

NOVÁ SEMENÁRSKO-ŠLACHTITEL'SKÁ METÓDA CRISPR-CAS

Marek JAKUBEC

Pioneer Hi-Bred Slovensko

Summary: CRISPR-Cas as an advanced plant breeding tool represents tremendous promise and potential. It can facilitate precision crop breeding by working with the native characteristics available within the crop, a process often called "genome editing". DuPont Pioneer is a world leader in CRISPR-Cas advanced breeding applications in agriculture and is developing its first CRISPR-Cas enabled commercial product, a next generation of waxy corn, to be the pioneer agricultural product on the market developed with CRISPR-Cas.

Key words: advanced plant breeding, CRISPR-Cas, waxy corn, cut DNA

Súhrn: CRISPR-Cas je nástroj najmodernejšieho šľachtenia rastlín a predstavuje obrovský prísľub a potenciál. Umožňuje precízne šľachtenie plodín tým, že pracuje s vrodennými charakteristikami, ktoré sú k dispozícii v rámci plodiny, čo je netrasgénny (nie GMO) proces. Spoločnosť DuPont Pioneer je svetovým lídrom v uplatňovaní systému CRISPR-Cas v pôdohospodárstve a vyvíja svoj prvý komerčný produkt, novú generáciu waxy kukurice, ktorá bude priekopníckym produktom na trhu s osivami, vyvinutým s CRISPR-Cas.

Kľúčové slová: šľachtění plodín, CRISPR-Cas, waxy kukurice, stříhání DNA

Spolupráca s CIMMYT

Na jeseň roku 2016 spoločnosť Pioneer a CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) uzavreli zmluvu o spoločnom vývoji lepších plodín s použitím úpravy genómu technológiou CRISPR-Cas na získanie vlastností, ktoré riešia potreby pestovateľov po celom svete. Prvý projekt nasadí nástroj CRISPR-Cas na riešenie nekrotického ochorenia kukurice v Subsaharskej Afrike. Toto ochorenie bolo prvýkrát spozorované v Keni v roku 2011 a do piatich rokov sa rozšírilo do susedných krajín a zmenšilo produkciu priemerne o 3 percentá v suchých oblastiach a o 32 percent vo vlhších prostrediach, pričom na niektorých farmách boli zaznamenané až 90-percentné straty na výnosoch zrna. Nekróza kukurice postihuje v Keni takmer štvrtinu objemu produkcie kukurice, pričom ročné straty predstavujú približne 52 miliónov dolárov.

CRISPR-Cas má v pôdohospodárstve početné možnosti uplatnenia, vrátane zlepšenia úrod, odolnosti voči ochoreniam, tolerancie k suchu, ako aj výkonových parametrov.



Spoločnosť Pioneer je už celé svoje deväťdesiatročné pôsobenie lídrom zvyšovania produktivity v pôdohospodárstve prostredníctvom zlepšovania vlastností plodín. Spoločnosť Hi-Bred

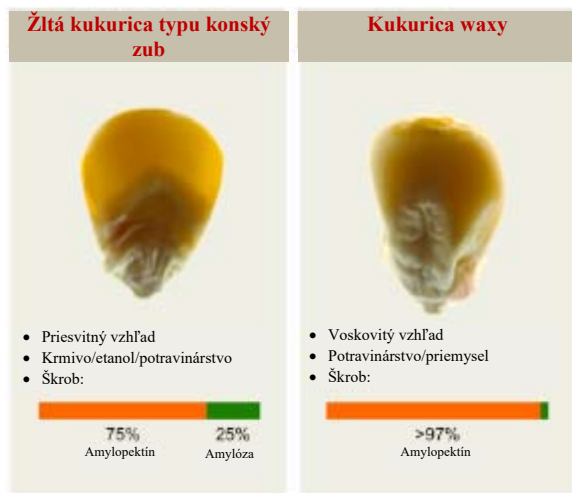
Corn Company od svojho založenia v roku 1926 stála v popredí revolúcie v oblasti šľachtenia kukurice pomocou hybridizácie s cieľom dramatického zvýšenia jej úrod.

Pokrok na poli úpravy genómu v súčasnosti prináša tretiu revolúciu o oblasti zdokonaľovania plodín, ktorú možno využívať popri jestvujúcich technológiách. Úprava, editácia genómu je proces vykonávania cieľných a presných zmien v reťazcoch DNA, skladajúcich sa zo sekvencií štyroch nukleových báz (cytozín, guanín, adenín a tymín), ktoré tvoria gény a ďalšie genómové prvky určujúce vlastnosti rastlín a rozmanitosť. Aj keď samotná implementácia CRISPR-Cas je zložitejšia, z koncepčného hľadiska ide proces podobný úprave textového dokumentu v programe na editáciu textu. V tomto podobenstve je nástroj CRISPR-Cas akoby kurzor, ktorým možno ukázať na požadované miesto v rámci textu. Vďaka umiestneniu kurzora môže používateľ vymazať, zmeniť alebo vložiť písmená či slová na danom mieste a tým vylepšiť text. Tým istým spôsobom je možné namieriť systém CRISPR-Cas na genetické sekvencie rastliny a cielene ich upravovať tak, aby sa zaistili požadované vlastnosti. Predpokladá sa, že táto prevratná technológia pomôže vedcom vyvinúť inovatívne a trvalo udržateľné riešenia pre pestovateľov podobné tým, ktoré sú realizované prostredníctvom tradičných šľachtiteľských postupov, len s vyššou kvalitou, presnosťou a časovo efektívnejším vývojom.

Veľká časť rozruchu, ktorý vyvolala možnosť úpravy genómu, sa sústredila na systém CRISPR-Cas, ktorý si vedci rýchlo osvojili vďaka výhodám oproti iným nástrojom na úpravu genómu, a to z hľadiska kvality, účinnosti a technickej flexibility. CRISPR-Cas má mnohé potenciálne možnosti uplatnenia aj mimo pôdohospodárstva a za ostatných pár rokov si vďaka explózii výskumu v tejto oblasti získal pozornosť hlavných médií. Spoločnosť Pioneer je v agropriemysle lídrom v oblasti inovácií šľachtenia rastlín pomocou CRISPR-Cas a oznámila svoje zámery priniesť na trh

do piatich rokov prvý poľnohospodársky produkt vyvinutý pomocou systému CRISPR-Cas, a to po uskutočnení praktických pokusov a posúdení z hľadiska platných predpisov.

Waxy kukurica je obohatená o amylopektín, ktorý jej dáva vlastnosti žiadané v potravinárskom, papierenskom, textilnom priemysle a pri výrobe vlnitej lepenky a lepidiel



Z histórie CRISPR-Cas

Výskumný tím spoločnosti Danisco (akvizícia spoločnosťou DuPont z roku 2011) pod vedením Phillippea Horvatha poskytol prvý biologický dôkaz, že CRISPR-Cas predstavuje imunitný systém proti vírusom u baktérií. Výskum realizovaný týmto tímom preukázal, že kmene baktérií *Streptococcus thermophilus* na výrobu jogurtu, ktoré prežili vírusovú infekciu, mali vo svojich lokusoch CRISPR začlenené sekvencie z genómu vírusu, ktorý ich napadol. Tieto kmene *Streptococcus thermophilus* sa potom stali rezistentnými voči následnej infekcii daným vírusom.

Prostredníctvom týchto objavov boli charakterizované tri komponenty tohto systému ako potrebné a postačujúce na rozpoznanie a strihanie DNA, molekuly, ktorá tvorí genómy a kóduje inštrukcie pre život.

Zdokonaľovanie plodín pomocou nástroja CRISPR-Cas

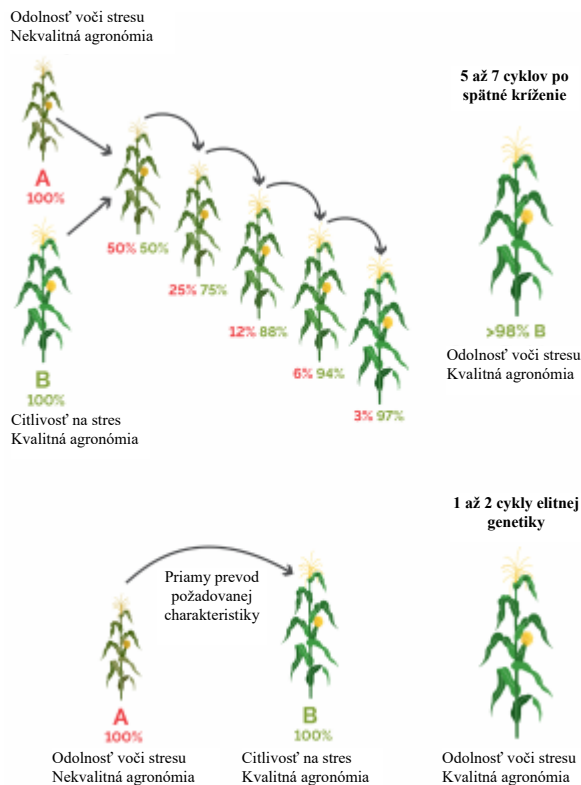
Proteín CRISPR-Cas Cas9 umožňuje editáciu génu tým, že funguje ako presné a programovateľné molekulárne nožnice, ktoré strihajú DNA na konkrétnom mieste. Systém CRISPR-Cas po prestrihnutí cieľovej sekvencie DNA využíva prirodzene sa vyskytujúci bunkový mechanizmus opravy DNA na vymazanie génov, editáciu (úpravu) génov alebo inzerciu (vloženie) génov.

Uplatnenie pokročilého šľachtenia CRISPR-Cas v poľnohospodárstve

Spoločnosť Pioneer zakladá platformu inovatívneho šľachtenia CRISPR-Cas na vývoj semenárskych produktov s cieľom dosiahnuť vyššiu odolnosť voči faktorom prostredia, produktivitu a trvalú udržateľnosť. CRISPR-Cas má v poľnohospodárstve početné možnosti uplatnenia, vrátane vyšších výnosov, odolnosti voči ochoreniam, tolerancie k suchu, ako aj vylepšení prospešných pre koncového používateľa, ako sú výkonové parametre a nutričný obsah.

V nedávno publikovanej výskumnej práci vedci zo spoločnosti Pioneer opisujú prvú aplikáciu CRISPR-Cas na zdokonalenie vlastnej schopnosti rastliny kukurice odolávať stresu zo sucha. Metóda CRISPR-Cas slúžila na zacielenie sa na gén identifikovaný kvôli jeho prirodzene danej schopnosti podporovať toleranciu k suchu. Praktické pokusy s hybridmi kukurice ukázali priemerný nárast výnosov zrna o 313 kg/ha pri strese z nedostatku vlhky počas kvitnutia a nulový pokles výnosov pri optimálnych podmienkach dostupnosti vlhky.

Porovnanie tradičnej introgresie s asistovaným šľachtením. Tradičná introgresia vyžaduje až sedem generácií spätného kríženia, pričom so sebou stále prenáša neelitnú genetickú výbavu. Asistované šľachtenie vyžaduje len jeden až dva reprodukčné cykly a obsahuje len elitnú genetickú výbavu.



Vylepšené hybridy voskovej - waxy kukurice

Na jar roku 2016 spoločnosť Pioneer ohlásila svoj prvý komerčný pôdohospodársky produkt vyvinutý s uplatnením pokročilej šľachtiteľskej technológie CRISPR-Cas – novú generáciu waxy hybridov kukurice. Predpokladá sa, že tieto hybridy budú dostupné pre pestovateľov v USA do piatich rokov po uskutočnení praktických pokusov a posúdení z hľadiska platných predpisov.

Zrná waxy kukurice prvýkrát opísané na začiatku 20. storočia obsahujú najmenej 97 % amylopektínového škrobu namiesto bežného obsahu cca 75% v žltej kukurici typu kónský zub. Tieto zrná sa melú na rôzne každodenné spotrebiteľské potravinárske a nepotravinárske účely. V USA sa každoročne dopestuje vyše 200 tisíc hektárov waxy kukurice. Spoločnosť Pioneer je popredným svetovým dodávateľom hybridov waxy kukurice.

Kukurica waxy je ideálnym produktom na realizáciu inovatívneho šľachtenia rastlín technológiou

CRISPR-Cas vzhľadom na problémy a obmedzenia spojené s vývojom waxy hybridov spojené s tradičným šľachtením. Súčasná waxy hybridy obsahujú iba čiastočnú deléciu génu voskovitosti zodpovedného za tvorbu amyulózy v endosperme. Deléciou génu voskovitosti sa naruší tvorba amyulózy tak, že takmer všetok škrob v zrne bude pozostávať z amylopektínu. Spoločnosť Pioneer rutinne šľachtením vytvára z tejto formy narušeného génu voskovitosti nové elitné inbredné línie kukurice, no takýto proces trvá niekoľko rokov a ako batožinu si so sebou nesie neelitnú genetickú výbavu. Waxy hybridy v dôsledku toho prenášajú určitú výnosovú penalizáciu v porovnaní s najnovšími elitnými odrodami. Pri použití pokročilého šľachtenia CRISPR-Cas je možné gén voskovitosti vo väčšine súčasných elitných inbredných línií úplne a priamo vymazať. Takéto priame nasadenie voskovitosti skraca čas potrebný na vytvorenie waxy hybridov a očakáva sa u neho eliminácia ujmy na výnosoch, spojenej s introgresiou charakteristiky prostredníctvom tradičného šľachtenia.

Kontaktná osoba

Ing. Marek Jakubec, email: marek.jakubec@pioneer.com, Pioneer Hi-Bred Slovensko spol. s r.o., Mlynská 4629/2A , 929 01, Dunajská Streda, Slovensko