



NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY

---

# **Nove tehnike genskega spreminjanja in sledenje GSO v hrani**

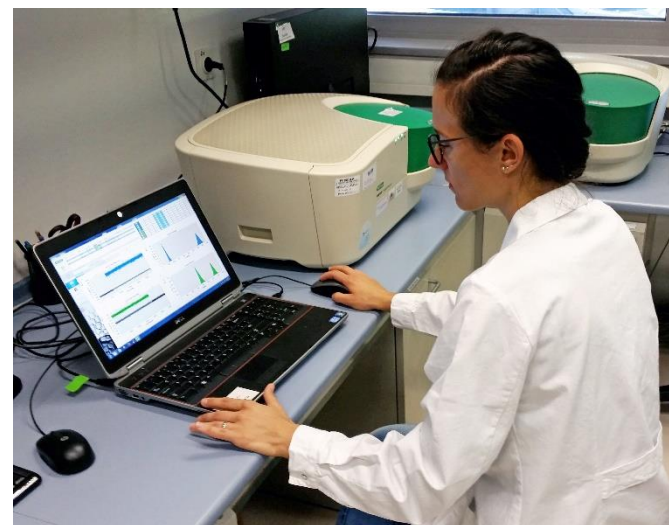
dr. David Dobnik

Nacionalni inštitut za biologijo  
Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo  
Večna pot 111, 1000 Ljubljana

E-mail: [david.dobnik@nib.si](mailto:david.dobnik@nib.si)

# NIB je Nacionalni referenčni laboratorij za določanje GSO

- Laboratorij za uradni nadzor nad GSO v semenih, rastlinah, hrani in krmi
- Testiranje vzorcev, razvoj metod in njihova validacija v skladu z ISO/IEC 17025 in ENGL smernicami
- Izobraževalne delavnice, svetovanje
- Urad RS za meroslovje: Odločba o priznanju za nosilca nacionalnega etalona za področje množine snovi/bioanalize nukleinskih kislin, zlasti na področju GSO in mikroorganizmov v bioloških in drugih materialih



# Sprememba teozinta v koruzo kot jo poznamo danes je potekala skozi obdobje več tisoč let

TEOZINT



KORUZA

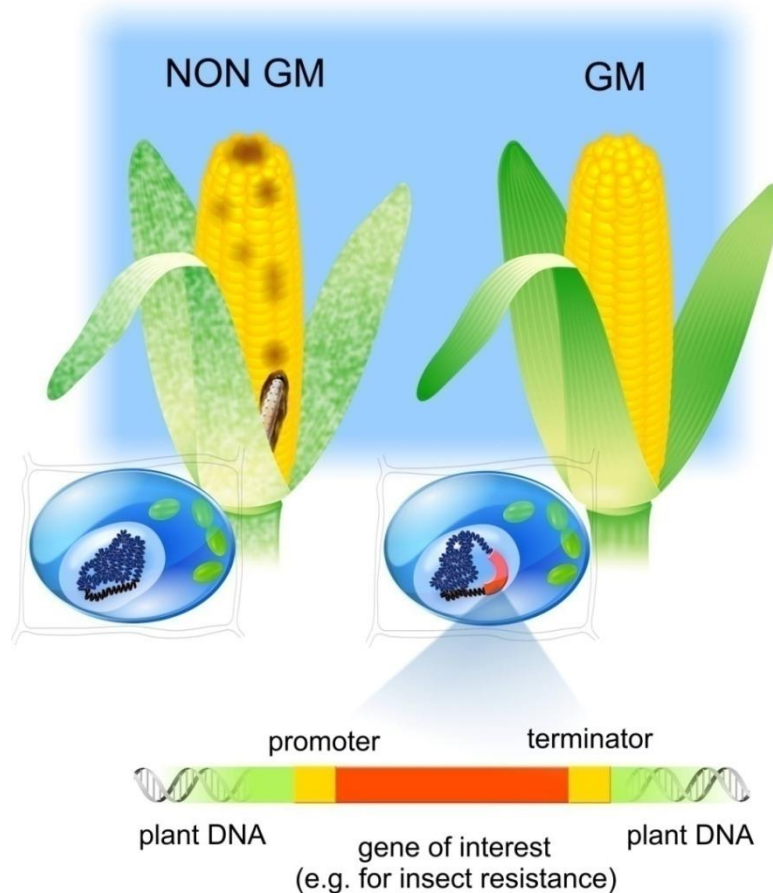


Foto: Marina Dermastia

# Gensko spremenjeni organizem (npr. rastlina) vsebuje DNA iz nesorodnih organizmov (običajno virusov, bakterij)

Je organizem, z izjemo človeka, ali mikroorganizem, katerega genski material je spremenjen s postopki, ki spreminjajo genski material drugače kot to poteka v naravnih razmerah s križanjem ali naravno rekombinacijo

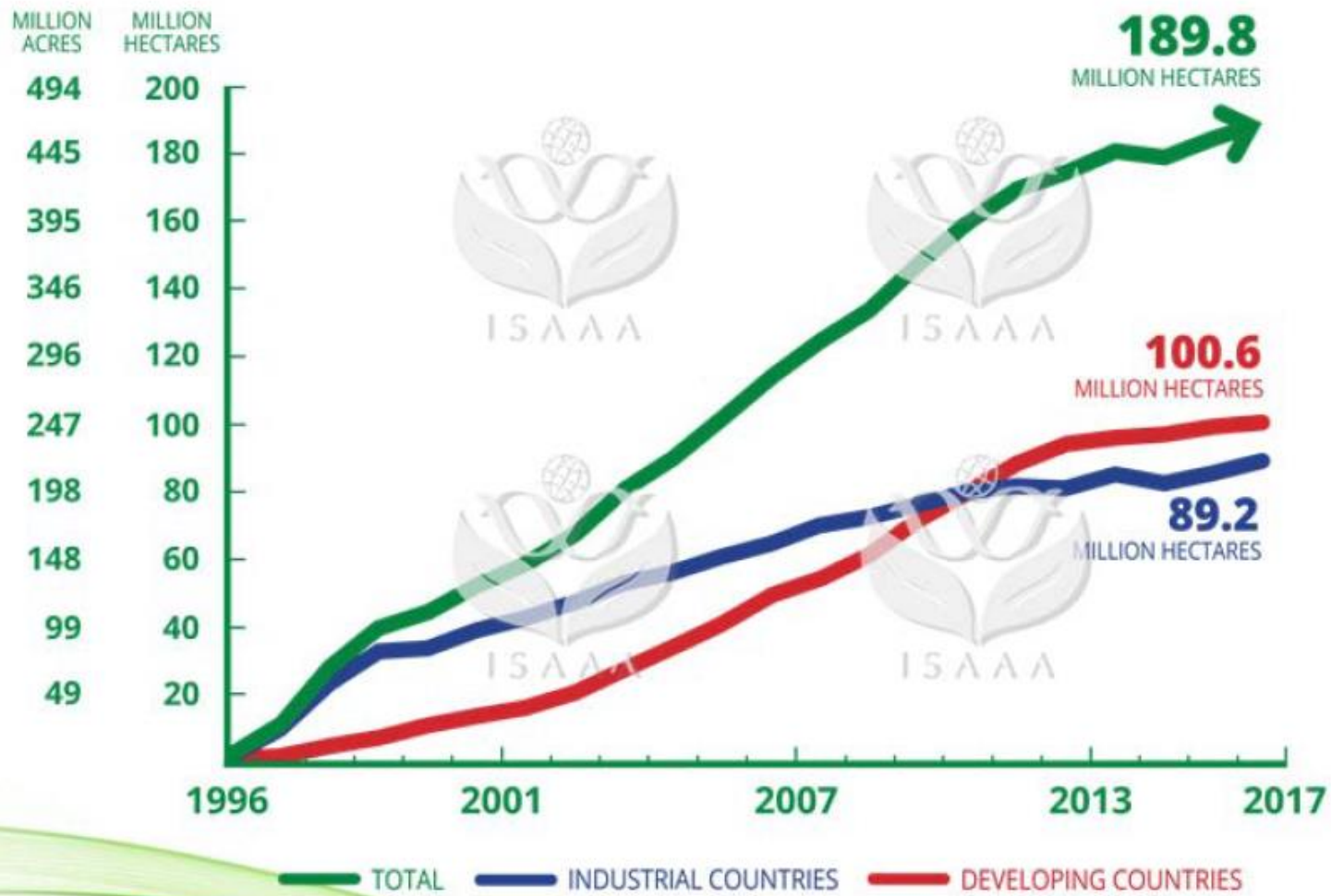
(Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi UL RS 67/2002)



Risba: Z. Podlesek

Jana Žel s sod.: How to reliably test for GMOs,  
Springer Brief, 2012

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

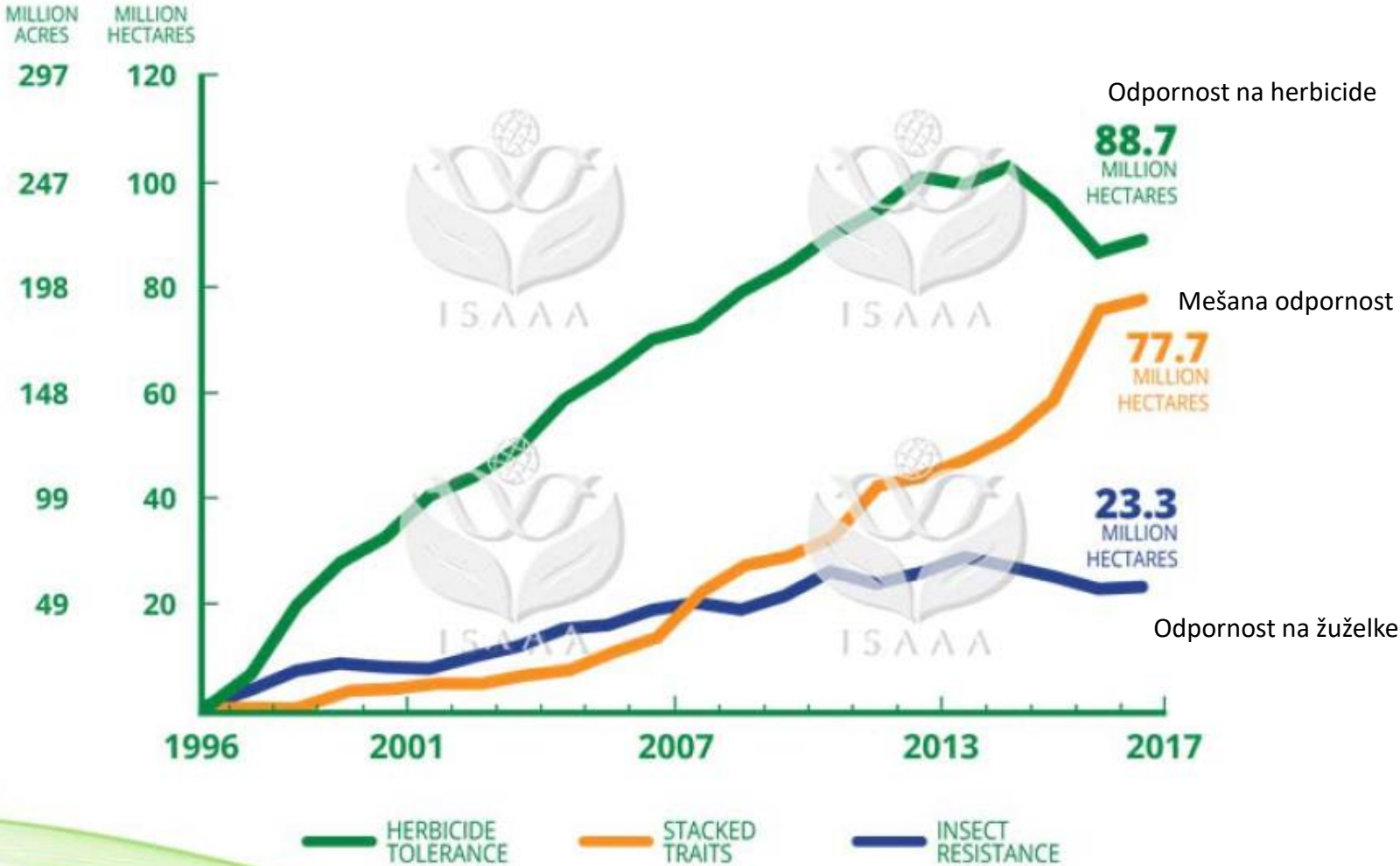


ISAAA, 2017



# Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2017: By Trait

(Million Hectares, Million Acres)



ISAAA, 2017



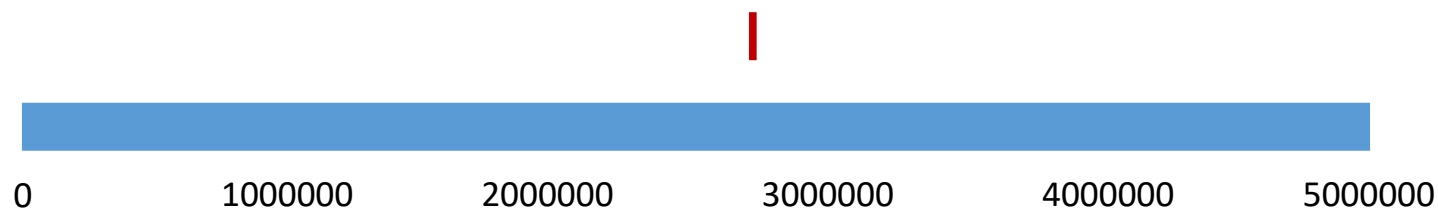
# KLASIČNO ŽLAHTNJENJE - GENSKA TEHNOLOGIJA

---

- Križanja
  - Druge tehnike (reševanje embrijev, žarčenje, kemična mutageneza)
  - Številni nepoznani geni
  - Prenášajo/spreminjajo se geni iz rastlin
  - Dolgotrajna večletna ponovna križanja
- Točno določeni geni
  - Vnaša se katerekoli gene
  - Direktnen vnos v ekonomsko pomembne sorte

# Relativna velikost genomske regije vnešene s **klasično** ali **molekularno** genetiko

---





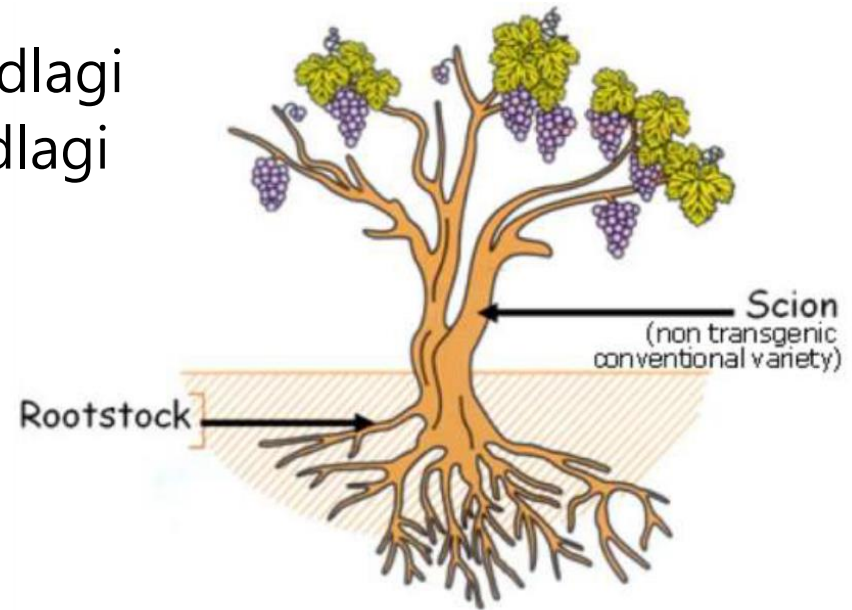
# Nekatere tehnike sodobne biotehnologije

---

- Cepljenje
- Cisgeneza ali intrageneza
- Agroinfiltracija
- Epigenetske spremembe (z RNA usmerjeno metilacijo DNA (RdDM))
- Tehnike urejanja genoma
  - Z oligonukleotidi izzvane mutacije (ODGM)
  - Tehnologije usmerjenih nukleaz (SDN) (meganukleaze, nukleaze cinkovih prstov (ZFN), nukleaze TAL-efektorjev (TALEN) in sistem CRISPR/Cas)

# Cepljenje

- Tri možne kombinacije:
  - GS cepič na GS podlagi
  - GS cepič na nespremenjeni podlagi
  - nespremenjen cepič na GS podlagi
- Onemogočen prenos GS informacij s pelodom
- Zaenkrat le poljski poskusi - še ni v komercialni uporabi



# Cisgeneza / intrageneza

- Kot vir vnesenih genskih konstruktov se uporablja le genski sklad prejemnikove vrste in/ali spolno združljive vrste.

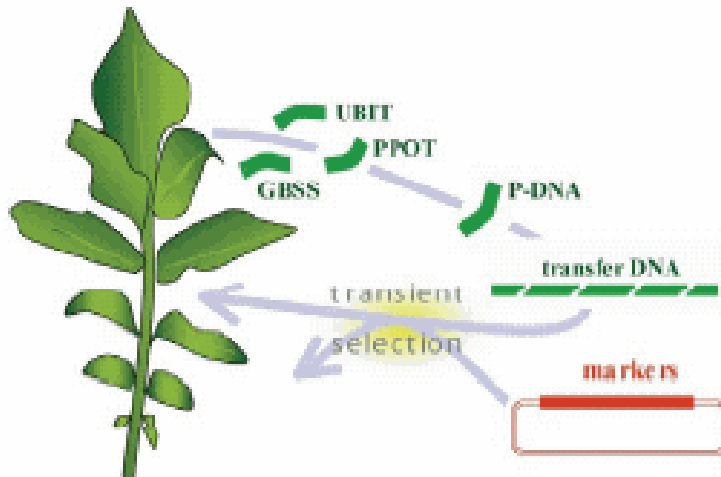


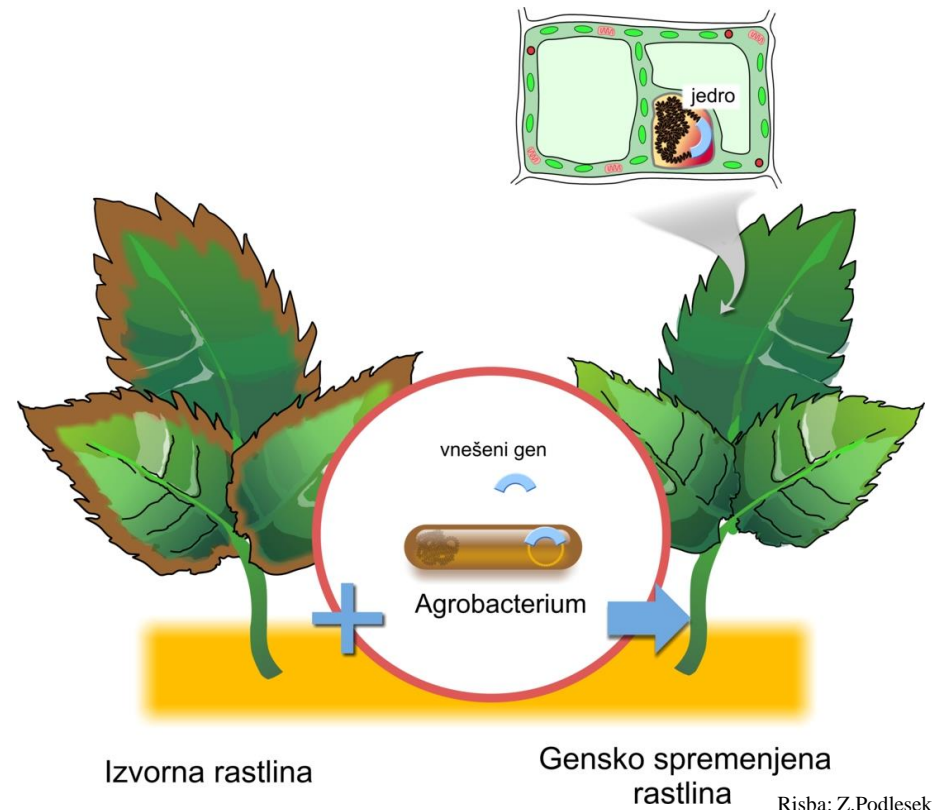
Figure 2. Concept of marker-free All-Native DNA transformation. GBSS = promoter of potato granule-bound starch synthase gene; UBIT = terminator of potato ubiquitin gene; PPOT = two copies of the trailer of the potato polyphenol oxidase gene, separated by an intron of the potato ubiquitin gene.



Jabolko z visoko vsebnostjo antocianinov v mesu jabolka – povečana visoko antioksidantska kapaciteta

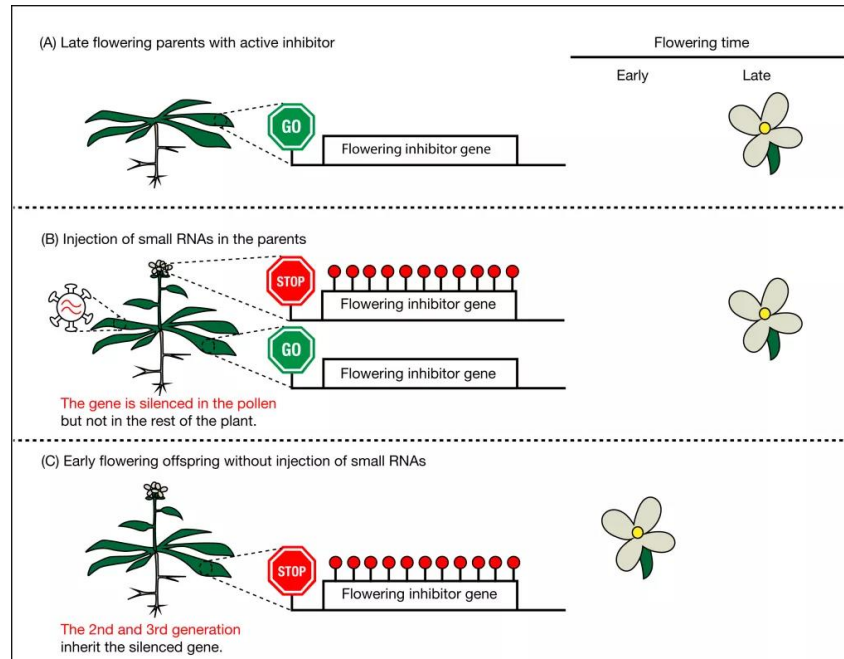
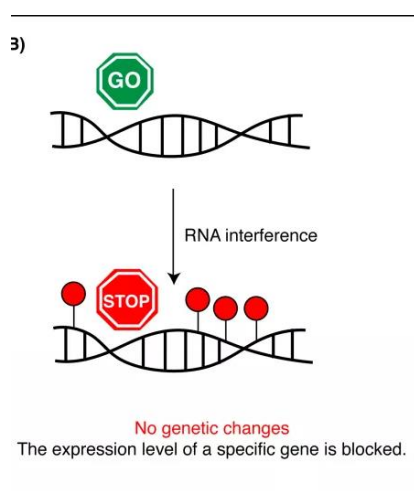
# Agroinfiltracija - vnos genov z bakterijo agrobacterium

- Običajno gre za prehodno povečano izražanje ali utišanje genov na ravni infiltriranega tkiva
- Predvsem za raziskovalne namene
- Proizvodnja proteinov v rastlinah



# Epigeneteske spremembe

- Metilacija regulira izražanje genov

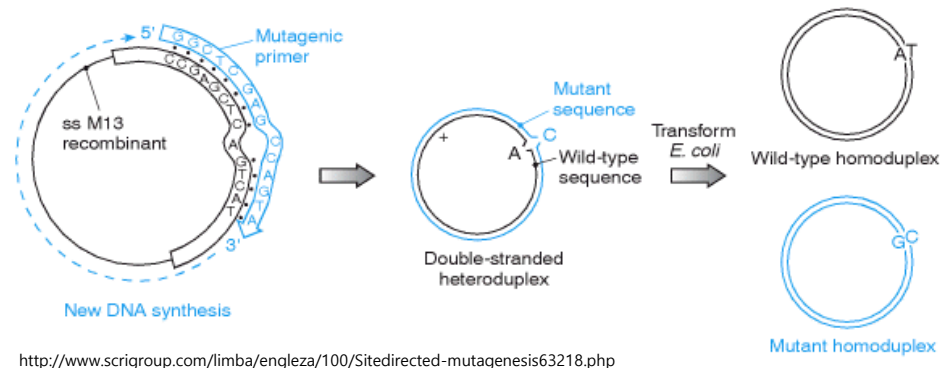


<http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/epigenetics-in-plant-breeding/>

- Rastline ne vsebujejo rekombinantne DNA
- Zaporedja nukleotidov niso spremenjena

# Z oligonukleotidi izzvane mutacije

- Oligonukleotidi (kratki fragmenit DNA) v genomu inducirajo ciljne mutacije enega ali nekaj sosednjih nukleotidov
- Vnos v celice z različnimi metodami
- Vezava na komplementarna tarčna zaporedja z nekaj neskladji
- Neskladja popravijo celični popravljalni mehanizmi (v genomu ali oligonukleotidu)



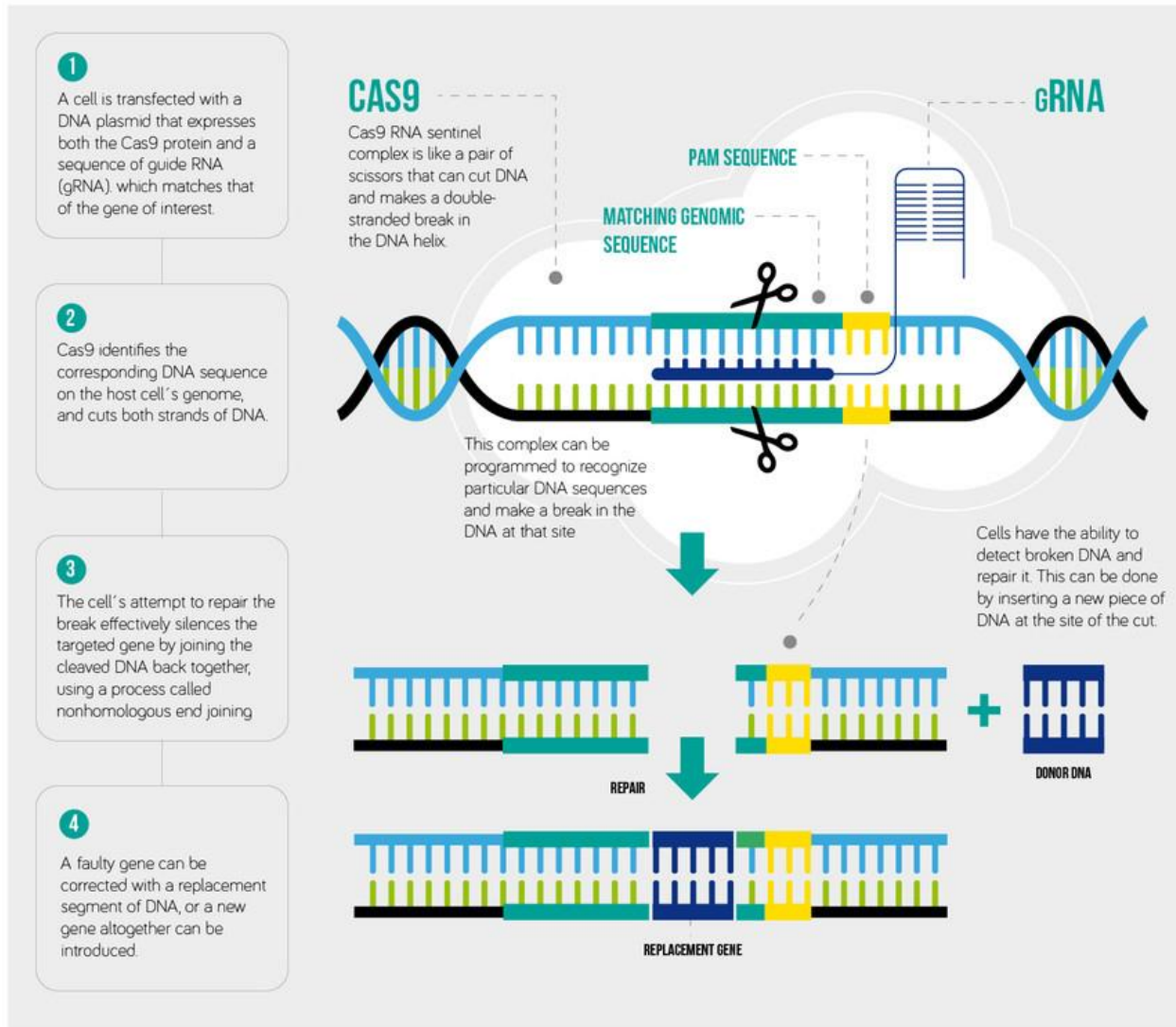
- V ZDA je na trgu oljna ogrščica, ki je tolerantna na herbicid.
- V razvoju še ostali produkti (lan, riž in krompir).

# Tehnologije usmerjenih nukleaz

---

- Usmerjene nukleaze prerežejo DNA na točno določenem zaporedju
- Prekinitev dveh verig (double-stranded breaks (DSBs)) omogočajo nastanek naključnih ali specifičnih mutacij ali vstavljanje velikih segmentov, npr. celih genov
- Tehnika temelji na naravnih celičnih mehanizmih za popravljanje prekinitev DNA
  
- Nukleaze v uporabi:
  - Meganukleaze
  - nukleaze cinkovih prstov (ZFN)
  - nukleaze TAL-efektorjev (TALEN)
  - sistem CRISPR/Cas

# CRISPR/CAS9 tarčno urejanje genoma



<https://www.freelancer.com/contest/Diagram-of-CRISPRCas-work-flow-973130-byentry-12836608.html>



# V ZDA je odobrenih šest organizmov, ki so bili spremenjeni s tehniko urejanja genov

- *Camelina sativa* s povečano vsebnostjo omega-3
- soja odporna na sušo in slanost
- *Setaria viridis* z zakasnjnim cvetenjem
- 2x koruza s škrobom izključno iz amilopektina
- gobe (beli šampinjoni), ki ne porjavijo tako hitro



Omenjeni organizmi v ZDA niso obravnavani kot GSO

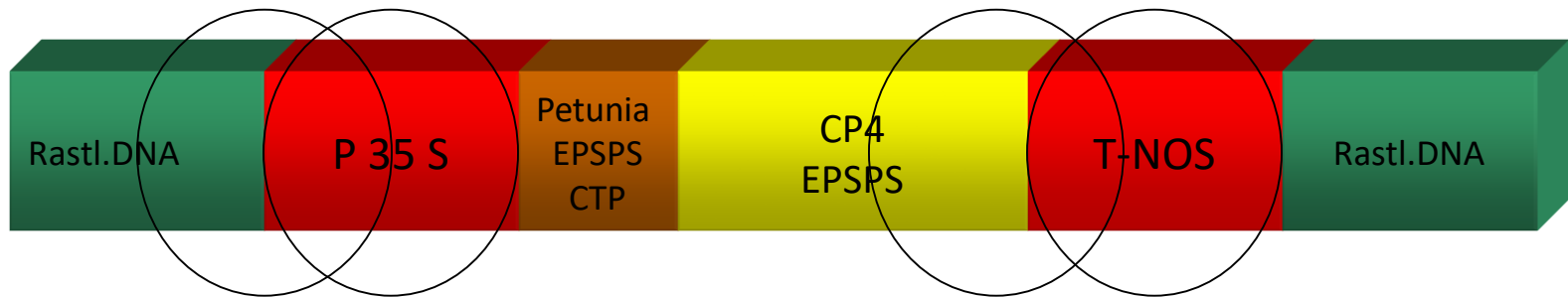
# Novi produkti bodo verjetno še naprej podvrženi temeljiti oceni tveganja iz vidika biološke varnosti

---

- CRP projekt: "Postopki za zagotavljanje varnosti in družbene sprejemljivosti novih tehnik in aplikacij v sintezni biologiji in sodobni biotehnologiji"
- COST projekt: "Genome editing in plants - a technology with transformative potential"

# Določanje GSO poteka preko potrjevanja prisotnosti vnesenih konstruktov

- Primer **Roundup Ready<sup>®</sup>** soja
- Lastnosti: Toleranca na glifosat (aktivna komponenta herbicida Roundup)

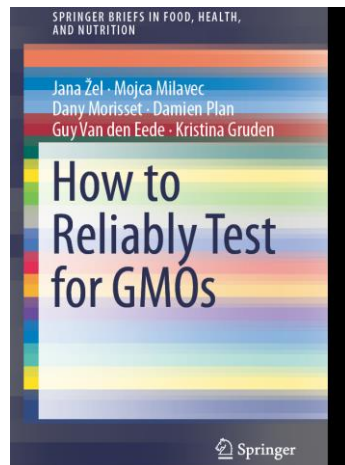


- **P-35 S** – promotor 35S
- **T –nos** – nos terminator
- **EPSPS** (5-enol-piruvil-šikimat-3-fosfat-sintaza) – bakterijska verzija encima neobčutljiva na Roundup.
- Petunia **EPSPS CTP** (CTP= chloroplast transit peptide) – gen za signalni peptid, ki olajša vnos novo nastale EPSP sintaze v kloroplaste, kjer poteka šikiminska pot in deluje glifosat. Po vnosu se ta peptid razgradi s proteazami

# Izzivi določanja prisotnosti GSO pridobljenih z novimi tehnikami

---

- V večini primerov nujno potrebne informacije o genski spremembi
- Neciljano določanje precej bolj kompleksno
- Ločevanje produktov pridobljenih s klasičnimi in novimi tehnikami izredno težavno



# Hvala za pozornost!

---

