

Nieuwe Veredelingsstechnieken NPBTs

Voorbeelden van perspectievolle toepassingen

Clemens van de Wiel, Jan Schaart, Bert Lotz



Nieuwe genetische technieken

Nieuwe technieken voor precieze en snellere veredeling

- Ergens in veredelingsprogramma zit een stap met genetische modificatie, maar de uiteindelijke plant bevat meestal geen genen buiten de mogelijkheden van gangbare kruisingen

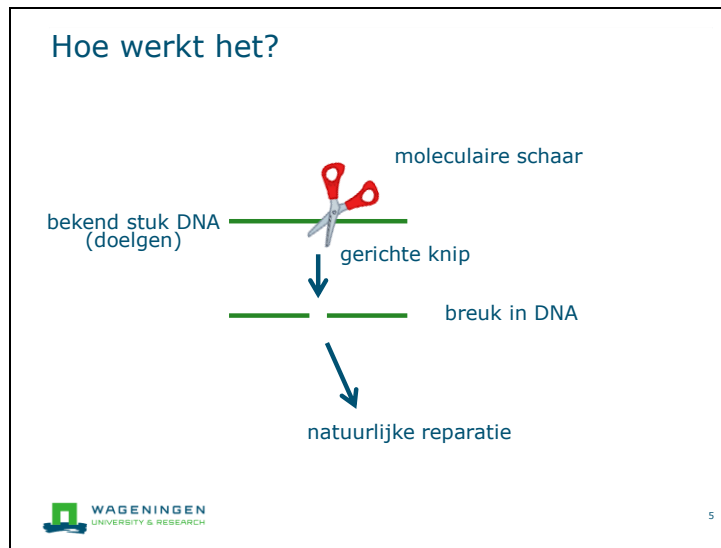


Nieuwe genetische technieken

- Gerichte mutagenese ("genoom (gen) editen", bijv. CRISPR-Cas)
- Cisgenese (genetische modificatie met soorteigen genen)
- Vervroegde bloei (snellere kruisingen via een GM lijn)

Gerichte mutagenese (genoom editen)

- Op bekende plek in het genoom verandering aanbrengen
- Veranderingen: twee mogelijkheden
 - Weghalen van klein stukje DNA.
Doel: werking van bestaande genen wijzigen.
Meestal uitzetten van gen.
 - Uitwisselen van bestaand DNA met vervangend stuk DNA, bv superieure variant van een gen.



Moleculaire schaar



- DNA-knippend enzym (nuclease) dat heel gericht DNA doormidden knipt
 - Specifiek stuk DNA herkennend

- Enkele minder efficiënte voorlopers maar sinds ~2012 veelbelovende CRISPR-Cas

CRISPR-Cas

- Zeer eenvoudig ontwerp, gebruikt gids RNAs (sgRNA) om specifieke plek in het DNA van de plant te herkennen
- Makkelijk te produceren
- Goedkoop
- Werkt effectief en efficiënt

CRISPR-Cas wordt de plantencel ingebracht via GM (transformatie); in dat geval moet na mutatieproces het transgen weer uitgekruist worden voor het uiteindelijke plantproduct. (Alternatieven zijn tijdelijke expressie vanaf een vector zoals een plasmide of het rechtstreeks inbrengen van RNA en eiwit complex. In dat geval hoeft er geen transgen weg gekruist te worden.)

Gerichte mutagenese

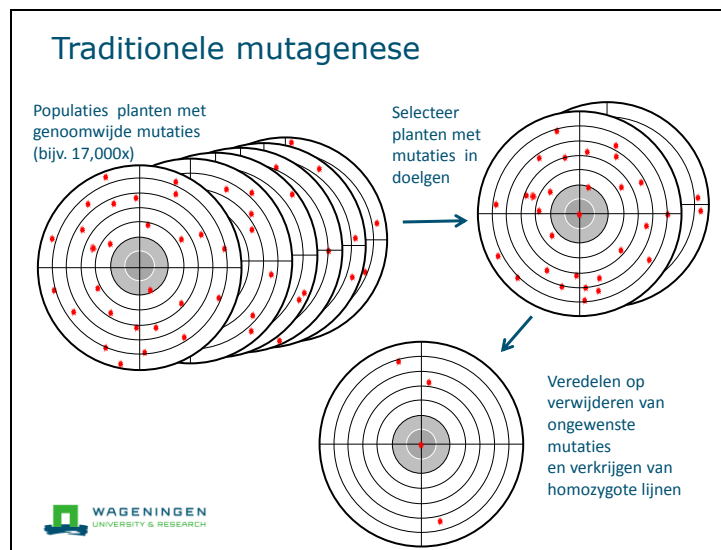


Waarvoor mutagenese?

- Creëren van nieuwe genetische variatie om nieuwe eigenschappen in een gewas te ontwikkelen

- Mutaties zijn niet nieuw:
 - Spontane mutaties: continue bron van natuurlijke genetische variatie
 - Traditionele mutagenese: induceren van mutaties door straling of chemische middelen

Mutaties niet nieuw maar degene die een gewenste eigenschap opleveren, zijn niet altijd eenvoudig te vinden in een gewas of in wilde soorten. Al vroeg in de vorige eeuw realiseerde men zich dat sterke stralingssoorten een beschadigend effect op het erfelijk materiaal hadden en dat dat gebruikt kon worden in de veredeling.



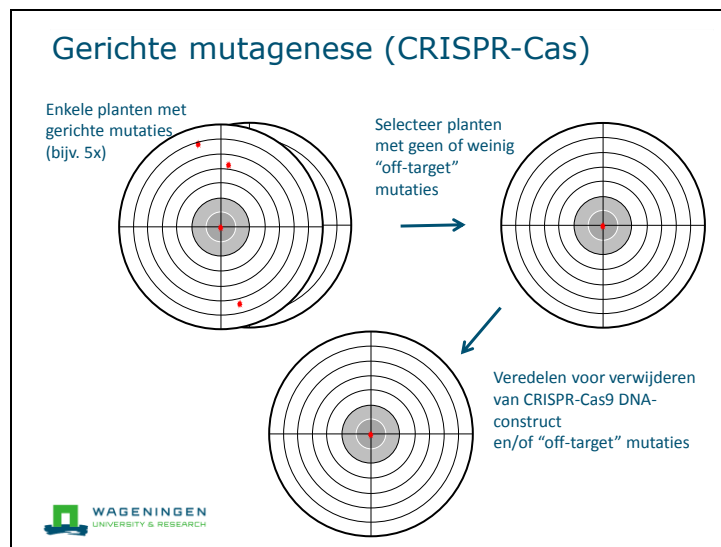
Vergelijking van DNA met schietschijf, in dit geval bestookt met schot hagel: het DNA wordt op allerlei willekeurige plekken geraakt en de gewenste verandering (die “in de roos”) moet eruit geselecteerd worden. Daarna moeten de ongewenste willekeurige veranderingen eruit gefilterd worden, bijv. met kruisingen.

Mutatie ongericht:

Veel verschillende mutaties nodig om gewenste mutatie te vinden

Mutatie frequentie: 1:50.000-500.000 (poly/di-ploide)

Grote populatie gemutageniseerde planten nodig (5.000-10.000)



Vergelijking van DNA met schietschijf, in dit geval beschoten met een enkele kogel: de precisie van CRISPR-Cas maakt dat het DNA in principe meteen "in de roos" geraakt wordt. Hoogstens zijn er enkele zogenaamde "off-target" effecten, d.w.z. andere plekken in het DNA die geraakt worden, bijv. doordat ze op de gewenste plek lijken qua DNA volgorde. Deze kunnen net als de ongewenste willekeurige veranderingen bij klassieke mutagenese eruit gefilterd worden, bijv. met kruisingen. Sowieso moet het CRISPR-Cas construct er weer uitgekruist worden voor het uiteindelijke plantproduct.

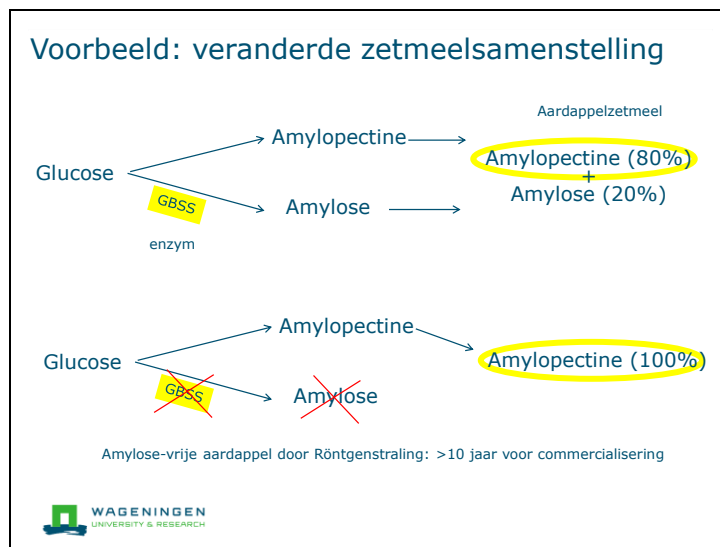
Ongericht, na selectie van gewenste mutatie nog meerdere kruisingsstappen nodig:

Mutatie vaak pas effectief in homozygote staat (4 allelen in tetraploiden, zoals aardappel)

Verwijderen ongewenste mutaties

(840Mb/50Kb~17.000 mutaties/haploide aardappelgenoom)

Inkruisen in elite rassen



Amylopectine (vertakt zetmeel) vertegenwoordigt een hoge waarde voor gebruik als bindmiddel (verdikkingsmiddel) of kleefstof (lagere neiging tot opstijven). Een aardappel met alleen amylopectine bespaart de verwerkingsindustrie een duur scheidingsproces, waarbij de nodige chemicaliën worden ingezet. GBSS is enzym dat zorgt voor de productie van amylose; door dit enzym uit te schakelen via mutatie blijft alleen amylopectine-productie over.

Voorbeeld van traditionele mutagenese in aardappel

- Opwekken mutaties in weefselkweek door Röntgenbestraling
- 12.000 mini-aardappelknolletjes uit weefselkweek getest
- Mutatie in amylose-producerend gen (*gbss*)
- Terugkruisen naar aardappelplant met optimale combinatie van gewenste eigenschappen

Hovenkamp-Hermelink et al. (1987) TAG 75,217

Het uitschakelen van een gen geeft een recessieve eigenschap. Wanneer één allel gemuteerd is (heterozygoot), kan het andere allel de amylose-productie overeind houden. In een tetraploïde plant zoals aardappel wordt het nog veel moeilijker. Vandaar complexe *in vitro* methode: mutatie-inductie in weefselkweek door Röntgenbestraling van monoploïden (helpt van normale chromosomenaantal (= 2x) door antherencultuur of haploïde-inducerende bestuiver)

Na selectie voor mutatie in zetmeel-synthase gen (*gbss*): genoomverdubbeling (terug naar normale 4x) door scheutvorming op explantaten, kruisingsveredeling

Dat kan nu makkelijker met CRISPR-Cas

- Gerichte mutagenese
 - Mutatie gericht in amylose-producerend gen (*gbssI*)
 - Mutatie in alle allelen in één keer mogelijk (4 in aardappel)
 - Kruising niet noodzakelijk (behoud van bestaande optimale ras-eigenschappen)



14

Andersson et al. (2017) *Plant Cell Rep* 36,117

Mutatie via transiënte expressie van CRISPR-Cas: expressie vanaf plasmide ingebracht in protoplast, plant geregenereerd zonder inbouwen van CRISPR-Cas in plantgenoom.

S-genen (“gevoeligheidsgenen”)

- Ziekte gevoeligheidsgenen (S genen), nieuwe bron van resistentie tegen ziekteverwekkers
- Plantengenen die essentieel zijn voor ziekteverwekker om de plant te kunnen infecteren, worden a.h.w. “gekaapt” door ziekteverwekker
- Uitschakelen S-gen → geen infectie!

Al langer populair in veredeling zijn klassieke R (resistentie) genen. R genen herkennen specifieke ziekteverwekkers en geven dan een sterke reactie (“complete” resistentie). R genen kunnen echter relatief makkelijk doorbroken worden door diezelfde ziekteverwekkers. Zie verder Cisgenese verderop.

S-genen (“gevoeligheidsgenen”)

- Oudste voorbeeld: gerst *mlo* mutanten met resistentie tegen echte meeldauw
- *MLO* resistentie effectief in gerst voor meer dan 30 jaar!
- Andere voorbeelden van *mlo*: tomaat, erwt, druif...
- In hexaploïde (6x) tarwe inmiddels gelijktijdige uitschakeling van zes *mlo* allelen via gen “editen”



S-genen (“gevoeligheidsgenen”)

- Andere S-genen ontdekt in Zandraket, gewassen zoals maïs, gerst, paprika, tomaat, aardappel
- Uitschakeling van S-genen kan nadelige bijeffecten hebben voor de plant
- Uitschakeling van S-genen met meer precisie door CRISPR-Cas kan verbetering geven, bijv. een stuk uitschakelen dat alleen door de ziekteverwekker gebruikt wordt

Cisgenese

- Toevoegen van nieuwe eigenschappen uit kruisbare soorten via genetische modificatie
 - Genen afkomstig uit de soort zelf of kruisbare verwanten
 - Aantrekkelijk voor moeilijk te veredelen gewassen
 - Bijv. aardappel (heterozygoot, 4n) en fruitbomen (lange generatietijd, 5-10 jaar voor eerste bloei)
 - Gewenste eigenschappen van bestaande rassen (bijv. Bintje (aardappel), Elstar (appel)) blijven bewaard

Aardappel en appel sterk heterozygoot, maar vegetatief vermeerderd, dus eigenschappen blijven bewaard. Bijvoorbeeld van belang omdat verwerkende industrie ingesteld is op bepaalde aardappelrassen, waarvan sommige al heel lang bestaan (Bintje). Zodra er echter gekruist gaat worden, vallen de combinaties van eigenschappen uit elkaar en zijn deze heel moeilijk weer terug te winnen. Dat maakt het extra aantrekkelijk om GM te gebruiken voor het introduceren van extra eigenschappen, zoals ziekteresistenties.

Cisgenese

- Toevoegen van nieuwe eigenschappen uit kruisbare soorten via genetische modificatie
 - Vooral resistenties, bijv. *Phytophthora*-resistentie (R) genen uit wilde aardappelsoorten
 - Individuele R genen vaak snel overwonnen door ziekteverwekker
 - Stapelen van genen voor duurzamere resistenties

Meerdere R genen tegelijk veel moeilijker te doorbreken dan een enkel R gen. Voor elk R gen moet in de ziekteverwekker een effectoreiwit aangepast worden.

Cisgenese: *Phytophthora*-resistente aardappel

- Inkruisen van een enkel R gen, *Rpi-blb2*, uit de wilde soort *Solanum bulbocastanum* leidde pas na tegen de vijftig jaar tot nieuwe resistente aardappelrassen
- Complexe kruisingen nodig via verschillende soorten ("brugkruisingen")

Haverkort et al. (2009): Voor het introduceren van één R gen vanuit een wilde soort in aardappel waren jaren van ingewikkelde kruisingen tussen verschillende soorten nodig bij Wageningen University. Vervolgens zijn veredelaars voor de biologische markt bezig geweest totdat na 46 jaar de eerste resistente aardappelrassen Bionica en Toluca op de markt werden gebracht. Langs deze weg is het stapelen van R genen nog weer veel moeilijker en tijdrovender. Kennis uit het DuRPh programma (zie hieronder) dat werkte aan het "proof of principle" van een cisgene *Phytophthora*-resistente aardappel is ingezet voor het verbeteren van de efficiëntie van het kruisingsprogramma voor de biologische markt in BioImpuls.

Cisgenese: *Phytophthora*-resistente aardappel

- 26 *Rpi* genen in 9 verschillende specificiteitsgroepen geïdentificeerd
- Genen voor stapelen, bijv.:
 - *Rpi-sto1* (uit *S. stoloniferum*)
 - *Rpi-blb3* (uit *S. bulbocastanum*)
 - *Rpi-vnt1.1* (uit *S. venturii*)

Veldproef behandeld met *Phytophthora infestans*



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

21

Veldproef behandeld met *Phytophthora infestans*: aardappelras Bintje volledig afgestorven, enkele wilde soorten blijven het goed doen. Voor het ontwikkelen van het “proof of principle” van een cisgene *Phytophthora*-resistente aardappel is een tienjarig programma, DuRPh, uitgevoerd bij Wageningen University & Research.

Cisgenese: *Phytophthora*-resistente aardappel

- Verschillende combinaties van R genen ("cassetten") maken resistentiemanagement mogelijk:
 - Afwisselen van resistenties aangepast aan in de regio aanwezige *Phytophthora* stammen
 - Monitoren van resistenties in het veld: waar nodig ondersteunen van R genen met fungicide bespuiting

Demonstratieveldproef: cultivar Desiree met diverse aantallen R genen



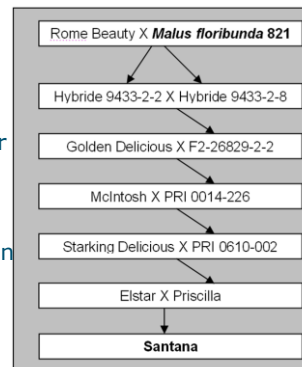
Van voor naar achter: Desiree, Desiree met 1 R gen, 2 R genen, 3 R genen. Links: ondersteuning van resistentie met fungicide bespuiting; rechts: geen bespuiting.

Cisgenese: Schurft in appel

- Appelschurft belangrijke ziekte in appel, veroorzaakt door een schimmel (*Venturia inaequalis*)
- Normale teelt: 20-30 bespuitingen per seizoen

Klassiek inkruisen van Vf-gen in appel

- Klassieke veredeling is zeer tijdrovend
 - Het duurt een paar jaar voordat een boom uit appelzaad voor het eerst in bloei komt
 - >50 jaar voor veredelen commerciële cultivar met Vf-resistentiegen uit sierappel (*Malus floribunda*)






Cisgenese: Schurft in appel

- Schurftresistentiegenen uit wilde appelsoorten
 - Vf, uit sierappel *Malus floribunda*,
 - Vr2, uit *Malus pumila*,
 - V25, uit *Malus pumila*


Cisgenese: Schurft in appel

- Cisgene bomen in proefboomgaard in NL



Gala (tree 21)
cisgenic Gala with Vf gene (tree 67)

Gala Gala + Vf, cisgenic



Gala: schurft vlekken op bladeren; Gala met Vf gen schone bladeren

Vervroegde bloei

- Fruitboomveredeling langdurig vanwege lange generatietijd (3-10 jaar)
- Genetische modificatie met een bloeigen uit berk resulteerde in transgene appellijnen die bloeiden in eerste jaar
- Maakt snel kruisingsprogramma mogelijk om resistentiegenen te stapelen

Vervroegde bloei: Appel "speed breeding"

- Stapelen van genen:
 - 1^e gen. kruising met *Malus fusca* (bacterievuurresistentie)
 - 2^e gen. kruising met 'Regina' (schurftresistentie + echte meeldauw + extra bacterievuurresistentie)
 - 3^e gen. kruising met Golden Delicious
- Testen op resistentiegenen met DNA markers
- Uiteindelijke selectie op planten zonder het transgen

Flachowsky et al., 2011 *New Phytol* 192:364

Zelfs los van GM regelgeving, zou voor het uiteindelijke ras het transgen verwijderd moeten worden, omdat de boom zich anders niet normaal zou ontwikkelen door het vroege in bloei komen.

Vervroegde bloei: andere voorbeelden

- FasTrack in pruim: bloeigen uit populier
- Andere houtige gewassen: citrus, eucalyptus
- Ook overblijvende kruiden: *Gentiana triflora*, lisianthus

Cisgenese en producten van vervroegde bloei in GM regelgeving

- Cisgenese maakt gebruik van GM maar introduceert dezelfde genen als in klassieke kruisingsveredeling
 - Aangepaste regelgeving mogelijk?

- Producten van vervroegde bloei niet te onderscheiden van kruisingen zonder gebruik van GM lijnen met vervroegde bloei
 - GM op basis van de afkomst van de planten (proces)?

CRISPR-Cas-mutanten en GM regelgeving

- CRISPR-Cas-mutanten niet te onderscheiden van natuurlijke mutanten of van mutanten gemaakt met traditionele methoden
- Traditionele mutanten specifiek vrijgesteld van GM regelgeving
- Vele gewassen hebben mutanten in het rassensortiment (tarwe, rijst, appels, siergewassen)
- EU bereikt geen duidelijkheid tot nu toe; Europese Hof doet waarschijnlijk in 2018 uitspraak op Frans verzoek
- In VS zijn CRISPR-Cas planten vrijgegeven door USDA-APHIS (maïs, champignon)

Conclusie

- Nieuwe veredelingstechnieken kunnen traditionele veredeling ondersteunen:
 - Versneld eigenschappen toevoegen aan bestaande rassen
 - Toevoegen van nieuwe genetische variatie voor nieuwe eigenschappen

- Belangrijke vraagstukken:
 - Regelgeving in Europa
 - Maatschappelijke acceptatie