

Chancen und Risiken neuer Züchtungstechniken in der Pflanzenzüchtung

Christian Jung



**Plant Breeding
Institute**



Jede züchterische Tätigkeit ist auf breite genetische Variation angewiesen

Natürliche genetische Variation (in situ und ex situ Genbanken)

- Innerhalb der Kulturart
- In nahe verwandten Wildarten
- In weiter entfernten Arten
- Sämtliche Lebewesen plus Viren

Induzierte genetische Variation

- Mutationsauslösung
 - Nur sinnvoll, wenn der Phänotyp durch ein einzelnes Gen oder sehr wenige Gene bedingt wird
 - Zufällige Mutationen durch chemische Mutagenese oder Bestrahlung (TILLING)
Problem: Paraloge Sequenzen in Polyploiden
 - Ortsspezifische Mutationen (genome editing)
- Weite Kreuzungen
- Zellfusion
- Transformation

Die klassische Definition für Mutationen gilt nicht mehr

Mutationen sind spontan und ungerichtet.

Pressemeldung Sept. 2016: “... CRISPR/Cas use has recently exploded. In 2012, just 126 publications indexed by Pubmed mentioned the technology; nearly 10 times as many came out in the first six months of 2016.”*

* <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/47156/title/Gene-Editing--From-Roots-to-Riches/>

Targeted gene inactivation/modification

RTDS : Rapid Trait Development System (Oligonucleotide-directed mutagenesis)

ZFN : Zinc Finger Nucleases

TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nucleases

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Historical methods:

- Inactivation by Homologous Recombination → low efficiency, laborious screening
- RNAi → genetically modified plants, inactivation not complete, off-target effects

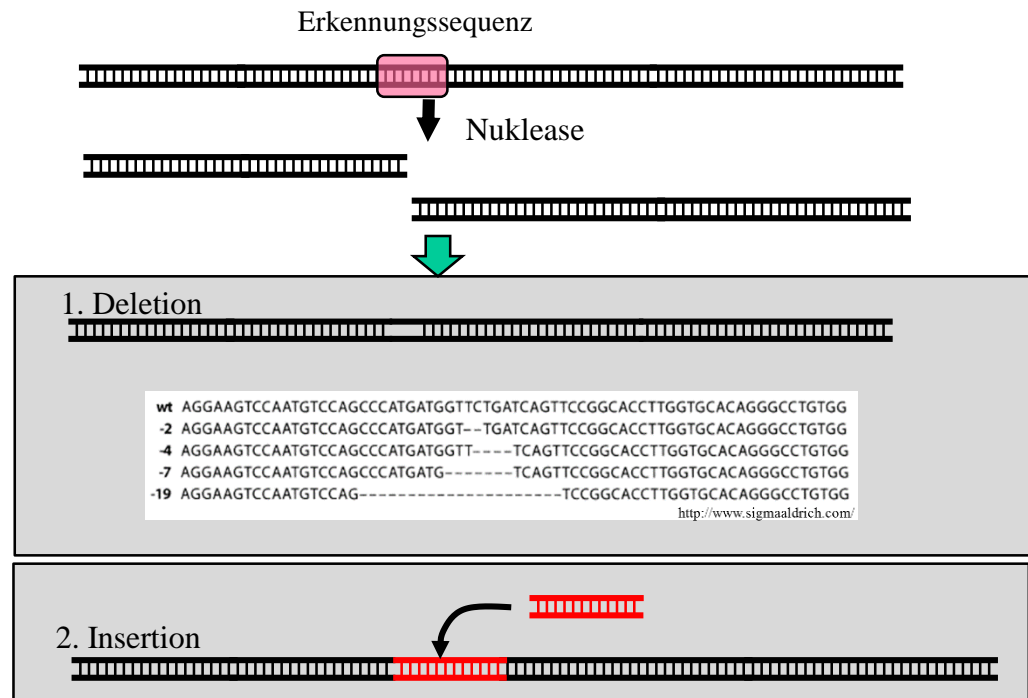
In a broad sense: **TILLING** → EMS mutagenesis, effective, but time-consuming and labor-intensive

Gezielte DNA Modifikationen durch *genome editing*

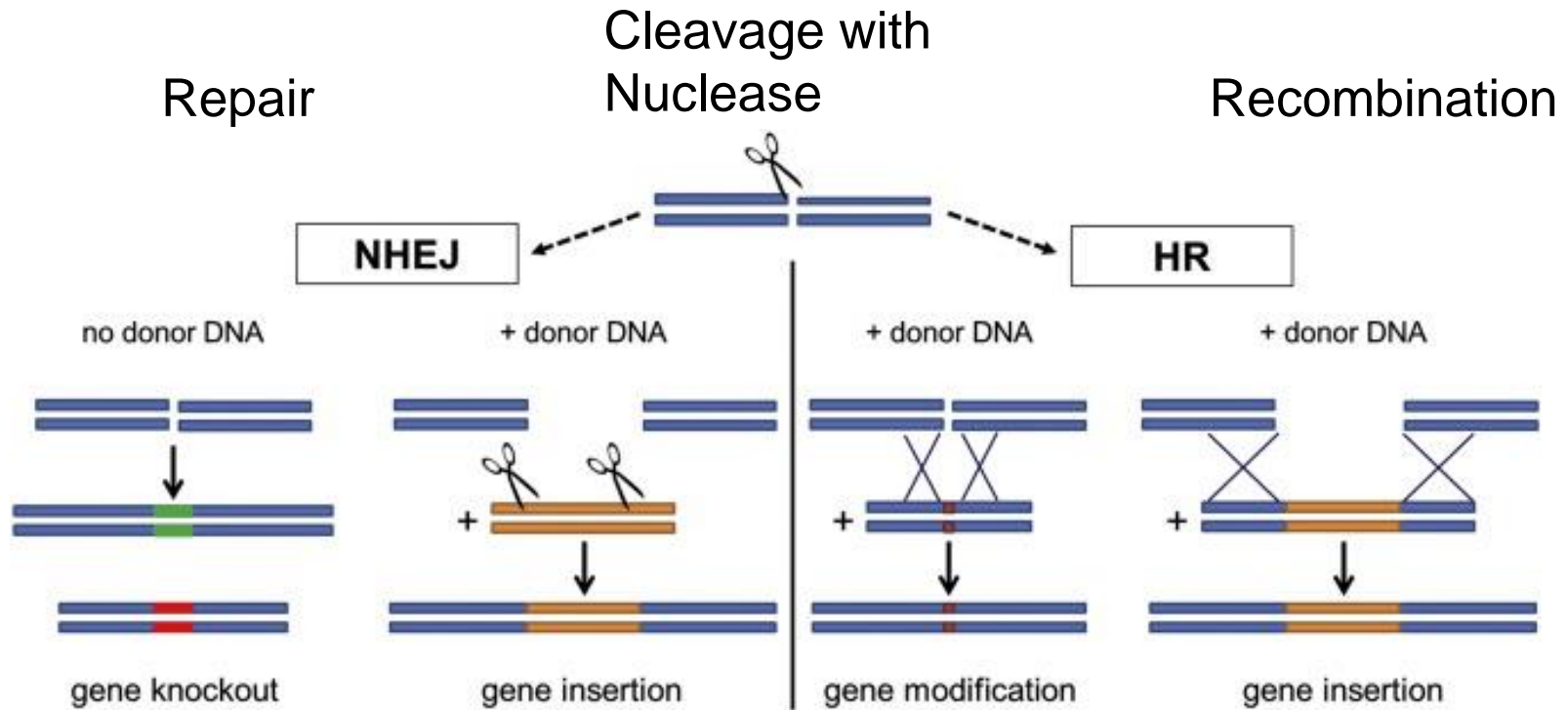
Einzelnukleotid-Mutation (Punktmutation):

- Betrifft ein Gen, welches Bestandteil des Genoms ist oder
- gleichzeitig mehrere Gene, wenn diese über ein hohes Maß an Sequenzhomologie verfügen (Genfamilien)
- ein bis wenige Nukleotide, 66% *frame shift* Mutationen im ORF

Einfügen von Insertionen in einem bestimmten Sequenzabschnitt durch homologe Rekombination (*gene replacement*)



Mechanismen zur Reparatur von induzierten DNA Doppelstrangbrüchen



NHEJ: Nonhomologous End Joining → Mutation

HR: Homologous recombination → targeted sequence integration

Das CRISPR/Cas System zur präzisen Veränderung von Sequenzen in komplexen Genomen

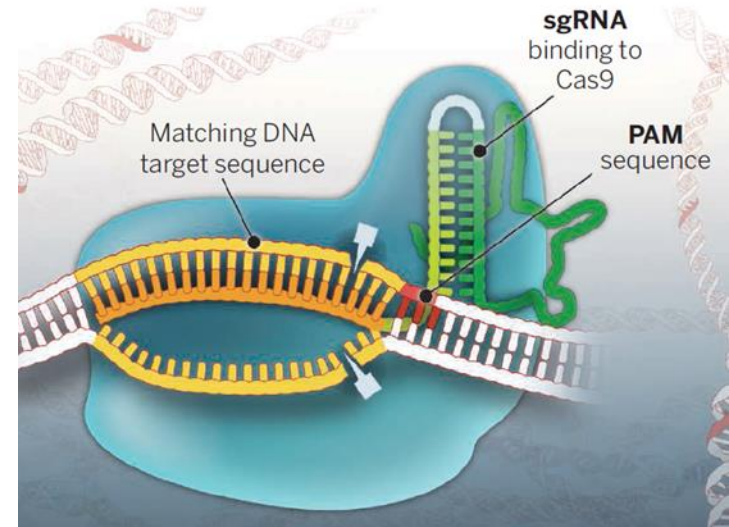
Type II CRISPR-Cas Systeme schützen Bakterien gegen fremde DNA (Phagen, Plasmide)

Cas9: CRISPR-assoziierte Endonuklease, erzeugt Doppelstrangbruch mit 2 katalytischen Zentren

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat

Gentechnisch erzeugte einzelsträngige „single guide RNA“ (sgRNA) bindet gezielt an einer Stelle im Genom

Ergebnis: Ortsspezifischer Doppelstrangbruch (Mutagenese, absichtliche Veränderungen der DNA-Sequenz eines Gens) in beliebigen Organismen (Pflanzen, Tiere, Mensch, Mikroorganismen)



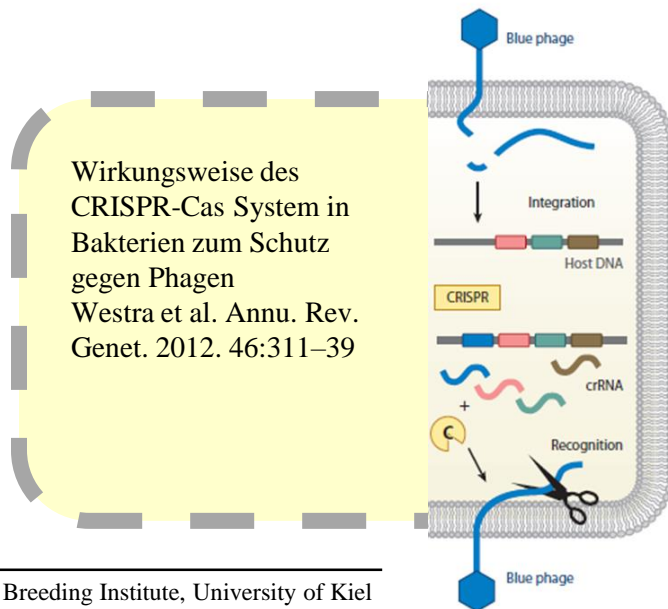
Cas9 (blau) mit 2 katalytischen Zentren (Spitzen)

Zielsequenz (gelb)

20 Nukleotide lange homologe Sequenz (orange) der single guide RNA (sgRNA)

PAM: protospacer adjacent motif, NGG Consensus Sequenz nahe dem 3'Ende der 20 Bp Zielsequenz:

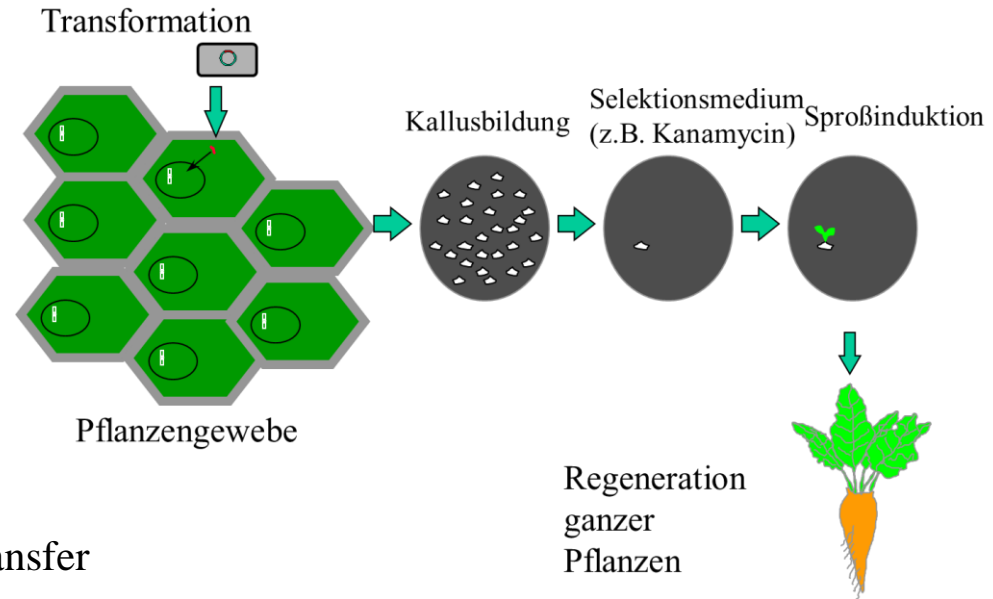
sgRNA+PAM: 5' -N20-NGG-3'



Wirkungsweise des CRISPR-Cas System in Bakterien zum Schutz gegen Phagen
Westra et al. Annu. Rev. Genet. 2012. 46:311–39

Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346 (6213). doi:10.1126/science.1258096

Die Erzeugung von CRISPR/Cas veränderten Pflanzen



Transfer von sgRNA und CAS9 in Pflanzenzellen

- *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Gentransfer
- particle gun
- Agro-Infiltration der sgRNA in Cas9 exprimierende Pflanzen (nur für transiente Versuche)
- DNA-freie Überführung von sgRNA-Cas9-Komplexen in Protoplasten

Selektion der gentechnisch veränderten Zellen

- Selektierbare Marker (Herbizidtoleranz, Antibiotikaresistenz, ...)
- Reportergene (GFP, ...)
- Cas9-Reportergen-Fusion, zur Selektion von Zellen, die Cas9 exprimieren

Anzucht der Pflanzen und Erzeugung von Saatgut (Problem: Chimäre Pflanzen)

Expression des Cas9-Gens

- Konstitutiv
- gewebe- oder stadienspezifisch durch Vorschalten entsprechenden Promotoren: S-Phase-spezifisch, Embryo-spezifisch, Blütenmeristeme, Eizellen, Gametophyten, Zygoten

Charakterisierung der Mutanten und Selektion von nicht-transgenen Pflanzen

Mutationshäufigkeit (30-100%)

Selektion innerhalb der T2-Generation

- am Zielgen mutagen verändert
- Keine Fremdgene (z.B. T-DNA) = Cas9-free
- Selektion in spaltender Nachkommenschaft
(Erwartungswert: 25%)

Suche nach möglichen Mutationen in nicht-Zielgenen (off-target effects)

Phänotypische Charakterisierung

Anwendungen in Pflanzenzüchtung und - Produktion

Gene transkriptionell verändern oder ausschalten

Sequenzen ersetzen, neue Gene einführen

- Promotor Region
- Gesamtes Gen
- Etablierung des CRISPR/Cas9 Verteidigungssystems in Pflanzen: Resistenz gegen Pflanzenviren

Chromosomenbrüche induzieren

Epigenetische Veränderungen

Genetic drift („gene drive“): Verdrängung von Allelen in a natürlichen Populationen von Schaderregern

Genome editing with crops: Gene knockout (October 2016)

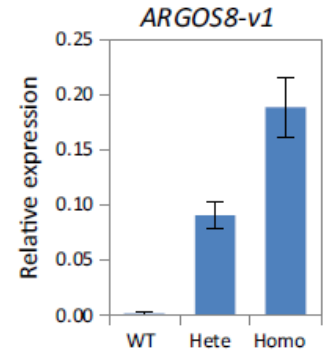
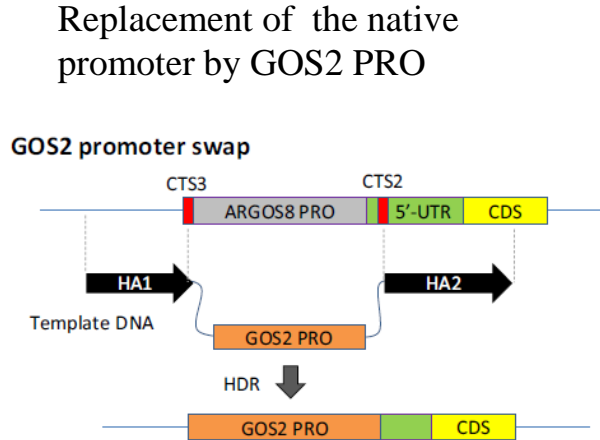
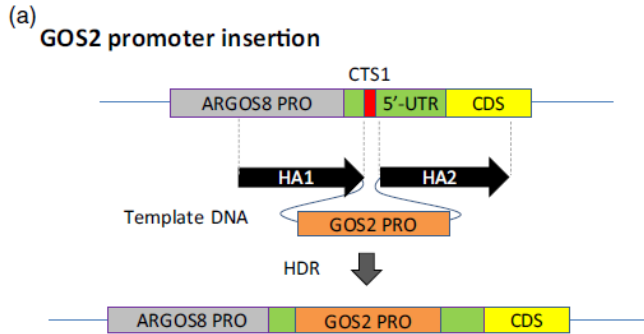
Crop	Target gene	Function	technique	References
Rice	CAO1, LAZY1	Synthesis of chlorophyll b and regulate shoot gravitropism, control tiller angle	CRISPR/Cas9	Miao et al. 2013
	OsPDS, OsBADH2	Biosynthesis of chlorophyll and aroma	CRISPR/Cas9	Shan et al. 2013
	OsSWEET	Plant disease susceptibility genes	CRISPR/Cas9	Jiang et al. 2013
	OsWaxy	Amylose synthesis	CRISPR/Cas9	Ma et al. 2015b
	OsDERF1, OsEPSPS, OsPDS, OsPMS3, OsMSH1, OsMYB1, OsROC5, OsSPP, OsYSA	-	CRISPR/Cas9	Zhang et al. 2014
	OsMPK5	mitogen-activated protein kinase	CRISPR/Cas9	Xie et al. 2013
	OsMPKs	mitogen-activated protein kinase	CRISPR/Cas9	Xie et al. 2013
	OsBEL	Herbicide resistance	CRISPR/Cas9	Xu et al. 2014
	CSA	Male sterility	CRISPR/Cas9	Li et al. 2016
	OsERF922	Blast resistance	CRISPR/Cas9	Wang et al. 2016
Tomato	Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1	yield related genes	CRISPR/Cas9	Li et al. 2016
	SIAGO7	Leaf development	CRISPR/Cas9	Brooks et al. 2014
	RIN	Fruit ripening	CRISPR/Cas9	Ito et al. 2015
Wheat	SIPDS, SIPIF4	Biosynthesis of chlorophyll and Auxin biosynthesis	CRISPR/Cas9	Changlian et al. 2016
	TaMLO homologs	powdery mildew resistance	CRISPR/Cas9	Wang et al. 2014
	inox, pds	Inositol oxygenase and phytoene desaturase genes	CRISPR/Cas9	Upadhyay et al. 2013
Barley	HvPM19	ABA-inducible plasma membrane protein	CRISPR/Cas9	Lawrenson et al. 2015
Brassica	BoC. GA4.	Ortholog of Arabidopsis GA4a	CRISPR/Cas9	Lawrenson et al. 2015
Corn	ZmIPK	Antinutritional phytic acid biosynthesis	CRISPR/Cas9	Liang et al. 2014
	LIG1, Ms26, and Ms45	branching, male fertility, and acetolactate synthase	CRISPR/Cas9	Svitashev et al. 2015
	ARGOS8	Drought tolerance	CRISPR/Cas9	Shi et al. 2016
Poplar	potPDS	Biosynthesis of chlorophyll	CRISPR/Cas9	Fan et al. 2015
	4CL1, 4CL2	Lignin and flavonoid synthesis	CRISPR/Cas9	Zhou et al. 2015
Soybean	GmPDS	Chlorophyll pigment synthesis	CRISPR/Cas9	Du et al. 2016
	Glyma07g14530	glucosyltransferase	CRISPR/Cas9	Jacobs et al. 2015
Orange	CsPDS	Biosynthesis of chlorophyll	CRISPR/Cas9	Jia et al. 2014
Cotton	hppd, epsps	Herbicide resistance	CRISPR/Cas9	D'Halluin et al. 2013
Apple	PDS	Biosynthesis of chlorophyll	CRISPR/Cas9	Nishitani et al. 2016
Potato	StIAA2	petiole hyponasty and shoot morphogenesis	CRISPR/Cas9	Wang et al. 2015
	Vlnv	encodes a protein that breaks down sucrose to glucose and fructose	TALENs	Clasen et al. 2016
Sorghum	-	Proof of concept	CRISPR/Cas9	Jiang et al. 2013
	OsActin1, OsU6	-	CRISPR/Cas9	Jia et al. 2014
Cucumber	eIF4E	virus resistance	CRISPR/Cas9	Chandrasekaran et al. 2016
Petunia	PDS	Biosynthesis of chlorophyll	CRISPR/Cas9	Zhang et al. 2016
Tobacco	NtPDS	Biosynthesis of chlorophyll	CRISPR/Cas9	Gao et al. 2014
	NtPDR6	Plant development	CRISPR/Cas9	Upadhyay et al. 2013
	-	Virus resistance	CRISPR/Cas9	Ali et al. 2016
Sugarcane	caffeic acid O-methyltransferase	cell wall composition for production of bioethanol	TALENs	Jung et al. 2016
Barley	gfp	Proof of concept, haploid barley cells manipulated to produce DH barley	TALENs	Gurushidze et al. 2014
Tomato	PROCERA	gibberellic acid metabolism	TALENs	Lor et al. 2014
Soybean	FAD2-1A and FAD2-1B	High oleic acid, low linoleic acid	TALENs	Haun et al. 2014
Corn	ZmPDS, ZmIPK1A, ZmIPK, ZmMRP4	Antinutritional phytic acid biosynthesis	TALENs	Liang et al. 2014
Rice	OsBADH2	-	TALENs	Shan et al. 2013
	OsSWEET14	bacterial blight resistance	TALENs	Li et al. 2012

Genome editing with crops: Gene introgression (October 2016)

Crop	Target gene	Function	technique	References
Rice	ALS	Herbicide resistance	CRISPR/Cas9	Endo et al. 2016; Sun et al. 2016
Tomato	ANT1	Anthocyanin biosynthesis	CRISPR/Cas9	Cermak et al. 2015
Corn	ALS1, ALS2, PAT	Herbicide resistance	CRISPR/Cas9	Svitashev et al. 2015
	ARGOS8	Drought tolerance	CRISPR/Cas9	Shi et al. 2016
Soybean	DD43	Hygromycin phosphotransferase	CRISPR/Cas9	Li et al. 2015
	ALS1	Herbicide resistance	CRISPR/Cas9	Li et al. 2015

ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions

Integrating a new promoter (GOS2 PRO) into the upstream region of ARGOS8 via homology-directed DNA repair



Relative expression levels of ARGOS8 in leaves as measured by qRT-PCR.

particle bombardment Cas9, sgRNA, PMI, ODP2 and WUS.

Select T2 plants without random insertions of DNA

Expression

Backcross

F1-Hybrids

Field test

Genomic sequence upstream of the ARGOS8 coding region in three genome-edited variants.

(a) **ARGOS8-v1**

```

GOS2 5'-UTR
-----CTCAA CAACCAAGTT TCCATGAGCG CTGGCGCGCG GGTCCGCGG GCGGGTCTGT GAGGGCAAAT TTATATAGGT CTAGTGGGTA CCCGGCTACG
GATAGATATG ATGCTGCAC TGCACATTGGC TATATCTGAG GCTCC TGCCG GCGCCTTGGC CAGGTGTCTG TCATGCGGGCGATGCCGAGGAAGAGGA--
M R A M P Q E E E
    
```

ARGOS8-v2

```

GOS2 5'-UTR
-----CTCAA CAACCAAGTT TCCATGGTAC GGATAGATAT GATGCTGCAC TGACATTGG CTATATCTGA GGCTCCTGCG CGCGCCTTGG CCAGGTGTCT
GTCATGCGGG CGATGCCGCA GGAAGAGGAA--
M R A M P Q E E E
    
```

ARGOS8-v3

```

CTS3 CTS1
---AAATAAA GAGTTACTTC TCTAAGCACT CGCTGGCGCG CGGTCCGCG GGGCGGTCT GTGAGGGCAA ATTTATATAG GTCTAGTGGG TACCGGCTCA
CGGATAGATA TGATGCTGCA CTGCACATTG GCTATATCTG AGGCTCCTGC GCGCGCCTTG GCCAGGTGTG TGTCATGCGG GCGATGCCG AGGAAGAG--
M R A M P Q E E E
    
```

Targeted inactivation of three homoeoalleles of powdery mildew susceptibility genes in wheat by genome editing

three homoeoalleles of the *MILDEW-RESISTANCE LOCUS* (*TaMLO*)

genetic redundancy has prevented the selection of resistant plants from natural populations

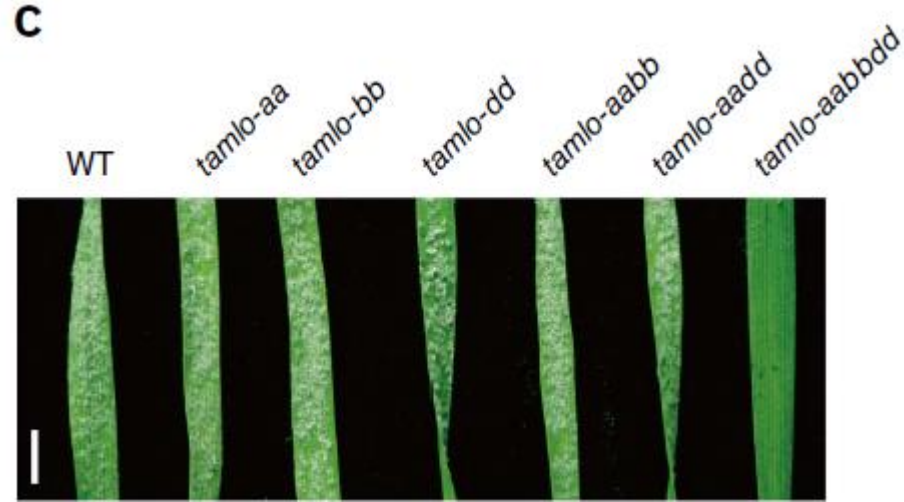
TALEN-and CRISPR-Cas9 induced mutations of all three *TaMLO* homoeologs in the same plant

induced mutation of all three *TaMLO* homoeologs in the same plant confers heritable broad-spectrum resistance to powdery mildew

- Infection rates significantly reduced
- Race non-specific resistance

```

T0-1 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacg.....TATGCATCTCCCA -19
T0-2 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcagga...aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3
T0-3 A1: .....caatctcCGGGATATGCATCTCCCA -32
      B1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagga/ccccatctcCGGGATATGCATCTCCGA +141
      D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagga...../GGATATGCATCTCCGA -11/+81
T0-4 D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagg....atctcCGGGATATGCATCTCCGA -5
T0-5 D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcag....aatctcCGGGATATGCATCTCCGA -5
T0-6 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcaegca....aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -6
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcaegcagga...aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcaegcagga....atctcCGGGATATGCATCTCCCA -4
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcaegcaggac..aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -2
T0-7 D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac..aatctcCGGGATATGCATCTCCGA -2
T0-8 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcaegcag.....tctcCGGGATATGCATCTCCCA -7
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcaegcagg...caatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3
      B1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagg../ccccatctcCGGGATATGCATCTCCGA -2/+113
T0-9 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcaeg.....tctcCGGGATATGCATCTCCCA -10
      D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac....ctcCGGGATATGCATCTCCGA -5
      TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac...tctcCGGGATATGCATCTCCGA -4
      TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac..aatctcCGGGATATGCATCTCCGA -2
T0-10 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcaeg.....ctcCGGGATATGCATCTCCCA -11
T0-11 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcaeg.../gacccaatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3/+61
      D1: TCGCTGCTGCTC.....CATCTCCGA -29
T0-12 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcaegc.....atctcCGGGATATGCATCTCCCA -8
T0-13 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcaegcagga....ctcCGGGATATGCATCTCCCA -6
T0-14 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcaegc.....aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -7
T0-15 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcaegca.....cCGGGATATGCATCTCCCA -11
    
```



Infection phenotypes of leaves of WT and *mlo* mutants 7 d after inoculation of detached leaves with *Blumeria graminis t.*

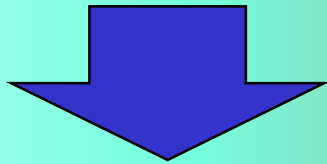
Wang, Y., et al. (2014). "Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew." *Nat Biotech* **32**(9): 947-951.

Methoden zur Veränderung von Genen einer Nutzpflanze und deren rechtliche Bewertung



Ohne gesetzliche Regelungen

- Artbastardierung (künstlich erzeugte Arten)
- Induzierte zufällige Mutagenese



Sehr viele Veränderungen

Genetisch veränderte Pflanze

```

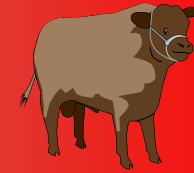
wt AGGAAGTCCAATGTCCAGCCCATGATGGTTCTGATCAGTTCGGCACCTTGGTGACACAGGGCCTGTGG
-2 AGGAAGTCCAATGTCCAGCCCATGATGGT--TGATCAGTTCGGCACCTTGGTGACACAGGGCCTGTGG
-4 AGGAAGTCCAATGTCCAGCCCATGATGGT---TCAGTTCGGCACCTTGGTGACACAGGGCCTGTGG
-7 AGGAAGTCCAATGTCCAGCCCATGATG-----TCAGTTCGGCACCTTGGTGACACAGGGCCTGTGG
-19 AGGAAGTCCAATGTCCAG-----TCCGGCACCTTGGTGACACAGGGCCTGTGG
    
```

Induzierte gezielte Mutagenese (genome editing)



Eine Veränderung

Gentechnisch veränderte Pflanze (de facto)



Gentechnik-Gesetzgebung

- Einschleusen fremder Gene in das Genom
- Gezielte Veränderung endogener Gene durch Gentransfer



Eine Veränderung

Gentechnisch veränderte Pflanze (de facto und de jure)

Vergleich EMS-Mutagenese – gentechnische Veränderung

Jahre:

1

2

3

4

5

6

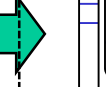
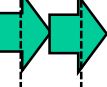
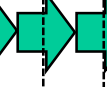
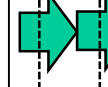
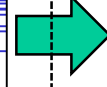
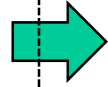
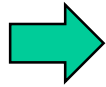
7

8

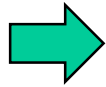
9

Zufällige Mutationsauslösung

EMS



Gentechnik incl. Genome editing



Gentechnik: DNA-Modifikation ist nachweisbar

Genome editing: DNA-Modifikation ist nicht nachweisbar

Mutationen in beliebigen Genen

Mutation im Zielgen

Wie häufig verändert sich das genetische Material von Nutzpflanzen?

Häufigkeit von Spontanmutationen

0 bis 49 Mutationen/100.000 Gameten¹

Häufigkeit von künstlich ausgelösten Mutationen

Mutationshäufigkeit in einem beliebigen Sequenzabschnitt nach EMS Mutagenese²: **0,6 – 50 Mutationen/kb/1000 Pflanzen**



Standardgenom (1000 Mbp) mit durchschnittlicher EMS Mutationshäufigkeit (0,005 Mutationen/kb/Pflanze): **100.000 Mutationen/Pflanze³**

Gentechnik

Ein bis wenige Gene verändert

Die rechtliche Klassifizierung einer durch genome editing erzeugten *single point* Mutation als GvO wäre absurd, denn die Veränderung ist von spontanen Mutationen niemals unterscheidbar.

¹ Mais

² verschiedene TILLING Projekte

³ Raps (Harloff et al. 2012)



Janina Braatz

Erzeugung von Ölrapss mit erhöhter Schotenplatzfestigkeit

Problem:

Empfindliche Rapsschoten werden stark beansprucht, z.B. durch Wind, Niederschlag und beim Erntevorgang.

→ Schoten platzen →

Bis zu 25% Vorernteverluste
Durchwuchsraps in Folgesaison

Ziel des Projekts:

Steigerung der Platzfestigkeit von Rapsschoten durch Selektion geeigneter Mutationen (Gen-Knockdown)

Methoden:

1. Ungerichtete chemische Mutagenese mit anschließendem Mutantenscreening (TILLING)
2. Gezielte Mutagenese (CRISPR/Cas9)

Evaluation der Mutanten:

Platzfestigkeitsmessungen



Schütteltest mit Stahlkugeln



Kraftmessung beim Trennen der Schotenwände

