

# Στοχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”



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



Φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά απόδοσης

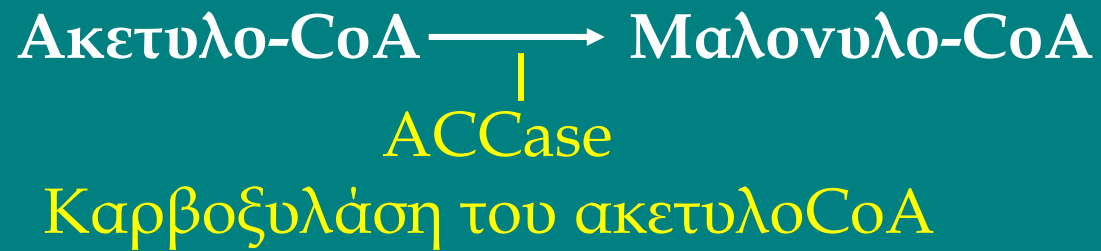
**τροποποίηση μεταβολισμού**

## Βιοτεχνολογικές εφαρμογές- Β

Διαγονιδιακά φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά ποιότητας και απόδοσης προϊόντων (τροποποίηση μεταβολισμού)

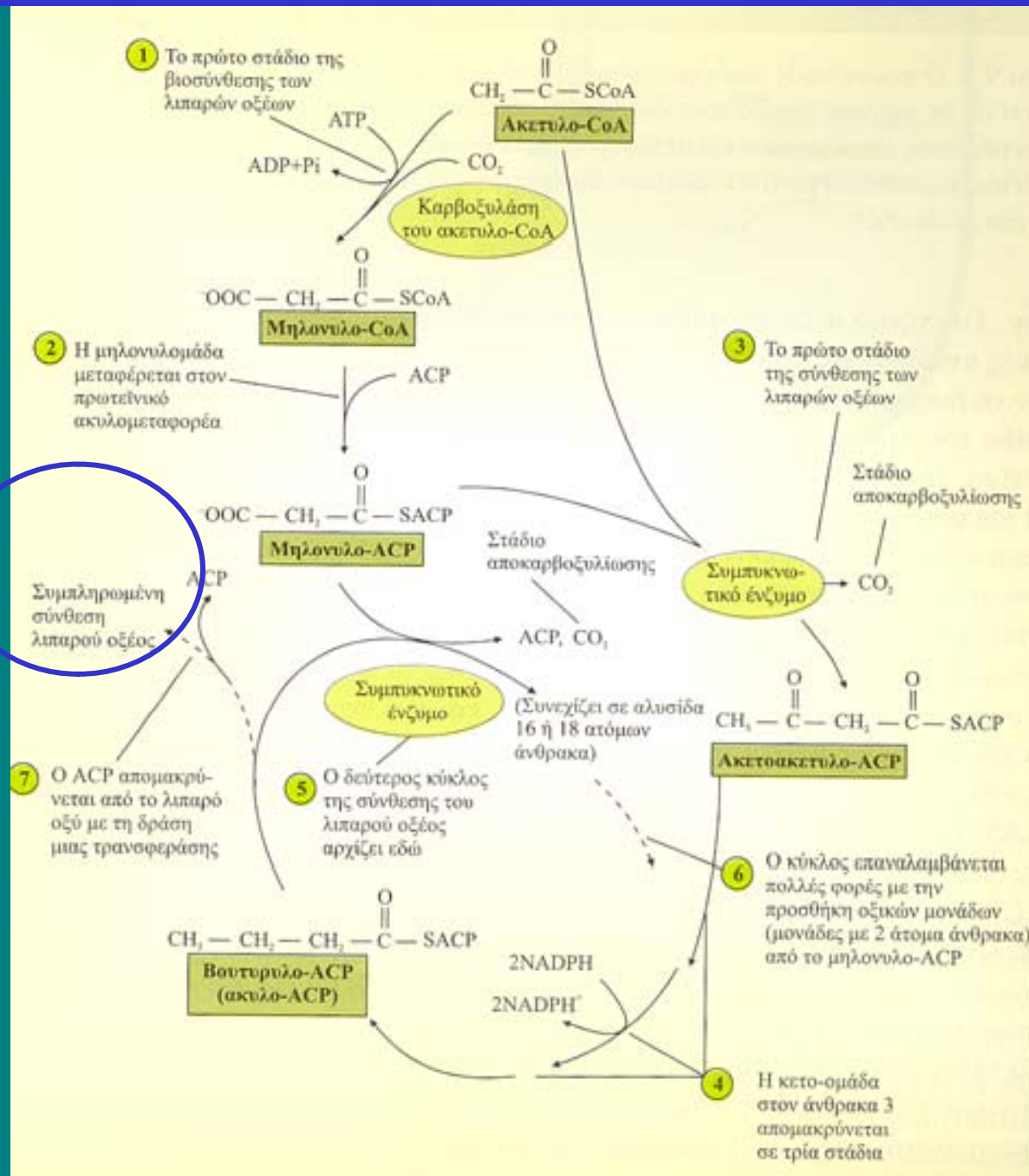
- ✓ Μεταβολισμός λιπιδίων
- ✓ Μεταβολισμός υδατανθράκων
- ✓ Δευτερογενής μεταβολισμός
- ✓ Αποθηκευτικές πρωτεΐνες – Σύσταση πρωτεϊνών
- ✓ Βιοσύνθεση αμινοξέων
- ✓ Φωτοσύνθεση

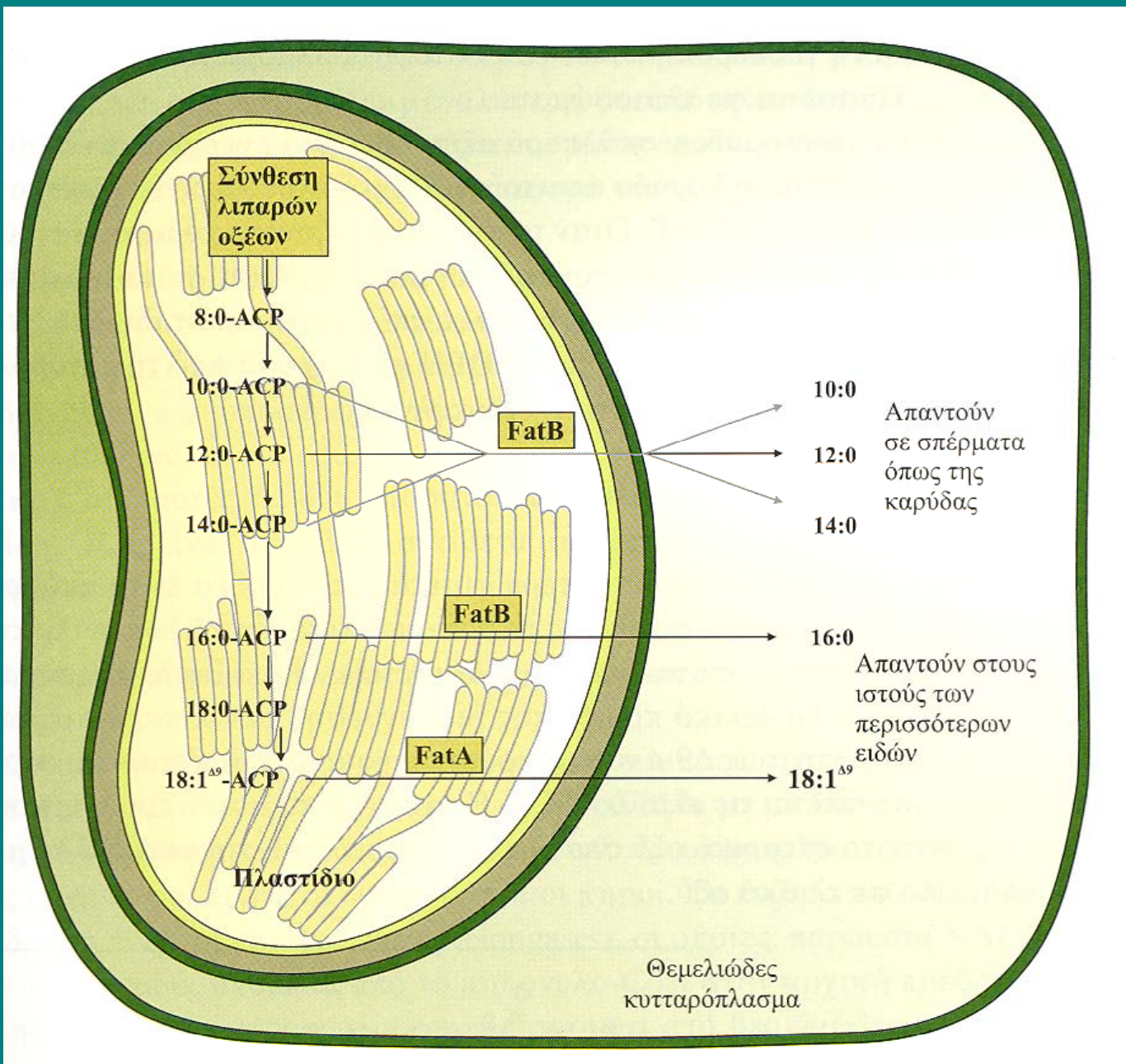
## Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων



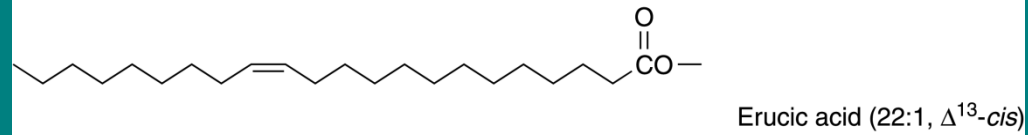
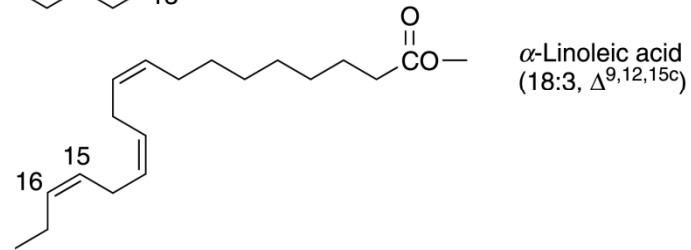
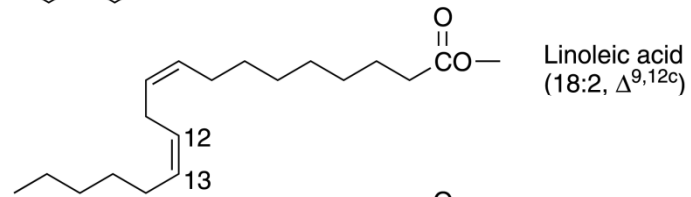
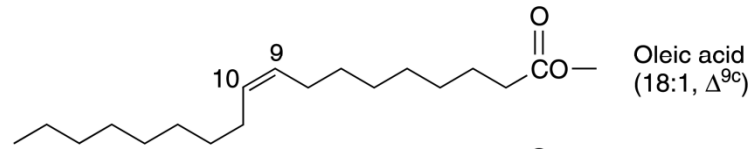
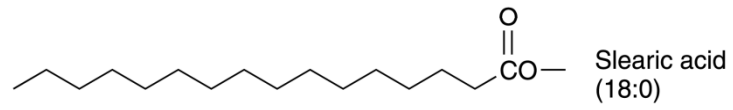
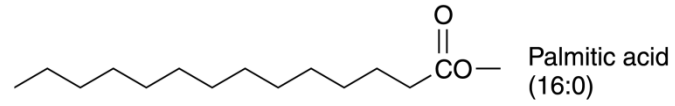
# Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στα πλαστίδια των φυτικών κυττάρων

16:0-ACP  
18:1-ACP  
(από αποκορεσμάση)

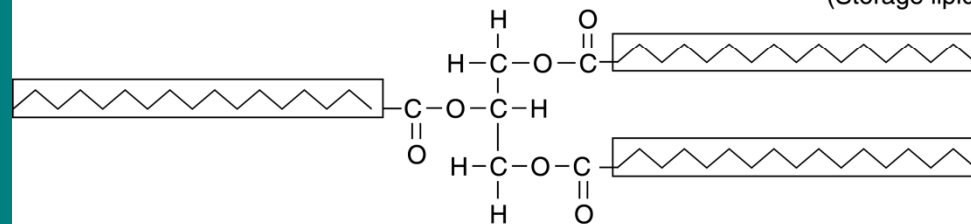




## Fatty acids

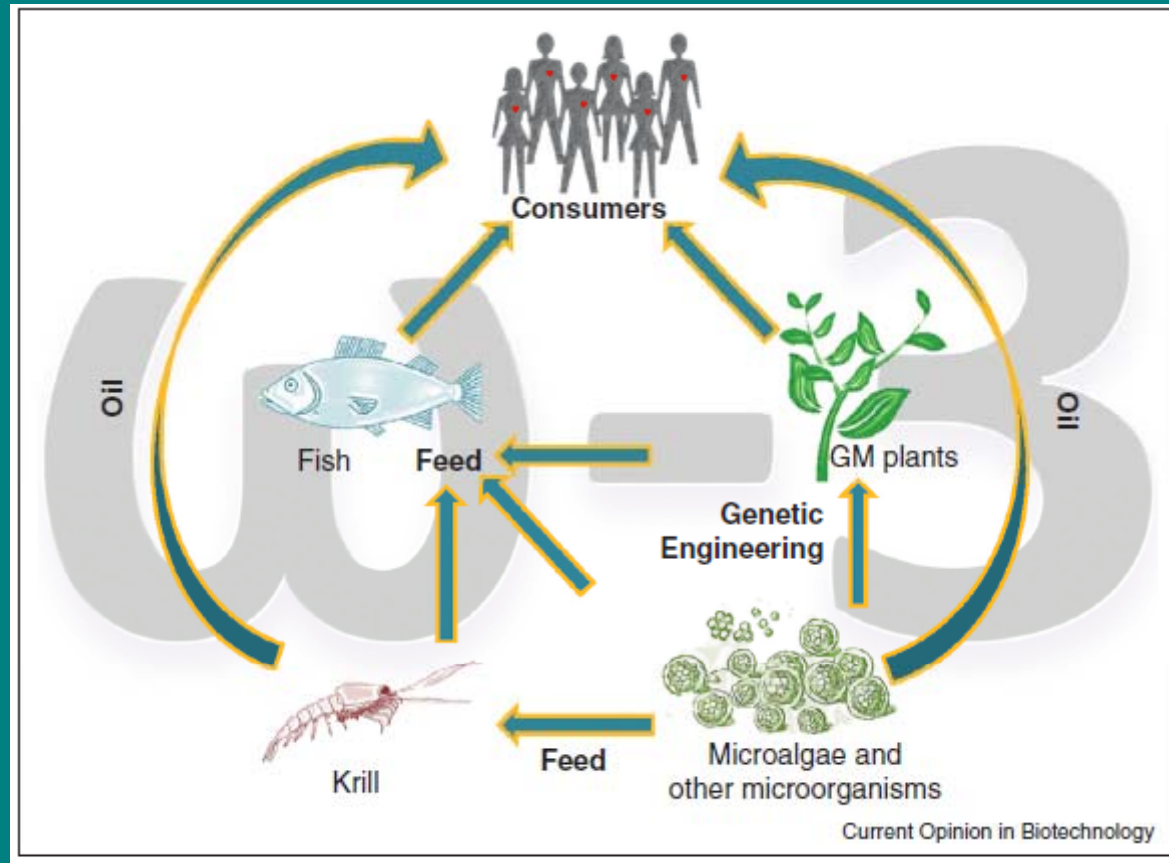


## Triacylglycerol (Storage lipid)





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



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

Sustainable omega-3 production Adarme-Vega, Thomas-Hall and Schenk





## Γενετική τροποποίηση μεταβολισμού λιπιδίων

- ✘ Βελτίωση των υπαρχόντων λιπιδικών προϊόντων
- ✘ Παραγωγή καινοφανών λιπιδικών προϊόντων

### ■ Παραγωγή λιπαρών οξέων με μικρότερες αλειφατικές αλυσίδες

Π.χ. C8-C14 coconut / palm kernels

(λαουρικό οξύ, 12:0 με υπερέκφραση θειοεστεράσης που υδρολύει Lauroyl-ACP σε ελαιοκράμβη)

### ■ Παραγωγή λιπαρών οξέων με μεγαλύτερες αλειφατικές αλυσίδες

Π.χ. C22:1 $\Delta$ <sub>13</sub> ερουκικό οξύ

### ■ Τροποποίηση του βαθμού κορεσμού

Π.χ. Αύξηση στεατικού οξέος (18:0) σε σχέση με το ολεϊκό (19:1 $\Delta$ <sub>9</sub>) με antisense γονίδιο της  $\Delta$ 9 desaturase

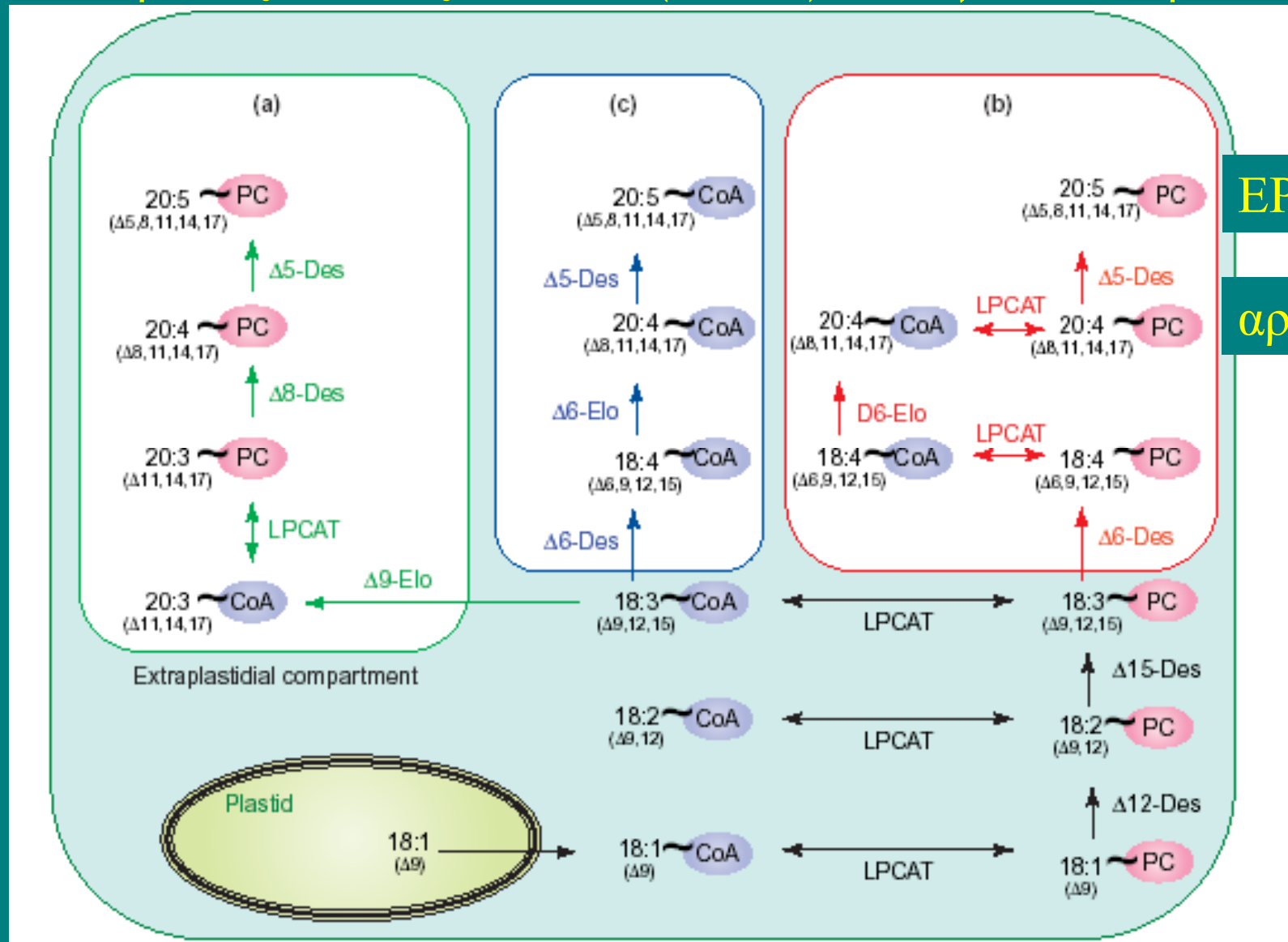
Αύξηση του ολεϊκού σε σχέση με το λινολεϊκό με σίγηση (συν-καταστολή) γονιδίου της  $\Delta$ 12 desaturase (88%)

### ■ Παραγωγή “σπάνιων” λιπαρών οξέων

Π.χ. Πετροσελινικό οξύ (18:1 $\Delta$ <sub>6</sub>)

$\gamma$ -λινολενικό (18:3 $\Delta$ <sub>6,9,12</sub>), αραχιδονικό (20:4 $\Delta$ <sub>5,8,11,14</sub>) με υπερέκφραση καταλλήλων desaturases από άλλους οργανισμούς π.χ. *Mortierella alpina*

■ Βιοσύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με πολύ μακριές αλιφατικές αλυσίδες-LCPUFA ( $\omega 3$  /  $\omega 6$ ) σε διαγονιδιακά φυτά



ΕΡΑ

αραχιδονικ

**Table 1. LCPUFAs in salmon and in different transgenic plants**

Host	Heterologous enzymes expressed <sup>b</sup>	Fatty acids <sup>a</sup> (%)					$\Delta$ 6-desaturation (%) <sup>c</sup>	Elongation (%) <sup>c</sup>	Refs
		LCPUFA	ARA	EPA	DPA	DHA			
<i>Arabidopsis</i> leaves	Ig $\Delta$ 9Elo + Eg $\Delta$ 8Des + Ma $\Delta$ 5Des	22.5	6.6	3.0	0.0	0.0	0.0	36.5 ( $\Delta$ 9)	[13]
<i>Arabidopsis</i> seeds	Ig $\Delta$ 9Elo	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.9 ( $\Delta$ 9)	[21]
Linseed seeds	Pt $\Delta$ 6Des + Pp $\Delta$ 6Elo + Pt $\Delta$ 5Des	6.5	2.7	1.6	0.0	0.0	59.4	14.9 ( $\Delta$ 6)	[14]
Soybean seeds	Sd $\Delta$ 6Des + Ma $\Delta$ 6Elo + Ma $\Delta$ 5Des and At $\Delta$ 15Des + Sd $\Delta$ 17Des	35.1	2.2	19.6	0.8	0.0	77.8	73.3 ( $\Delta$ 6)	[15]
Soybean somatic embryos	Sd $\Delta$ 6Des + Ma $\Delta$ 6Elo + Ma $\Delta$ 5Des and Psp. $\Delta$ 5Elo + Sa $\Delta$ 4Des + Sd $\Delta$ 17Des	26.6	5.2	6.1	0.0	3.1	33.6	78.9 ( $\Delta$ 6)	[15]
Steak from farmed Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )		21.7	0.5	6.0	2.8	11.0	79.6	92.7 ( $\Delta$ 6)	[23]

<sup>a</sup>ARA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA,  $\omega$ 3-docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; LCPUFA, very long-chain polyunsaturated fatty acids.

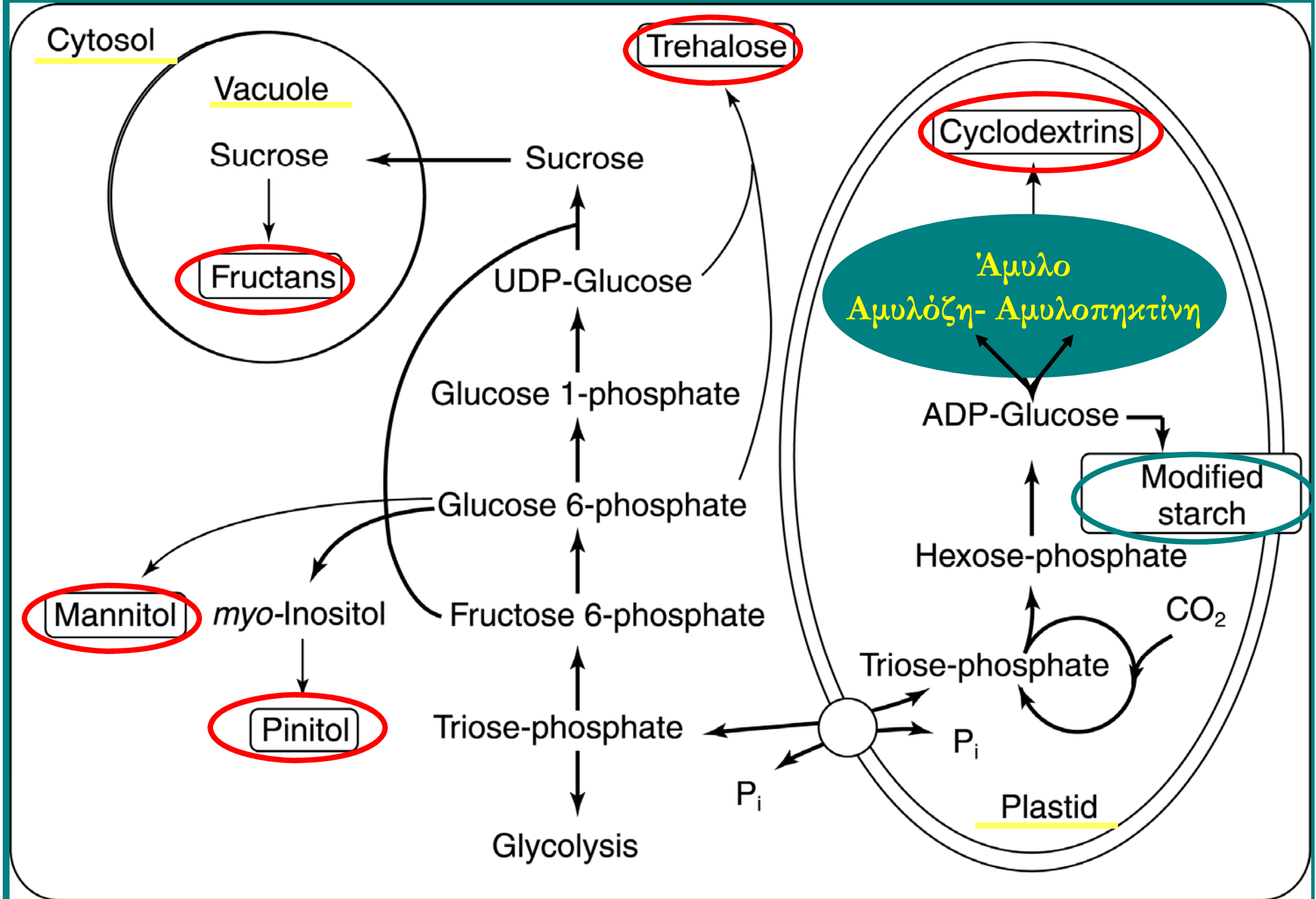
<sup>b</sup>Abbreviations for organisms: At, *Arabidopsis thaliana*; Eg, *Euglena gracilis*; Ig, *Isochrysis galbana*; Ma, *Mortierella alpina*; Psp, *Pavlova* sp; Pt, *Phaeodactylum tricornutum*; Pp, *Phycomitrella patens*; Sa, *Schizochytrium aggregatum*; Sd, *Saprolegnia diclina*. Abbreviations for enzymes: Des, fatty acid desaturases with the regiochemistry indicated by the  $\Delta$  symbol; Elo, fatty acid elongases with a preference for fatty acids with the carboxyl closest double bond in the indicated  $\Delta$ -position.

<sup>c</sup>Percentage of  $\Delta$ 6-desaturation and elongation refers to percentage of available substrate converted.

## Γενετική τροποποίηση μεταβολισμού υδατανθράκων

- ✘ Αύξηση της συσώρευσης αμύλου και υδατοδιαλυτών σακχάρων (σουκρόζη/ φρουκτόζη/ παλατινόζη)
- ✘ Τροποποίηση της δομής αμύλου
- ✘ Παραγωγή καινοφανών υδατοδιαλυτών υδατανθράκων (κυκλοδεξτρίνη, ολιγοφρουκτάνες, τρεχαλόζη)

# Βιοσύνθεση υδατανθράκων



Φωσφορική εξόζη

Πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης

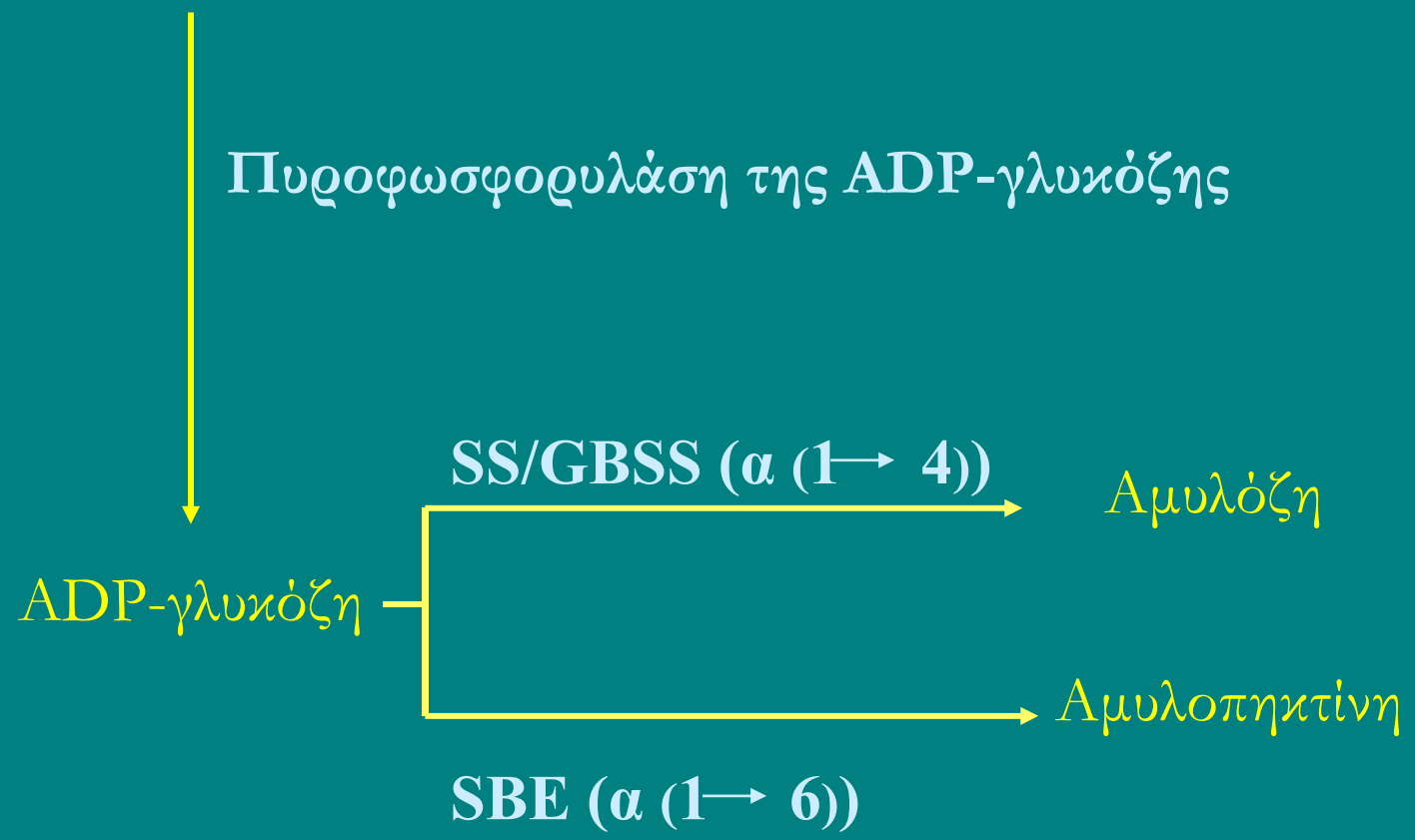
ADP-γλυκόζη

SS/GBSS ( $\alpha$  (1 $\rightarrow$  4))

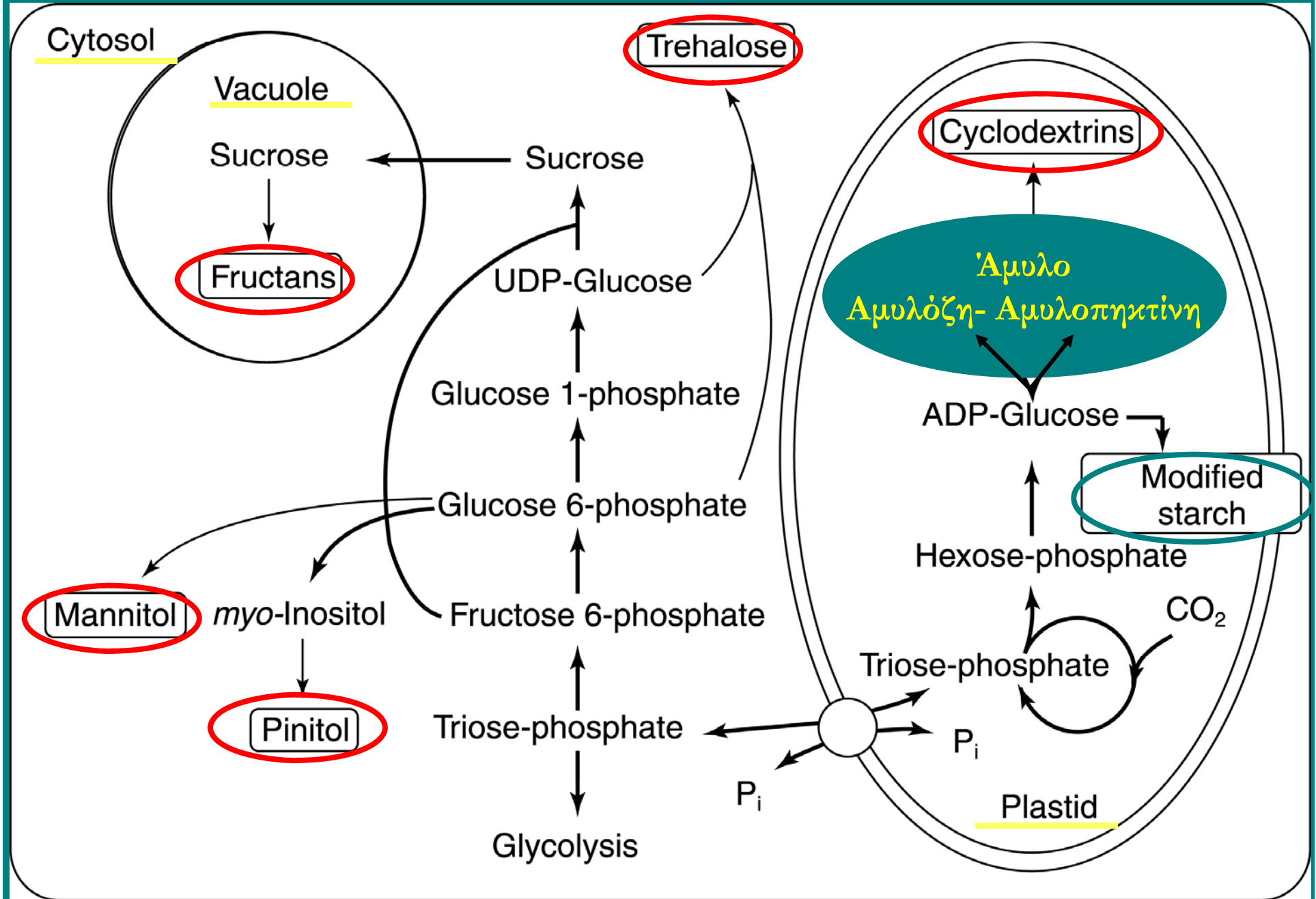
Αμυλόζη

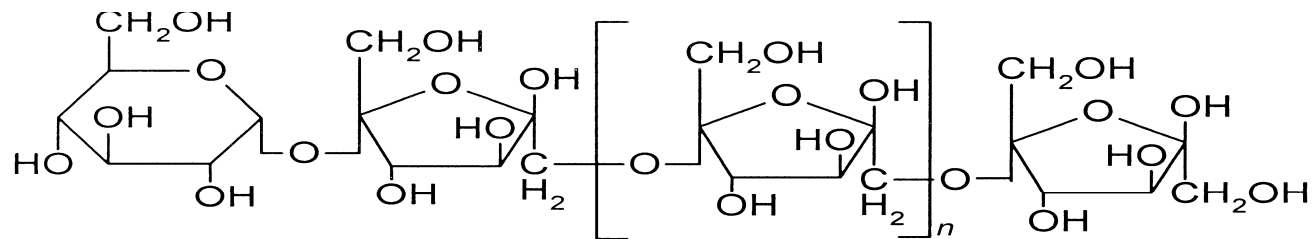
Αμυλοπηκτινή

SBE ( $\alpha$  (1 $\rightarrow$  6))

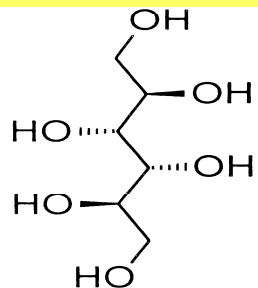


# Βιοσύνθεση υδατανθράκων



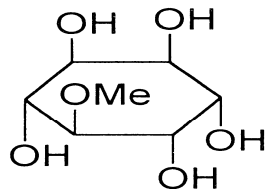


## Ολιγοφρουκτάνη (levans, inulins)



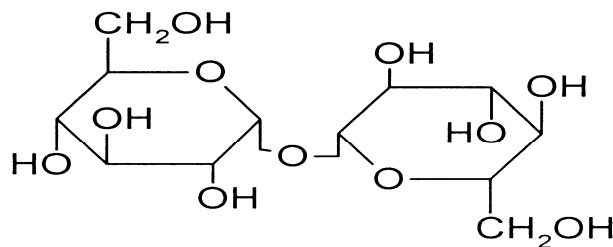
mannitol

## Μαννιτόλη

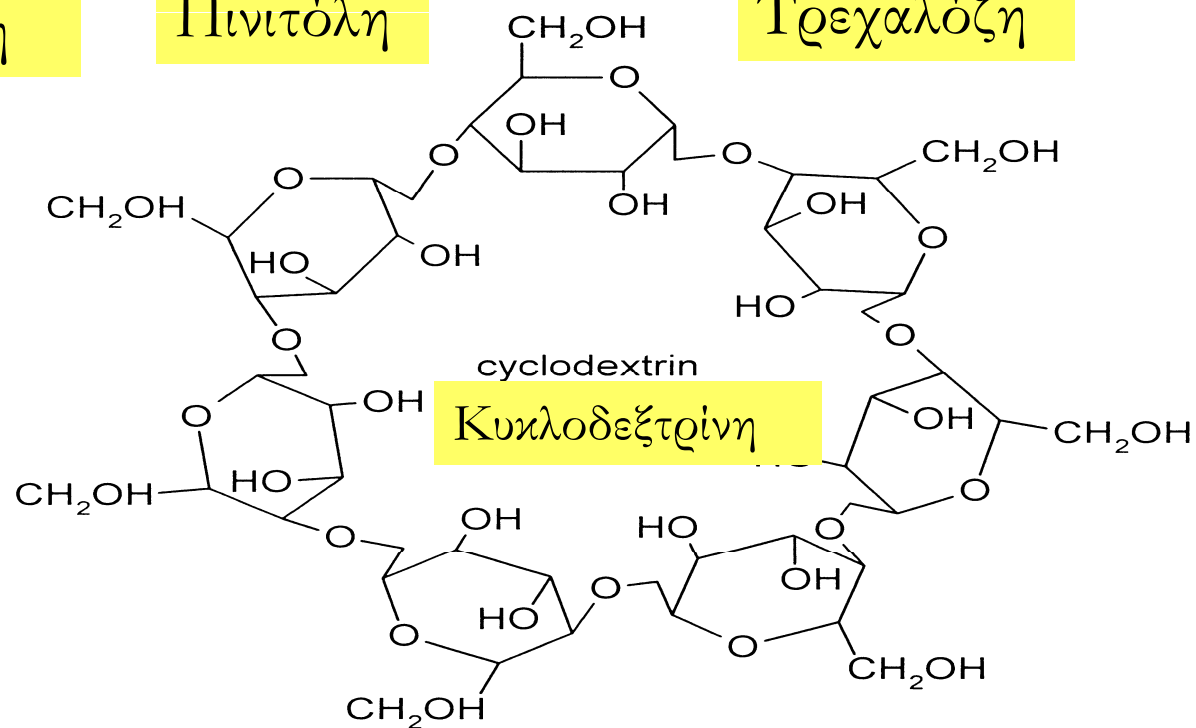


inositol

## Πινιτόλη



## Τρεχαλόζη

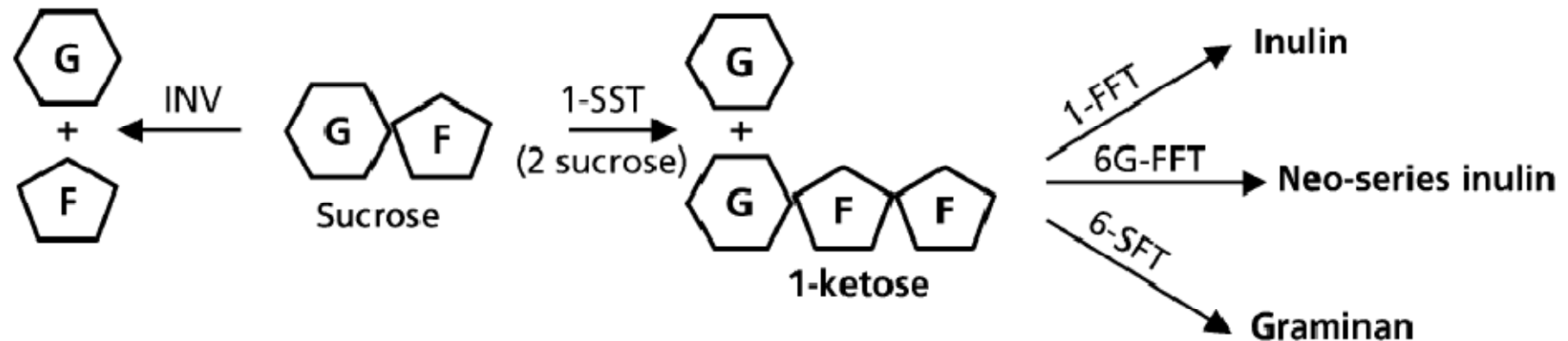


cyclodextrin

## Κυκλοδεξτρίνη



# Φρουκτάνες: πολυμερή φρουκτόζης που συντιθενται από συνκρόση με τη δράση των φρουκτοσυλτρανσφερασών



**Figure 1.** Enzymatic reactions of invertases and fructosyltransferases. The different sugars are depicted as strings of monosaccharides. G, glucose; F, fructose; INV, invertase; 1-SST, sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase; 1-FFT, fructan:fructan 1-fructosyltransferase; 6G-FFT, fructan:fructan 6G-fructosyltransferase; 6-SFT, sucrose:fructan 6-fructosyltransferase.

## Πολυ-/ ολιγο-φρουκτάνες

- Nutraceuticals
- Βιομηχανία

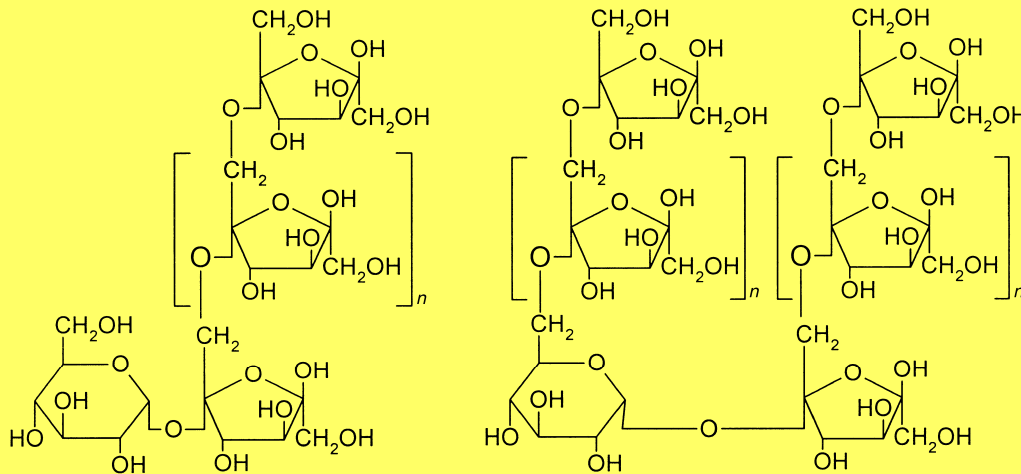
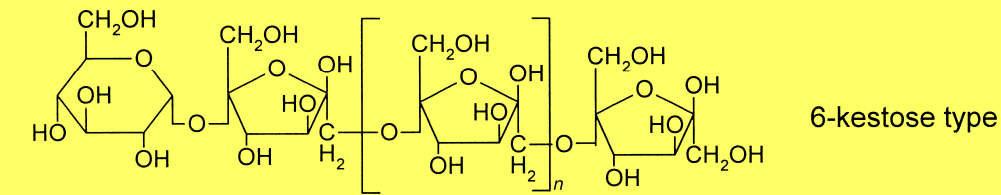
Υπερέκφραση σε καπνό  
/ πατάτα

- *sacB B. subtilis* (levansucrase)  
- *ftf Streptomyces spp.*

με την ενσωμάτωση και  
αλληλουχιών για έκφραση στα  
χυμοτόπια

Υπερέκφραση σε καλαμπόκι  
- *sacB B. Amyloliquifaciens*

Υπερέκφραση σε τεύτλο  
- *sst* αγκινάρα (**fructan beet**)



-SST (sucrose-sucrose fructosyltransferase)  
-FFT (fructan-fructan fructosyltransferase)

*The Plant Journal* (2006) 48, 228–237

doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02862.x

## **Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box**

Tita Ritsema<sup>1,2,\*†</sup>, Lázaro Hernández<sup>2,3</sup>, Auke Verhaar<sup>2</sup>, Denise Altenbach<sup>1</sup>, Thomas Boller<sup>1</sup>, Andres Wiemken<sup>1</sup> and Sjeef Smeekens<sup>2</sup>

## Αποθηκευτικές πρωτεΐνες

- αλβουμίνες
  - γλοβουλίνες (vicilin, legumin, phaseolin)
  - προλαμίνες (gliadin, zein, avenin, hordein)
  - γλουτελίνες (glutenin, hordenin)
- } δικότυλα
- } μονοκότυλα

## Γενετική τροποποίηση σύστασης πρωτεϊνών

✘ Εμπλουτισμός ενδογενών πρωτεϊνών με τα απαραίτητα αμινοξέα  
Π.χ. Phaseolin / vicilin με μεθειονίνη

✘ Δημιουργία συνθετικών πρωτεϊνών από συνθετικά γονίδια  
(Keeler et al, 1997, Plant Molecular Biology, 34:15-29)

✘ Υπερέκφραση γονιδίων άλλων φυτών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα σε καλαμποκι, σογια, λουπινα, ρύζι

Π.χ. Zein 25% Met, prolamin 20% Met, Brazil nut albumin 18% Met/ 8% Cys, glycinin 11.5% lysine , chymotrypsin inhibitor 2 lysine-rich

## Περιορισμοί

- Επίπεδα έκφρασης, σταθερότητα και αναδίπλωση των τροποποιημένων πρωτεϊνών
  - Χρήση εξειδικευμένων προαγωγέων (σπόρων, πλαστιδίων)
  - Εισαγωγή πεπτιδίων στις μη συντηρημένες περιοχές των αποθηκευτικών πρωτεϊνών
- Χαμηλό περιεχόμενο στα απαραίτητα αμινοξέα
  - Τροποποίηση βιοσυνθετικών μονοπατιών των αμινοξέων
- Συνολική περιεκτικότητα σε θείο: σταθερή
- Ελάττωση της περιεκτικότητας ενδογενών πρωτεϊνών και της βλάστησης και ζωτικότητας των σπόρων
- Αλλεργίες

## Δευτερογενείς μεταβολίτες

## Δευτερογενής μεταβολισμός

### Τερπενοειδή (terpenoids)

Μονοτερπένια (άρωμα, γεύση)

Αιθέρια έλαια, Taxol, καροτενοειδή, καουτσουκ

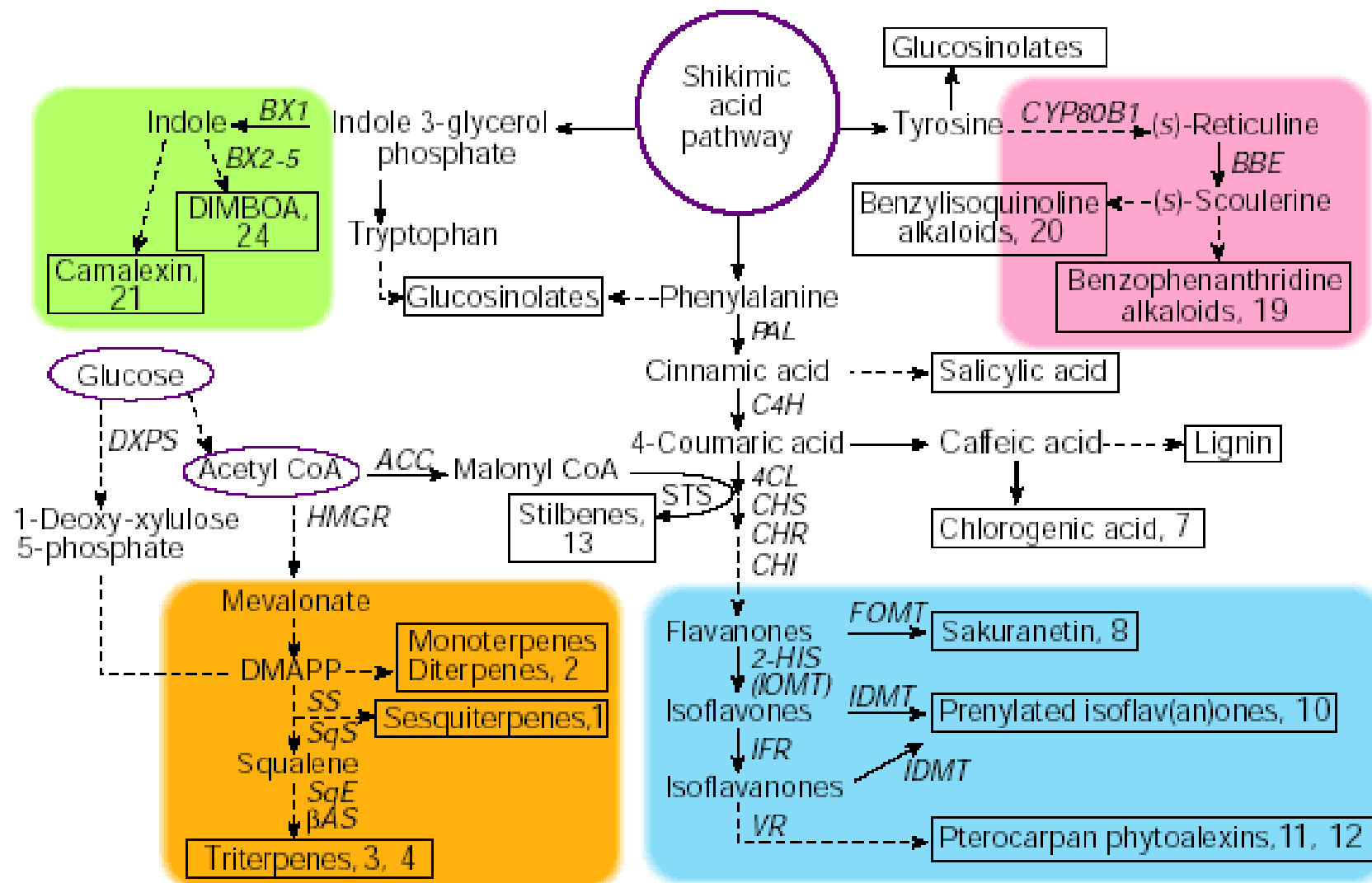
### Φαινυλπροπανοειδή (phenylpropanoids)

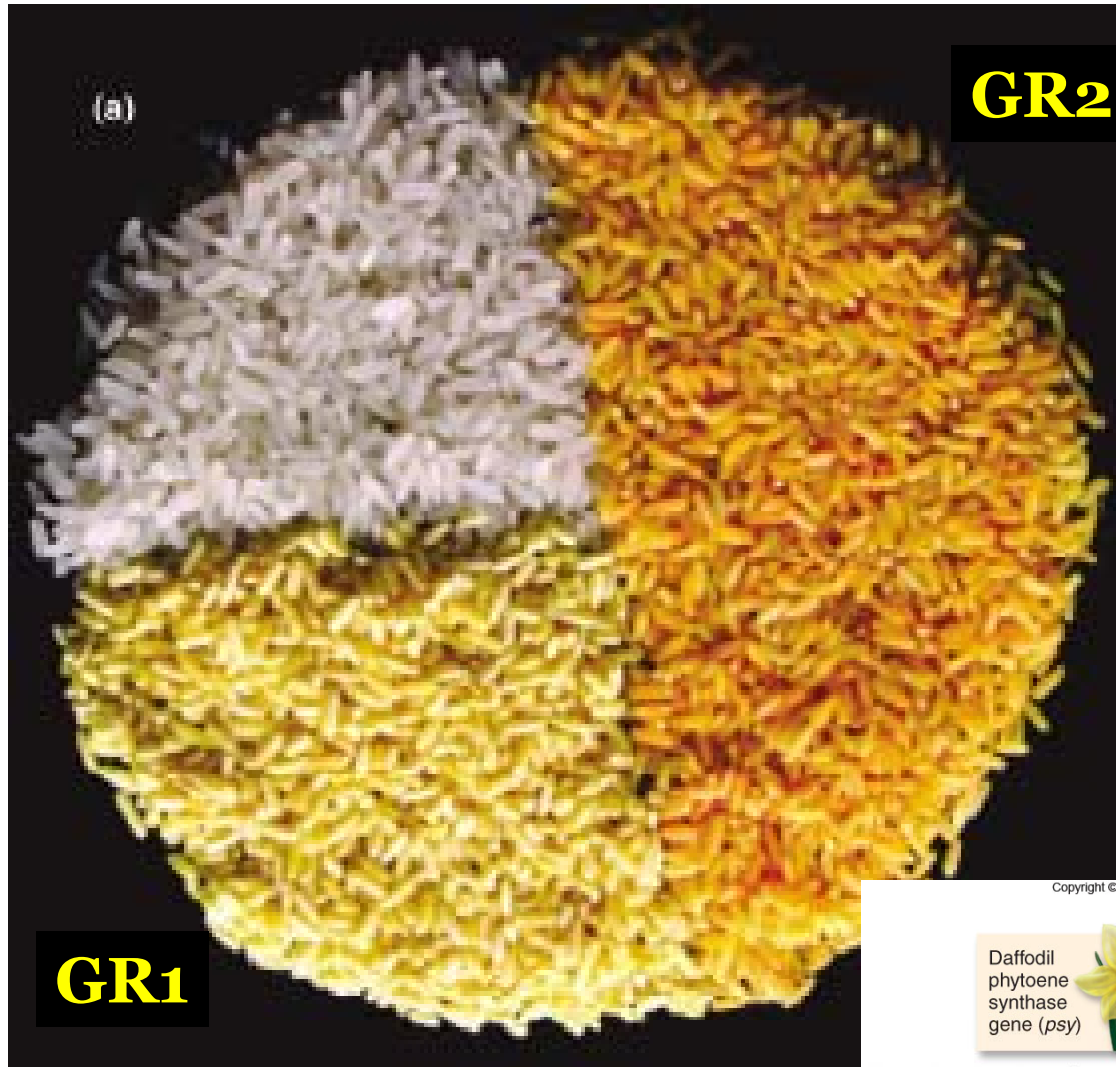
φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, ισοφλαβονοειδή, λιγνίνη

### Αλκαλοειδή (alkaloids):

κωδεΐνη, καφεΐνη, σκοπολαμίνη







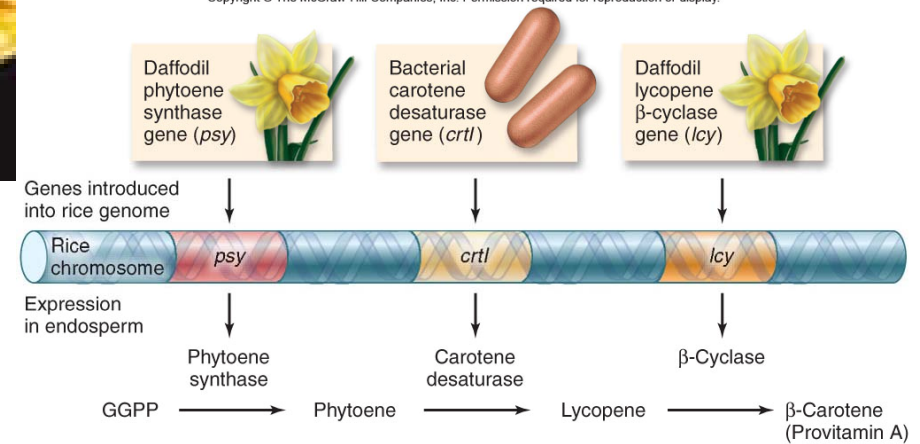
**GR2**

= 25 mg/g  $\beta$ -carotene

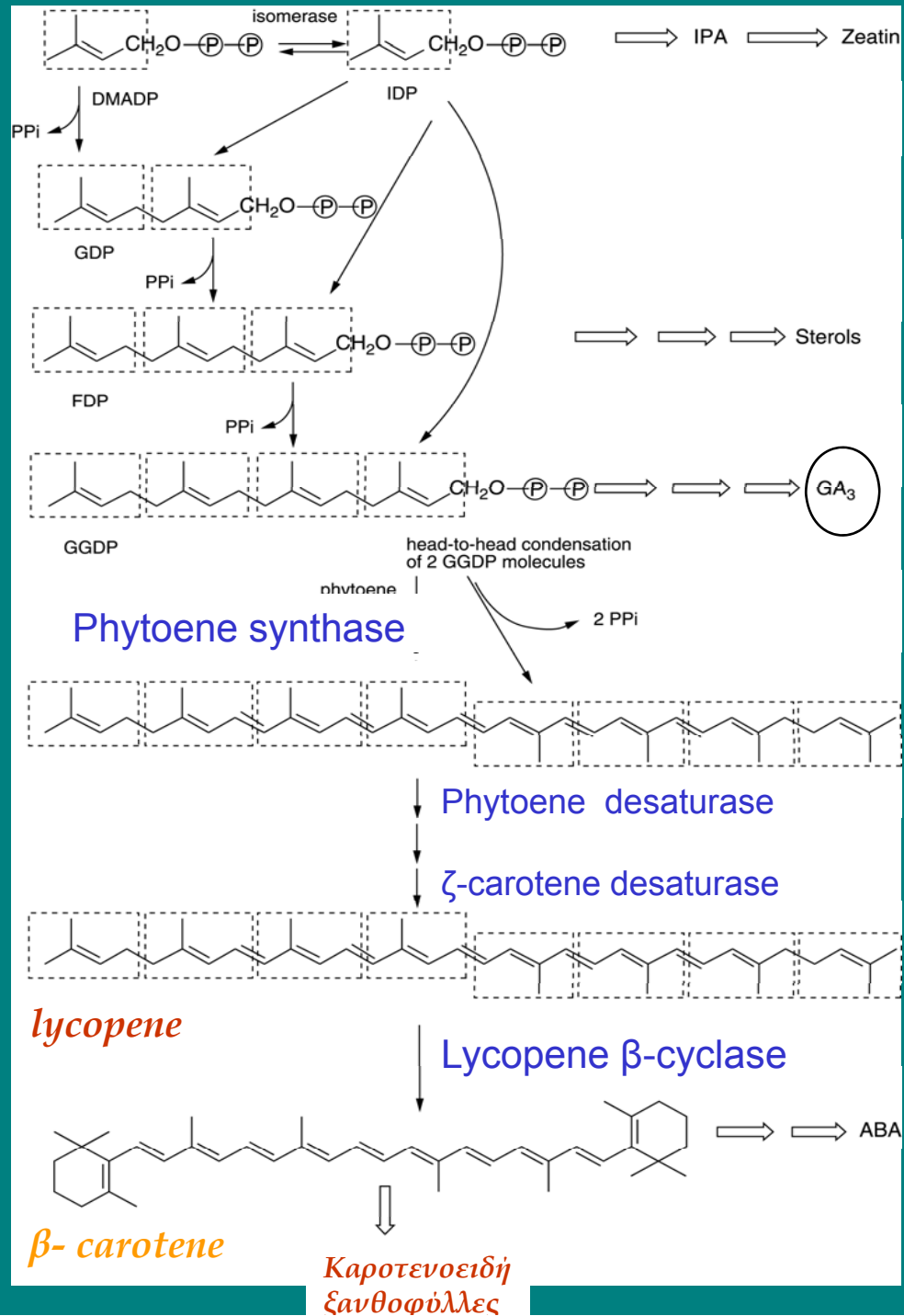
+εμπλουτισμός σε βιταμίνη Ε και σίδηρο

**GR1**

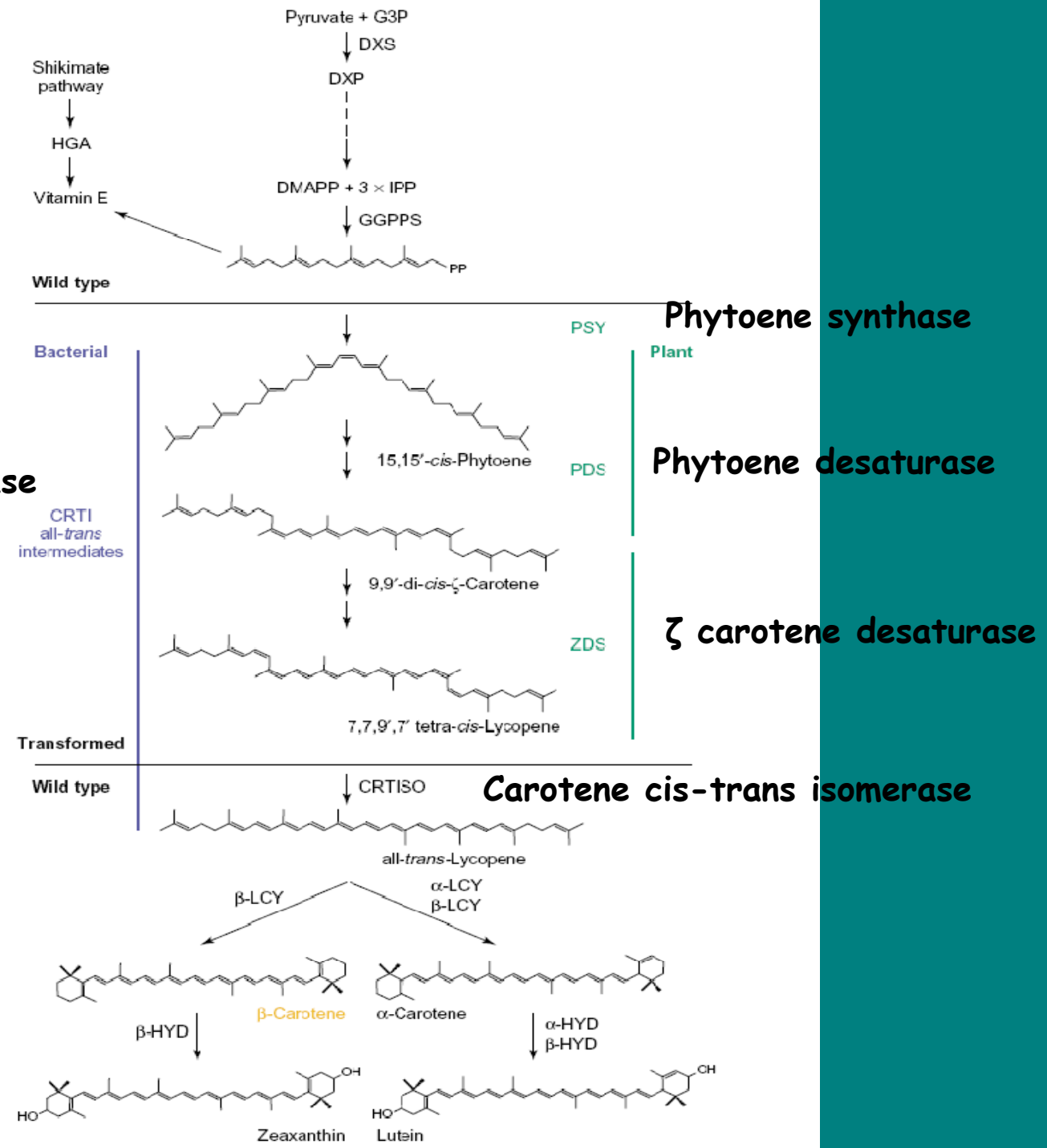
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



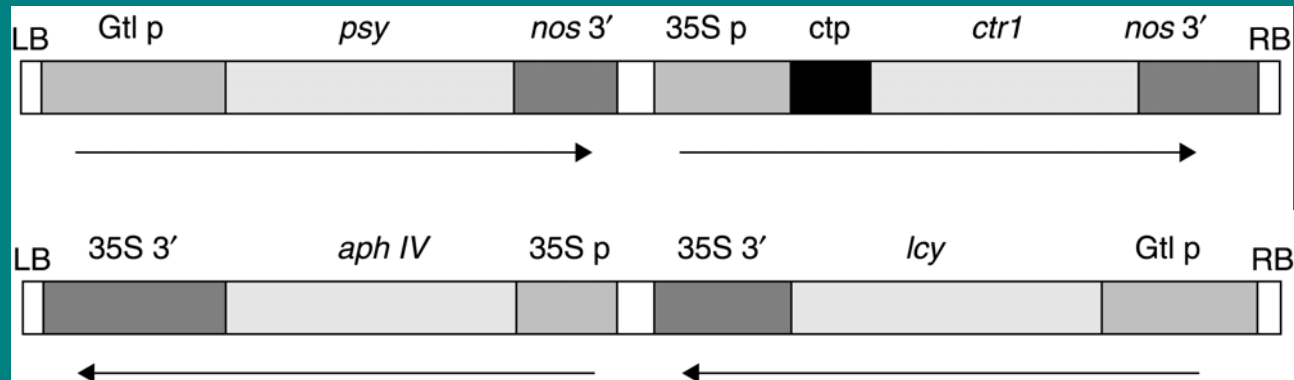
# Βιοσύνθεση καροτενοειδών



Carotene desaturase



## Constructs in Golden Rice



- ⊕ Daffodil phytoene synthase *psy*
- ⊕ Daffodil lycopene  $\beta$ -cyclase *lcy*
- ⊕ Rice glutelin promoter *Gtl*
- ⊕ Bacterial carotene desaturase gene *ctr1*
- ⊕ Hygromycin-resistance gene *aphIV*

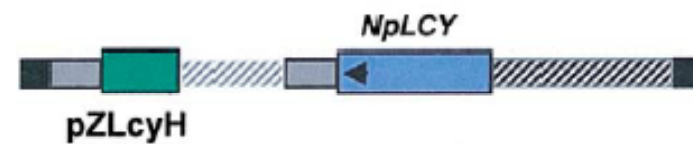
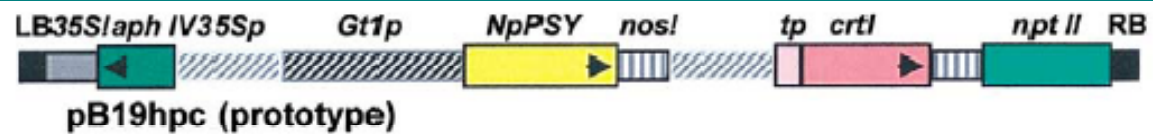


Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization

Trait category <sup>a</sup>	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development	Total by 2015 <sup>b</sup>
Insect resistance	21	2	11	25	59
Herbicide tolerance	11	5	4	13	33
Product quality <sup>c</sup>	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

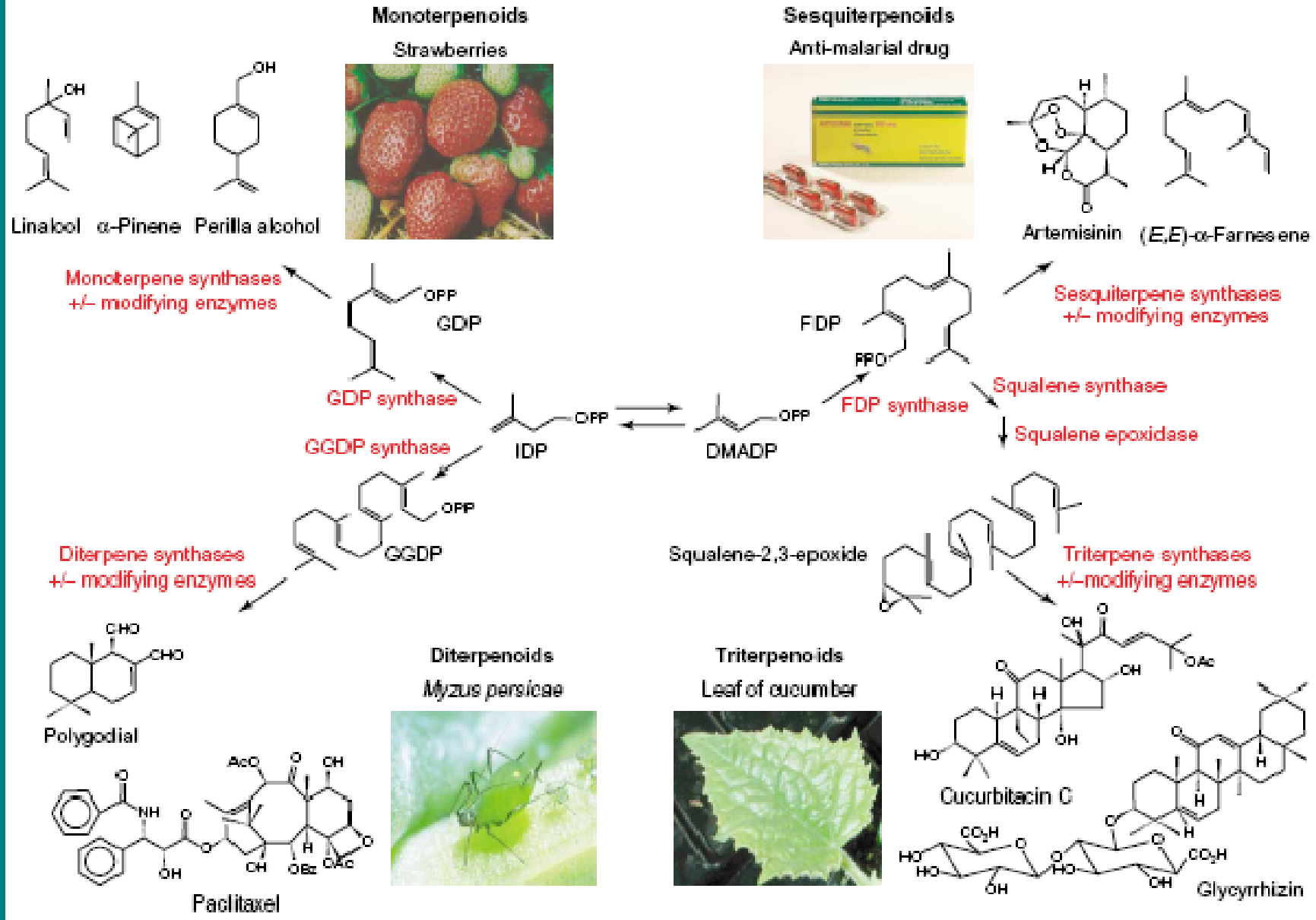
**Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη**

**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**

# ΤΕΡΠΕΝΟΙΔΗ





Terpene class	Engineered species	Target	Subcellular location	Regulation	Altered terpene profile <sup>a</sup>	Refs
Precursors	Mint	DXR	Plastid	Constitutive	Total essential oil ↑↓ <sup>b</sup>	[27]
	Tobacco	HMGR	Cytosol	Constitutive	No change	[31]
	<i>Arabidopsis</i>	DXS	Plastid	Constitutive	Taxadiene ↑	[28]
	<i>Arabidopsis</i>	HDR	Plastid	Constitutive	Taxadiene ↑	[28]
	<i>Artemisia</i>	FDP synthase	Cytosol	Constitutive	Artemisinin ↑	[35]
Mono terpenes	Mint	Limone synthase	Plastid	Constitutive	No change	[36]
	Mint	Limone synthase	Plastid	Constitutive	Several products ↑↓	[37]
	Mint	Limone synthase	Plastid	Constitutive	No change	[50]
	<i>Petunia</i>	Linalool synthase	Plastid	Constitutive	Linalool glycoside ↑	[38]
	Tomato	Linalool synthase	Plastid	Fruit specific	Linalool ↑, hydroxylated linalool ↑	[40]
	Carnation	Linalool synthase	Plastid	Constitutive	Linalool ↑, linalool oxides ↑	[41]
	<i>Arabidopsis</i>	Linalool/nerolidol synthase	Plastid	Constitutive	Linalool ↑, hydroxylated and glycosylated linalool ↑	[42]
	Potato	Linalool/nerolidol synthase	Plastid	Constitutive	Linalool ↑, hydroxylated and glycosylated linalool ↑	[42]
	Tobacco	γ-Terpinene synthase, β-pinene synthase and limonene synthase	Plastid	Constitutive	γ-Terpinene ↑, limonene ↑, β-pinene ↑ and side products ↑	[30]
	Tobacco	Limone synthase	Cytosol	Constitutive	Limone ↑	[53]
	Tobacco	Limone synthase	Plastid	Constitutive	Limone ↑	[53]
	Tobacco	Limone synthase	ER	Constitutive	No change	[53]
	Sesquiterpenes	Tobacco	Trichodiene synthase	Cytosol	Constitutive	Trichodiene ↓, oxygenated trichodiene <sup>c</sup> ↑
Tobacco		Amorpha-4,11-diene synthase	Cytosol	Constitutive	Amorpha-4,11-diene ↑	[45]
<i>Arabidopsis</i>		Linalool/nerolidol synthase	Plastid	Constitutive	Nerolidol ↑	[42]
<i>Arabidopsis</i>		Germacrene A synthase	Cytosol	Constitutive	Germacrene A ↑	[42]
<i>Arabidopsis</i>		Linalool/nerolidol synthase	Mitochondria	Constitutive	Nerolidol ↑, 4,8-dimethyl-1,3(E),7-nonatriene ↑	[47]
Diterpenes	<i>Arabidopsis</i>	Taxadiene synthase	Plastid	Constitutive, induced	Taxadiene ↑	[29]
Modified terpenes	Mint	Menthofuran synthase	ER	Constitutive	Menthofuran ↓, pulegone ↓, menthol ↑	[27]
	Tobacco	Cembratriene-diol hydroxylase	ER	Constitutive	Cembratriene-diol ↓, cembratrien-ol ↑	[51]
	Mint	Limone hydroxylase	ER	Constitutive	Limone ↑, menthofuran ↓, isomenthone ↓, menthol ↓, menthone ↓	[50]
	Tobacco	Limone hydroxylase	ER	Constitutive	Isopiperitenol and derivatives ↑	[52]

Abbreviations: DXR, deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase; DXS, deoxyxylulose 5-phosphate synthase; FDP, farnesyl diphosphate; HDR, hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase; HMGR, hydroxymethylglutaryl CoA reductase.

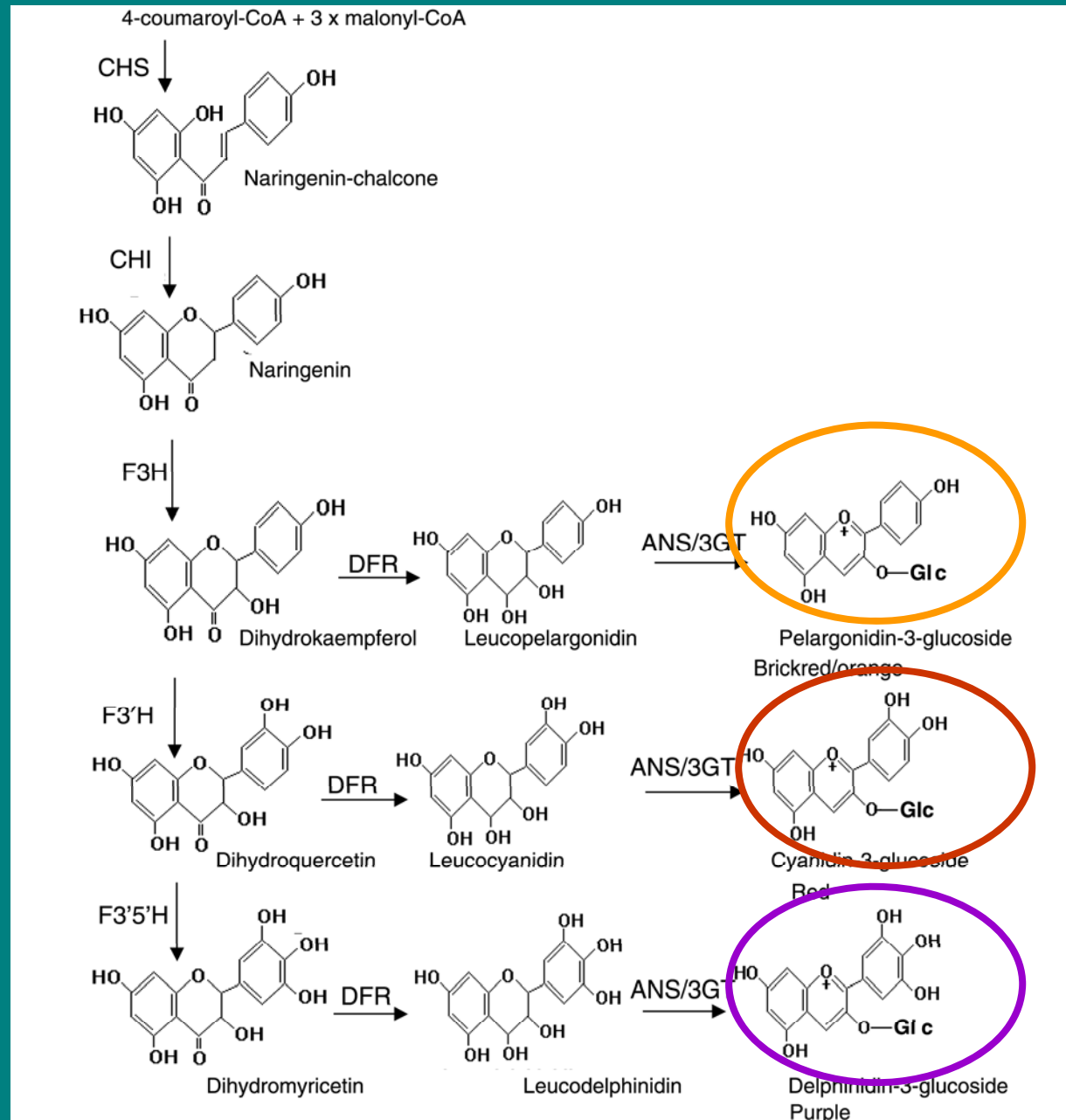
<sup>a</sup>Terpenoids that have been reduced (↓) or increased (↑) in amount.

<sup>b</sup>Overexpression sometimes resulted in co-suppression. Therefore, in different plants, levels of certain compounds were up- or downregulated.

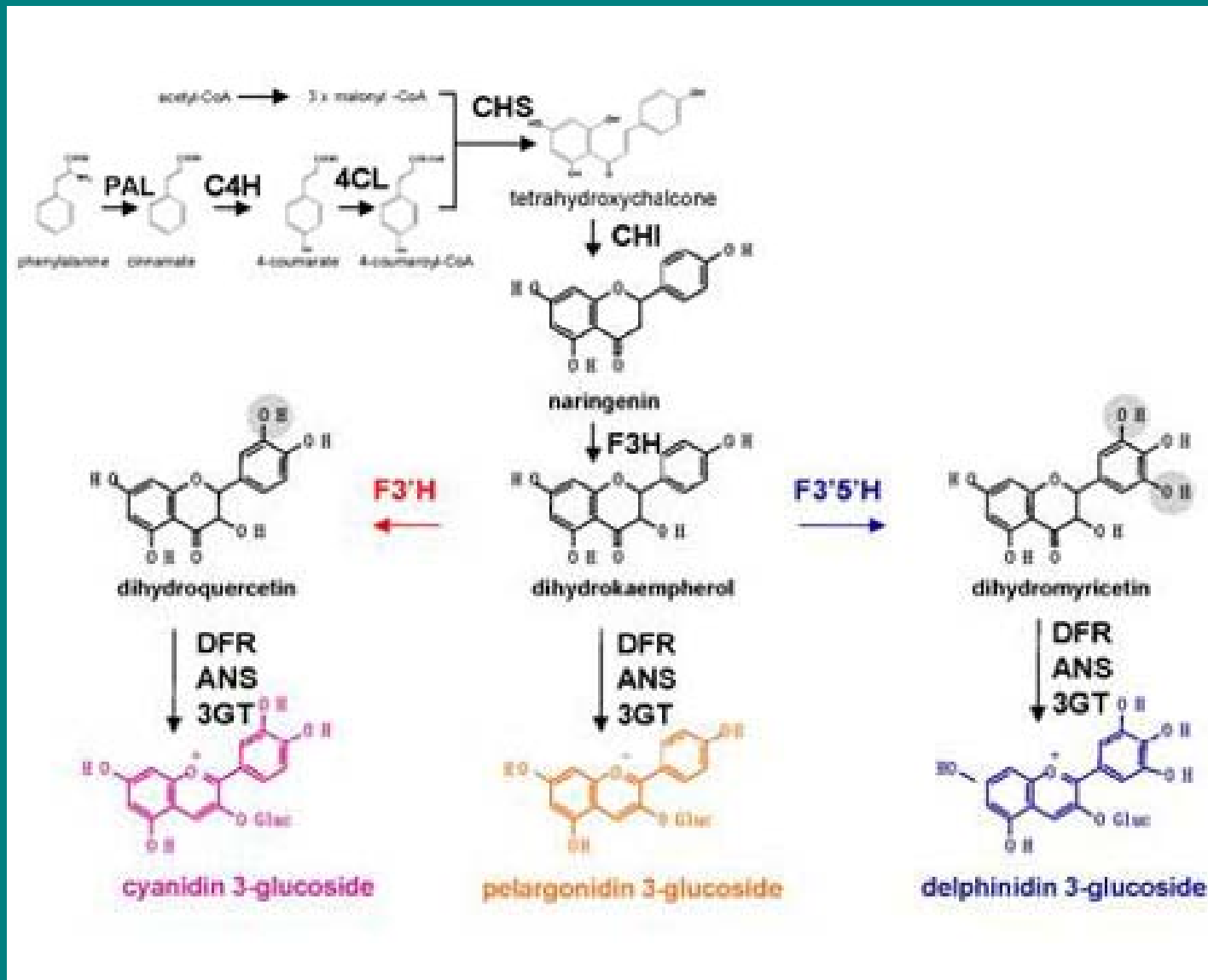
<sup>c</sup>Formation of oxygenated trichodiene was detected after induction by an elicitor.

# Βιοσύνθεση ανθοκυανινών (φλαβονοειδή)

Phenylalanine  
 ↓ PAL  
 cinnamate  
 ↓ C4H  
 4-coumarate



# Σύνθεση ανθοκυανινών





Florigene Moonshadow™



Florigene Moonvista™



Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S, Schijlen EG, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C. 2008.

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

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



**NATURE BIOTECHNOLOGY** VOLUME 26 NUMBER 11 NOVEMBER 2008