ✓ Ορθή μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών (αναδίπλωση, αποθήκευση για σταθερότητα, γλυκοσυλίωση)
- ✓ Ο καθαρισμός δεν είναι απαραίτητος



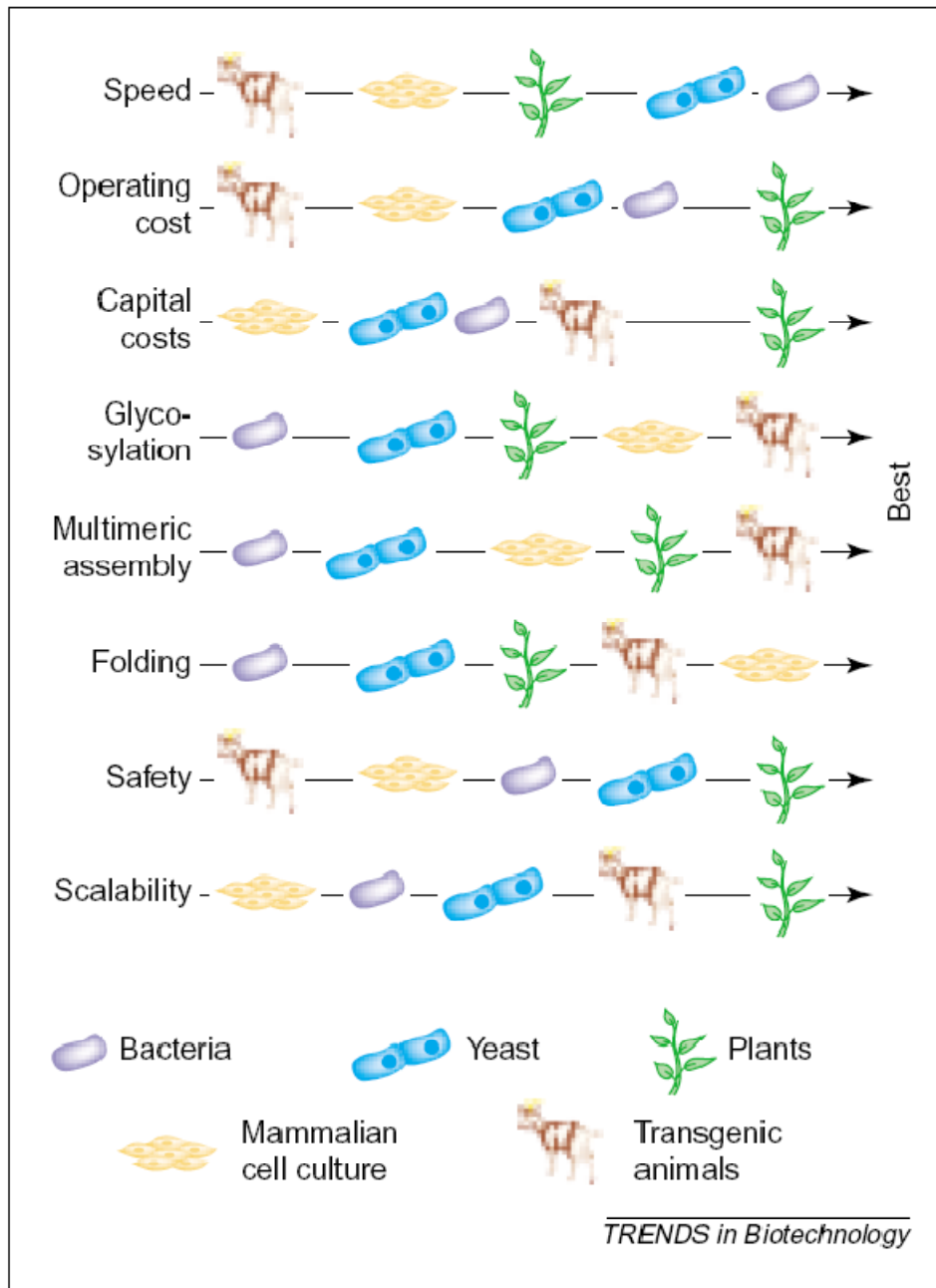


Fig. 1. Comparison of various commercial recombinant protein expression systems



Στρατηγικές για μαζική παραγωγή πρωτεϊνών

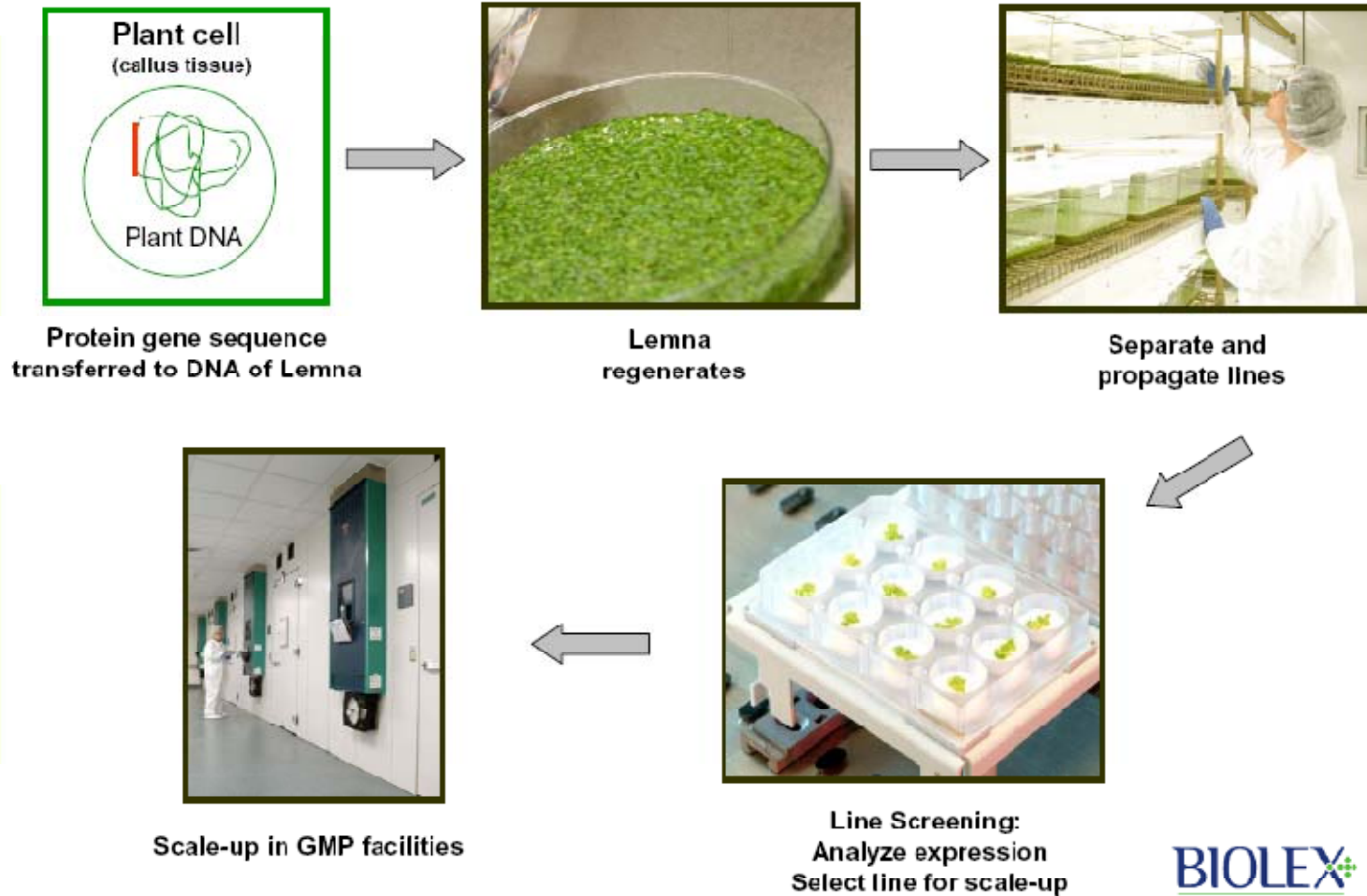
✘ Σταθερή έκφραση κυρίως υπό εξειδικευμένους για ιστούς και υποκυτταρικά οργανίδια προαγωγείς (σπόροι, κόνδυλοι, ER, πλαστίδια, σύντηξη με πρωτεΐνες έκκρισης, ολεοσίνες κτλ)

Πχ παραγωγή hirudin σε ελαιοσωμάτια *Brassica napus* σε σύντηξη με ολεοσίνη από *Arabidopsis*

✘ Παροδική έκφραση με χρήση ιών ως φορείς



The LEX System from Gene to GMP Production



BIOLEX
THERAPEUTICS

Safflower



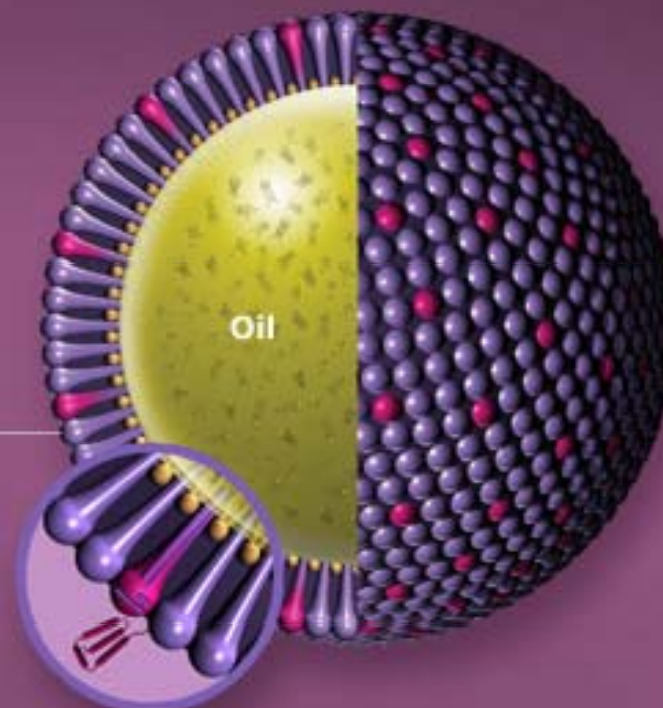
Floret



Seed



Oilbody



Oil

Proteins

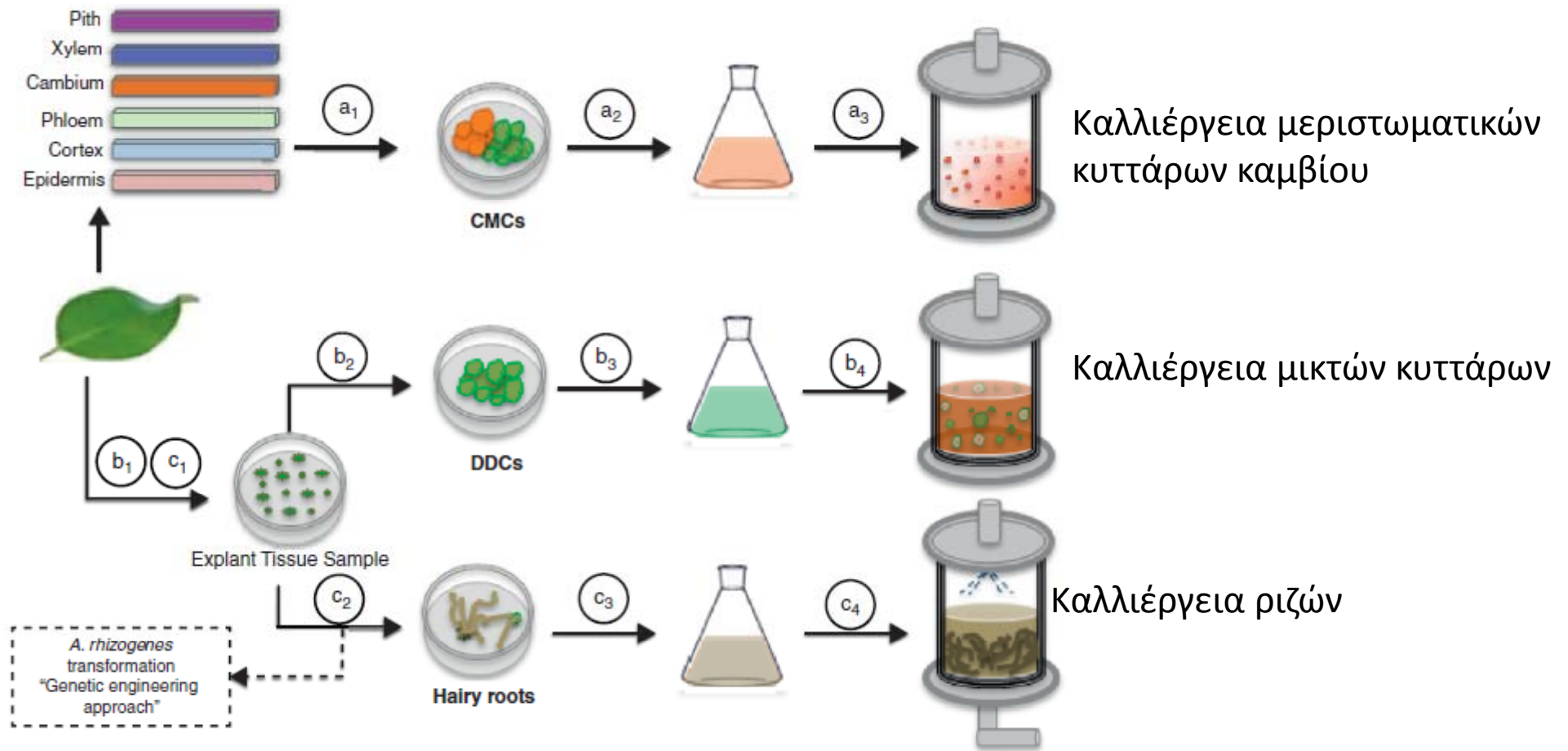
Oilbody:

A seed structure with a protein coat that stores energy for germination in the form of oil.

Click to close



Διάφορα συστήματα καλλιέργειας φυτικών κυττάρων



Protalix Biotherapeutics



<http://www.elelyso.com/how-elelyso-is-made>

ELELYSO™ (taliglucerase alfa): Γλυκοσερεβροσιδάση για θεραπεία υποκατάστασης ενζύμου σε νόσο Gaucher

FDA 2012, Pfizer



<http://www.medicago.com/English/Technologies/medicago-technologies/default.aspx>



Βιομηχανικά Ένζυμα

Avidin/ β -glucuronidase

trypsin

κυτταρινάσες

ξυλανάσες

υπεροξειδάση της λιγνίνης

α -αμυλάση

β -γλουκανάση

φυτάση



Table 5. Examples of plant-based expression systems used for pharmaceutical protein production

System		Protein	Expression	Company ^a
Stable nuclear transformation systems				
Whole plant (cytosolic)		HbsAg, vaccine [65]	0.007% TSP	AltaGen Bioscience Inc. (potato)
		collagen [66]	1 mg/g DW	CropTech Corp. (tobacco) Medicago Inc. (alfalfa) Meristem Therapeutics (tobacco)
Cellular compartment	Vacuole	scFv, hepatitis B [67]	0.032% TSP	PlantGenix Inc. (not reported)
		slgA/G [68]	not reported	
	ER	scFv, cutinase [69]	1% TSP	Novoplant GmbH (tobacco)
		scFv, T84.66 [70]	29 µg/g FW	
Apoplast		scFv, ABA [71]	6.8% TSP	Epicyte Pharmaceutical Inc. (tobacco)
		IgG1 [55]	1.3% TSP	
		IgA/G [72]	500 µg/g FW	
Tissue-specificity	Seed	IgG1, Fab [73]	13% ISP	ProdiGene Inc. (corn) SemBioSys Genetics Inc. (canola) Applied Phytologics Inc. (rice) Epicyte Pharmaceutical Inc. (corn) IPT, Monsanto (corn) Meristem Therapeutics (rape) Meristem Therapeutics (potato)
		avidin [74]	6% TSP	
		hirudin [61]	1% FW	
	Tuber	scFv, oxalozone [75]	2% TSP	
	Root	IgM, RKN [76]	0.003% TSP	
	Fruit	RSV-F protein [77]	not reported	
Exudate		human SEAP [62]	20 µg/g DW/day	Phytomedics Inc. (tobacco roots)
		human SEAP [63]	2.8% TEP	Phytomedics Inc. (tobacco leaves) Biolex Inc. (duckweed)
Stable plastid transformation system				
Chloroplast		somatotropin [78]	7% TSP	
Transient transformation system				
Viral		α-trichosanthin [79]	2% TSP	Large Scale Biology Corp. (tobacco)

Abbreviations: DW, dry weight; ER, endoplasmic reticulum; FW, fresh weight; ISP, intercellular soluble protein; TEP, total exuded protein; TSP, total soluble protein.

^aCompanies sharing a row with a protein and reference are sources of this information.



Table 1 | Plant-derived pharmaceutical proteins that are closest to commercialization for the treatment of human diseases

Product	Class	Indication	Company/Organization	Crop	Status
Various single-chain Fv anti-body fragments	Antibody	Non-Hodgkin's lymphoma	Large Scale Biology Corp	Viral vectors in tobacco	Phase I
CaroRx	Antibody	Dental caries	Planet Biotechnology Inc.	Transgenic tobacco	Phase II
<i>E. coli</i> heat-labile toxin	Vaccine	Diarrhoea	Prodigene Inc.	Transgenic maize	Phase I
			Arntzen group (Tacket <i>et al</i> , 1998)	Transgenic potato	Phase I
Gastric lipase	Therapeutic enzyme	Cystic fibrosis, pancreatitis	Meristem Therapeutics	Transgenic maize	Phase II
Hepatitis B virus surface antigen	Vaccine	Hepatitis B	Arntzen group (Richter <i>et al</i> , 2000)	Transgenic potato	Phase I
			Thomas Jefferson University/ Polish Academy of Sciences	Transgenic lettuce	Phase I
Human intrinsic factor	Dietary	Vitamin B12 deficiency	Cobento Biotech AS	Transgenic <i>Arabidopsis</i>	Phase II
Lactoferrin	Dietary	Gastrointestinal infections	Meristem Therapeutics	Transgenic maize	Phase I
Norwalk virus capsid protein	Vaccine	Norwalk virus infection	Arntzen group (Tacket <i>et al</i> , 2000)	Transgenic potato	Phase I
Rabies glycoprotein	Vaccine	Rabies	Yusibov <i>et al</i> (2002)	Viral vectors in spinach	Phase I



Table 2. European companies and organisations active in molecular farming^a

Company or Organization	Plant host(s)	Products or Indications
Agrenvec, Spain	<i>Brassica</i> (viral expression)	Contract manufacturing
BASF, Germany	<i>Brassica</i> , tobacco	Polyunsaturated fatty acids
Bayer Crop Science, BioScience, Germany	Not specified	Antibodies
Cobento Biotech, Denmark	<i>Arabidopsis</i>	Human intrinsic factor and transcobalamin protein
CropDesign ^b	Maize, rice	Contract manufacturing
ERA Plantech, Spain	Protein bodies in most plant tissues and species	Product-neutral productivity improvements
Fraunhofer IME, Germany	Tobacco, corn, rice, wheat, tomato, plant suspension cells	Antibodies, vaccines (injectable and oral administration), enzymes for oncology and infectious disease
Greenovation Biotech GmbH, Germany ^c	Moss	Monoclonal antibodies and other complex proteins
Icon Genetics AG, Germany ^d	Tobacco, <i>Nicotiana benthamiana</i> , spinach, red beets	Interferon, somatotropin, restriction enzymes, single-chain antibodies, monoclonal antibodies, antigens, glucocerebrosidase, thaumatin, albumin, DNase, RNase inhibitor, insulin
LemnaGene S.A., France ^d	<i>Lemna</i> sp.	Not specified
Maltagen Forschung GmbH, Germany	Barley, malt	Lactoferrin, lysozyme, human serum albumin, hepatitis vaccine, edible vaccines
Meristem Therapeutics, France	Maize, tobacco	Gastric lipase (MERISPASE [®]), albumin, human collagen, human lactoferrin, human IgA (x4), dust mite allergens, murine IgM (monomeric) and human plasma proteins
Novoplant GmbH, Germany	Tubers, rape seed, flax seed, peas	Orally administered antibodies for animal health
ORF Genetics, Iceland ^e	Barley, lettuce	Growth factors, proteases, antibodies and vaccines
Phyton Biotech, Germany	Plant cells	Includes growth hormone-receptor antagonist for treating acromegaly, cancer and diabetes
Pharma-Planta Project, European Community	Maize, tobacco (various plants)	Antibodies and vaccines
PlantBio Products, Spain	Chloroplast transformation	Bioplastics
Plant techno SRL, Italy	Rice, wheat, tomato, maize, poplar, <i>Agaricus</i> , barley	Enzymes, phytoremediation
Planton, Germany	Potato	Contract manufacturing
Plant Research International, The Netherlands	Platform technologies applicable in all plant hosts (tobacco, potato, tomato, rice and others)	Antibodies as a model: vaccines for oral application and targeted delivery
SunGene, Germany ^f	Rapeseed, potato, tagetes, <i>Arabidopsis</i> , tobacco and tomato	Secondary metabolites, for example, carotenoids and vitamins for food, feed and health
Syngenta, Switzerland	Safflower	Biopharmaceuticals for a range of indications, including antibodies, enzymes and other protein therapeutics
UniCrop Ltd, Finland	<i>Camelina</i> sprouts	Model proteins: monoclonal antibodies, immunoglobulin fusion protein, human serum albumin, enzymes

^aSources: [1,4] company websites (Box 2); ^bthis company recently became a fully owned subsidiary of BASF; ^clicence agreement with Bayer; ^dthis company recently became a fully owned subsidiary of Bayer; ^erecently acquired by the US company Biolex Therapeutics; ^fIceland is not a member of the EU but belongs to the European Economic Area; ^gjoint venture of BASF Plant Science, the Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research.

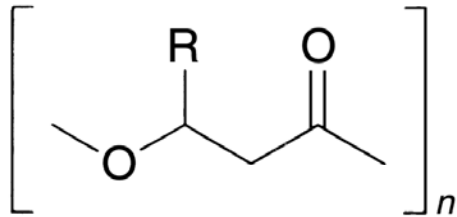


Box 2. Useful links

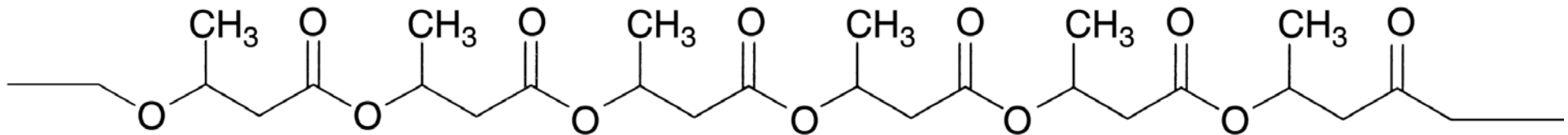
Agrenvec: <http://www.agrenvec.es>
Arizona State University: <http://www.asu.edu/>
BASF: <http://www.corporate.basf.com/en/produkte/biotech/plantscience/pflanzenalsfabrik>
Bayer Crop Science: <http://www.bayercropscience.com>
Biolex Therapeutics: <http://www.biolex.com>
Biotechnology Industry Organization: <http://www.bio.org>
Canadian Food Inspection Agency (CFIA): <http://www.inspection.gc.ca>
Cobento Biotech AS: <http://www.cobento.dk>
CropDesign: <http://www.cropdesign.com>
Dow Agro Sciences: <http://www.dowagro.com/newsroom/corporatenews/2006/20060131b.htm>
Environment Protection Agency (EPA): <http://www.epa.gov/>
ERA Plantech: <http://www.erabiotech.com>
EuropaBio: <http://www.europabio.org>
European Food Safety Authority: <http://www.efsa.eu.int>
European Plant Science Organisation: <http://www.epsoweb.org>
Fraunhofer Gesellschaft: <http://www.fraunhofer.de/fhg/EN/>
Fraunhofer IME: <http://www.ime.fraunhofer.de>
German Parliament: <http://www.bundestag.de>
Greenovation Biotech GmbH: <http://www.greenovation.com>
Icon Genetics AG: <http://www.icongenetics.com>
Institute for Prospective Technology Studies: <http://www.jrc.es>
International Alliance of Patients' Organizations: <http://www.patientsorganizations.org/>
Large Scale Biology Company: <http://www.lsb.com>
LemnaGene S.A.: <http://www.lemnagene.com>
Maltagen Forschung GmbH: <http://www.maltagen.de>
Meristem Therapeutics: <http://www.meristem-therapeutics.com>
National Corn Growers Association: <http://www.ncga.com/>
Novoplant GmbH: <http://www.novoplant.de>
Office of Technology Assessment at the German Parliament: http://www.tab.fzk.de/home_en.htm
ORF Genetics: <http://www.orfgenetics.com>
Pharma-Planta Project: <http://www.pharma-planta.org>
Phyton Biotech: <http://www.phytonbiotech.com>
Planet Biotechnology: <http://www.planetbiotechnology.com>
Plant Research International: <http://www.pri.wur.nl>
PlantBio Products: <http://www.plantbioproducts.es>
Planton: <http://www.planton.de>
SemBioSys Genetics Inc.: <http://www.sembiosys.ca>
Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>
SunGene: <http://www.sungene.de>
Syngenta: <http://www.syngenta.com>
UniCrop Ltd: <http://www.unicrop.fi>
United States Department of Agriculture (USDA): <http://www.usda.gov>
Ventria: <http://www.ventria.com>



Βιοπλαστικά

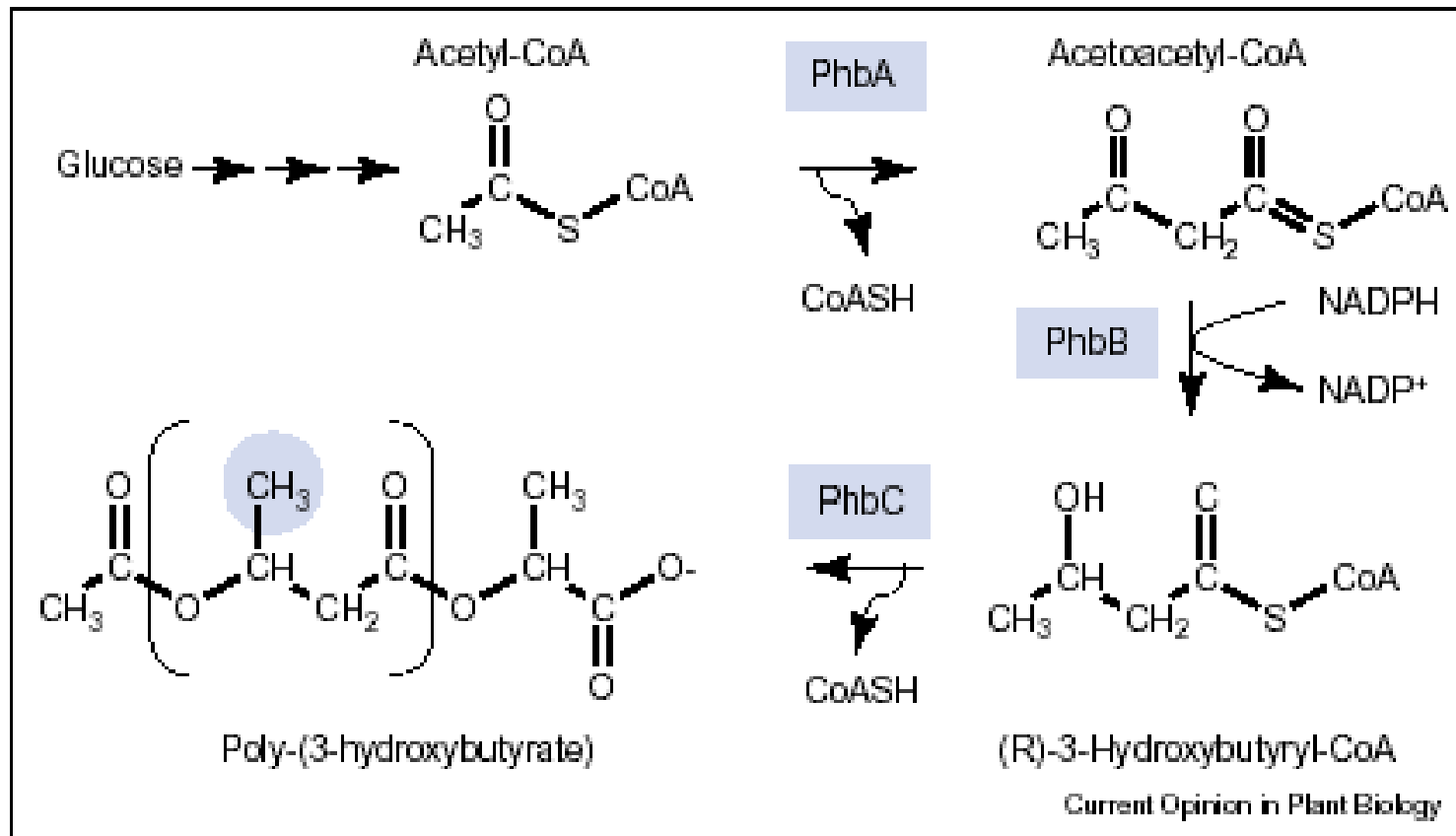


Πολυ υδροξυ αλκανικά οξέα



Πολυ υδροξυ βουτυρικό οξύ





phaA, phaB, phaC

- από *Alcaligenes eutrophus*

σε *Arabidopsis* (χλωροπλάστες) Υπό CaMV

σε *Gossypium* (ίνες) Υπό εξειδικευμένο προαγωγέα

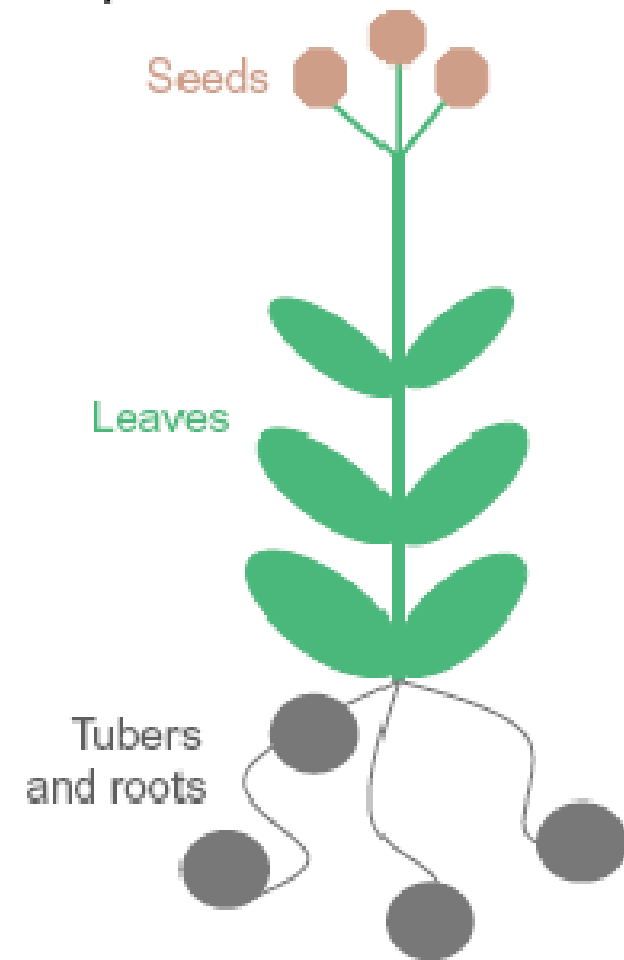
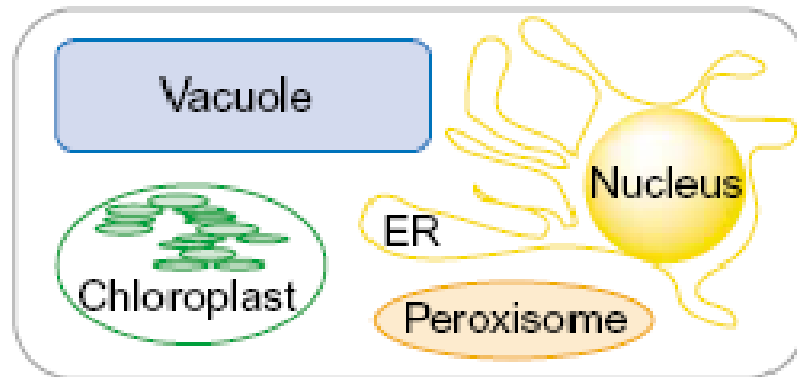
- από *Ralstonia eutropha*

σε *Brassica* (λευκοπλάστες) Υπό 12-υδροξυλάση ολεϊκού



Expression systems for the production of biopolymers in plants:

- Ubiquitous expression and expression of transgenic proteins in storage organs (e.g. tubers, seeds)
- Accumulation in 'optimal' compartments (e.g. ER, chloroplast)
- Production of plastic-like biomaterials in chloroplasts and peroxisomes



Current Opinion in Plant Biology



Στόχοι της επιστήμης φυτών για το 2015-2025 (Decadal Vision Report, ASPB)

- Βελτίωση της ικανότητας να προβλέπονται τα χαρακτηριστικά των φυτών από τα φυτικά γονιδιώματα σε ποικίλα περιβάλλοντα
- Συνάθροιση φυτικών χαρακτηριστικών σε διάφορους συνδυασμούς με σκοπό την επίλυση συγκεκριμένου προβλήματος
- Ανακάλυψη, καταγραφή και χρήση φυτικών μεταβολιτών (βιοχημεία, χημεία)
- Βελτίωση της ικανότητας εύρεσης απαντήσεων ανάμεσα σε τεράστιο όγκο δεδομένων (βιοπληροφορική)

