

Nachhaltige KKF-Resistenz dank Übertragung von Resistenzgenen aus Wildkartoffeln mittels Cisgenese

Prof. Dr. Ir. E Jacobsen
Wageningen University and Research
Niederlande
30112016 Bern



Einführung

- Nachhaltige natürliche Widerstand gegen *Phytophthora infestans* benötigt
- Möglichkeiten um resistente Sorten zu bekommen
- Die Cisgenese Möglichkeit
- Warum kann Cisgenese von der Genetische Veränderung Vorschriften (GVV) freigestellt werden?

Züchtung für Krankheitsresistenz

Verschiedenen Strecken für die Entwicklung neuer Pflanzensorten:

- Nur Klassische Züchtung mit Introgression von Wildarten
- “DNA-Marker unterstützte“ Resistenzzüchtung
- Genetische Veränderung von spezifischen Eigenschaften wie Resistenz mit **Cisgenen**

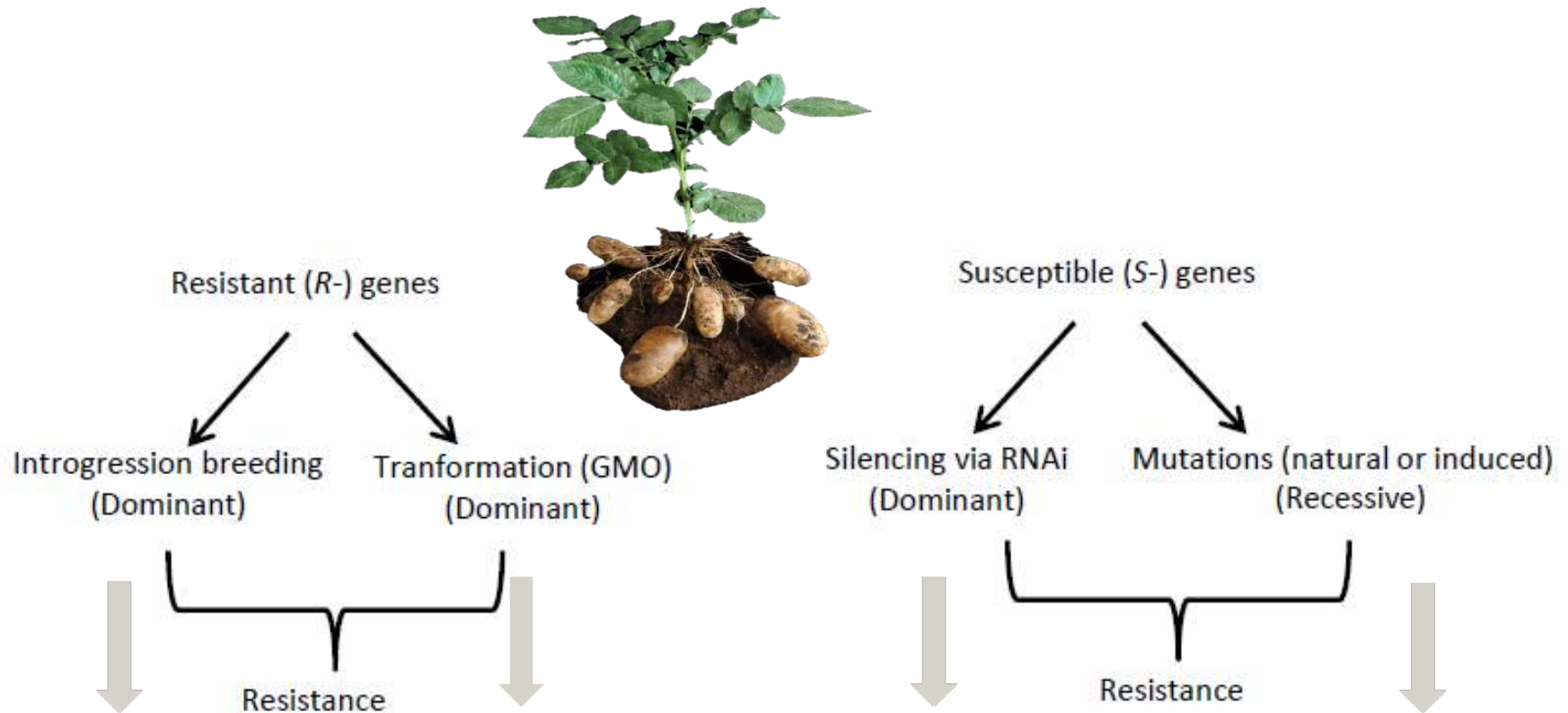
Warum freie Sorten?

- **40.000 ha Pflanzkartoffelvermehrung in 2015**
- Die Produktion von >1 Million Tonnen Pflanzkartoffeln
- >70% wird exportiert
- 496 Sorten und Flächen zwischen 00.08 - 5376 ha
- 80 Sorten >100 ha
- **6 Sorten >1000 ha** (Bintje, Desiree und Spunta sind nicht mehr geschützt)
- 416 Sorten < 100 ha

Verbesserung bestehenden , aber anfälligen, Sorten mit KKF-Resistenz hat direkt positiven Auswirkungen auf die Umwelt



Vier Möglichkeiten, um KKF-Resistenz mit *R* Genen und/oder *S*-Genen in Kartoffel zu bekommen



Klassische Züchtung
mit oder ohne mar-
kergestützte Selektion

Cisgene Pflanzen mit
R-Genen

S-Gen abschal-
ten mit RNAi

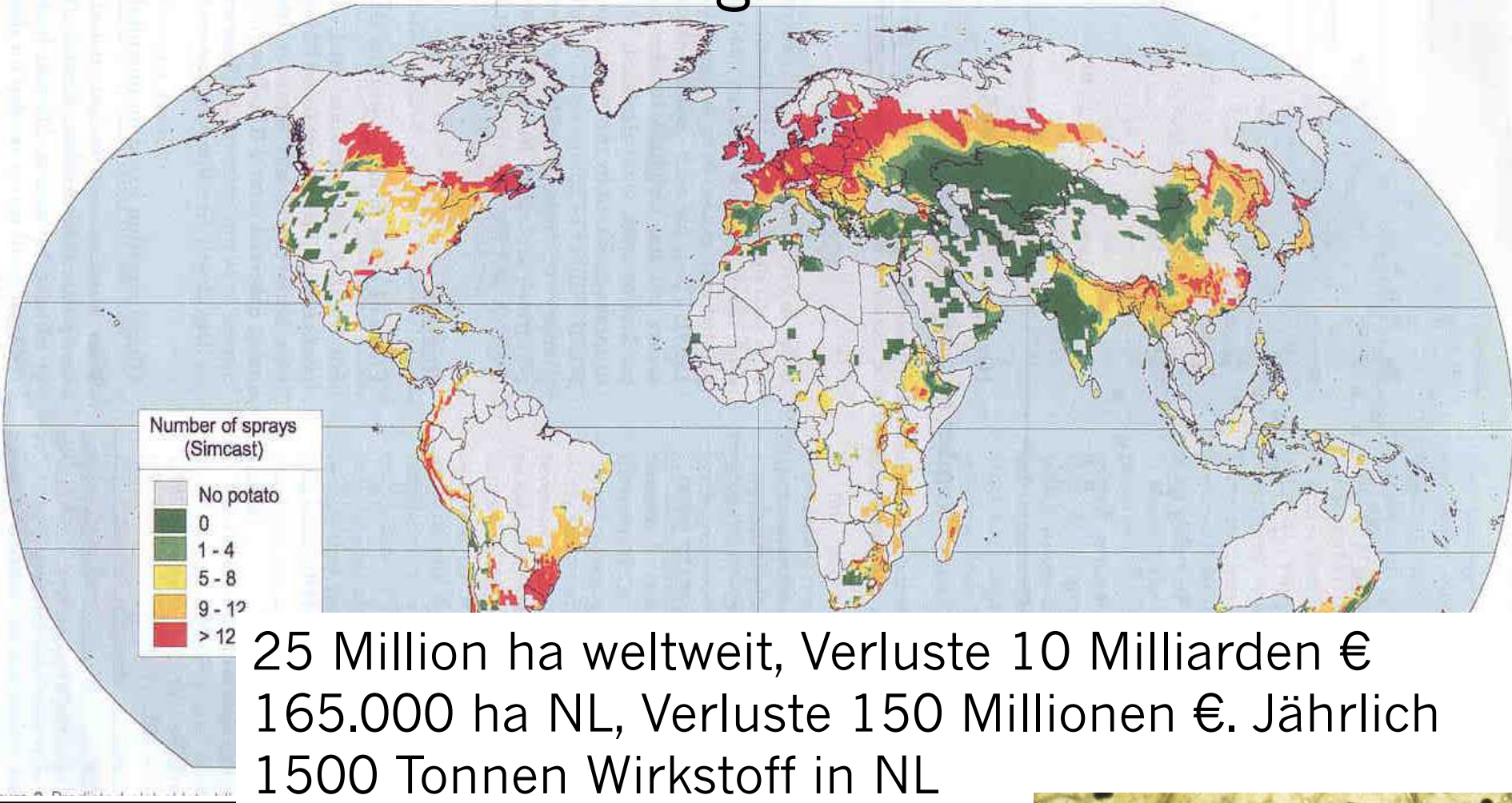
S-Gen mit tetra-allelem
Funktionsverlust mit
CRISPR/Cas9 Technologie
in tetraploiden Kartoffel

Definition: Cisgenese

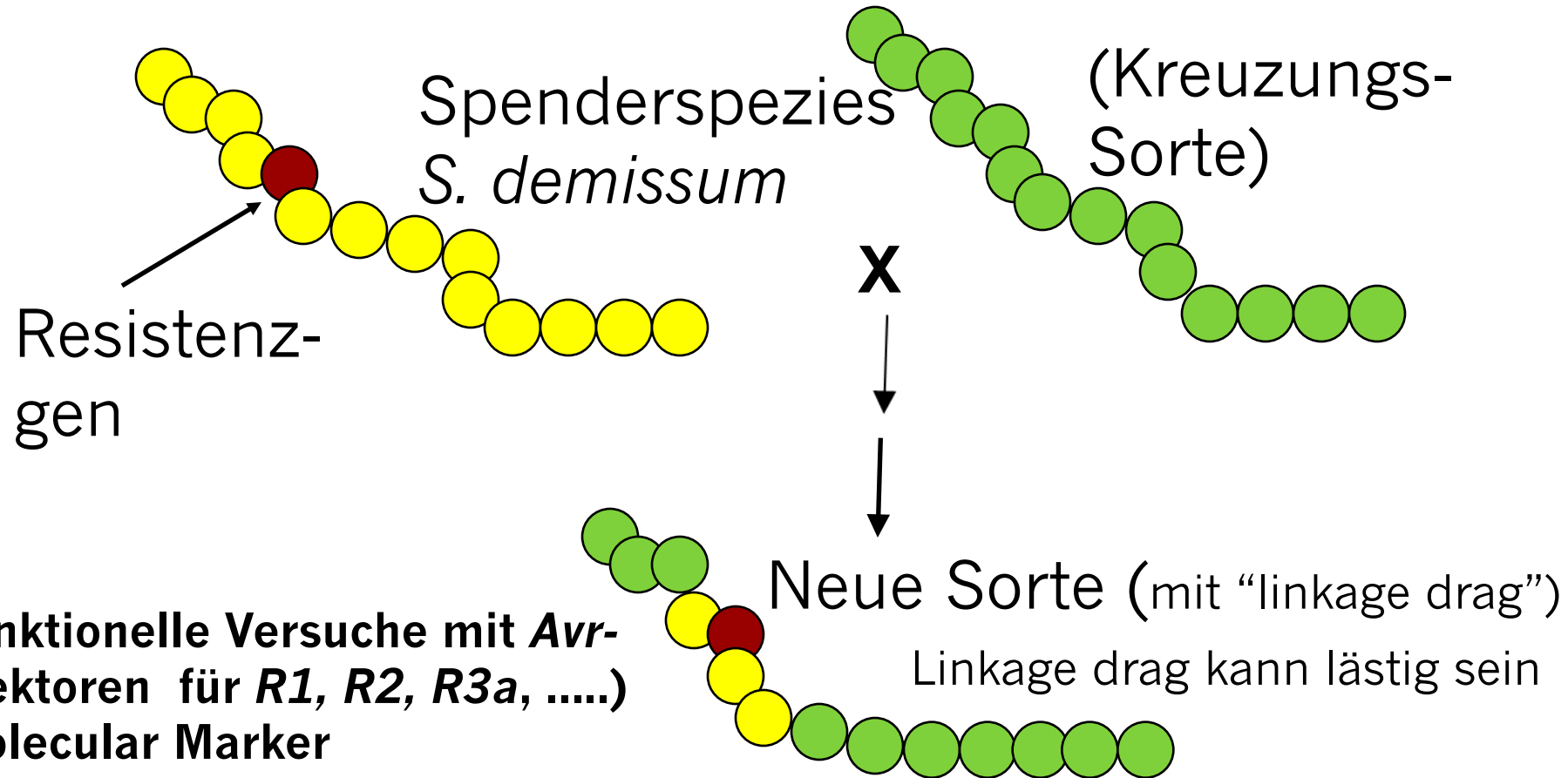
- **Ein cisgenen Pflanze** ist genetisch mit einem oder mehreren natürlichen Genen aus einem kreuzbaren Spenderpflanze modifiziert worden
- Das Gen steht unter der Kontrolle seines nativen Promotors und enthält seine natürlichen Introns und Terminator
- **Keine Fremdgene**, wie beispielsweise Gene von Bakterien für Selektion (Kanamycin-resistenz)
Selektion gegen “backbone und border“
- **Vorteilen Cisgenese:**
 - Gleichen Gene wie im klassischen Züchtungsbereich
 - Keine genetischen Kopplungsprobleme (linkage drag)

Resistenzgenen gegen *Phytophthora infestans* durch *Cisgenese* notwendig

Ernährungssicherheit



Introgressionszüchtung mit einzelner Gen-Übertragung: “Linkage Drag” mit traditioneller Rückkreuzungszüchtung



Brücke-Kreuzungen sind ein zusätzlicher Engpass in der Introgressions-Züchtung

50 Jahre her – **Brückekreuzungen** für Übertragung *Phytophthora* Resistenzgene

S. acaule 4x × ***S. bulbocastanum*** 2x (*R* Gene)



AB Hybrid 3x

↓ Colchicinverdopplung

AB Hybrid 6x × *S. phureja* 2x



ABP Hybrid 4x × *S. tuberosum* 2x



ABPT Material 4x *R*-gen + linkage-drag

Erste resistente Sorten waren Toluca und Bionica, mit nur **1 *R*-Gen**

Stapelung von *R*-Genen für nachhaltigen Widerstand auf diese Weise ist schwierig und immer mit einer Menge von “Linkage-Drag” begleitet. ***Rpi-blb2*** ist schon gebrochen. Das **Stapeln** ist der nächste Schritt.

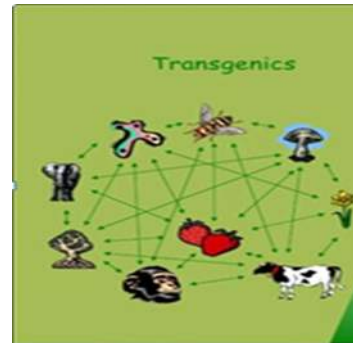
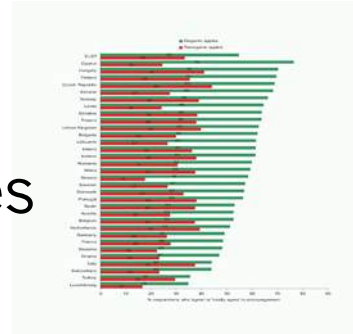
Langsamer Mehrschrittansatz; GVO-Ansatz effizienter und effektiver

Neue Domestikationsquelle: klonierte Gene

Cisgene: Natürliche Gene aus dem Genbestand des Züchters (mit viel Zuchterfahrung)

Transgene (neuer Genbestand)
(Teilweise) auf der Basis von Genen von Bakterien, Viren und nicht kreuzbaren Arten

Neue Transgen-Quelle kombiniert mit Transformationsprozess brauchte Biosicherheits-Vorschriften. Es gibt mehrere Gründe, cisgene Pflanzen nicht als GVO zu betrachten

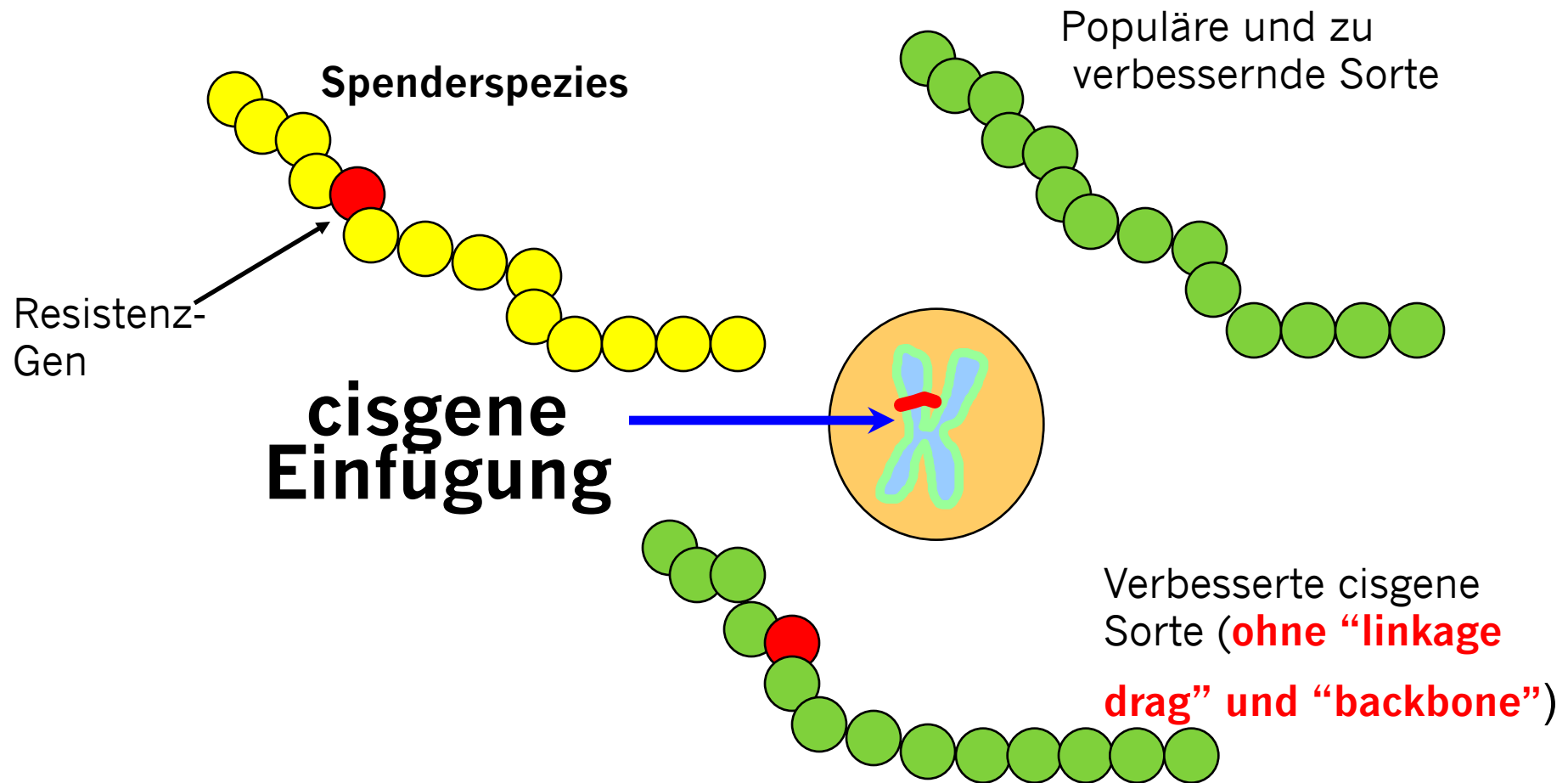


Cisgenese

Schritte:

1. Isolieren Zielgen von Spenderpflanze / Zuchtmaterial
2. Einbringen nur dieses Gens in eine hochwertigen Sorte mit Gentechnik ohne (bakterielles) Selektionsgen
3. Pflanzen ohne “backbone“ sind cisgen
4. Beurteilung der cisgenen Pflanzen
5. Eine neue resistente Sorte

Übertragung eines cis-Gens: Markerfreie Transformation ist eine Form der Rückkreuzung/Translokation



Neue Quellen für KKF-Resistenz in Mittel und Südamerika

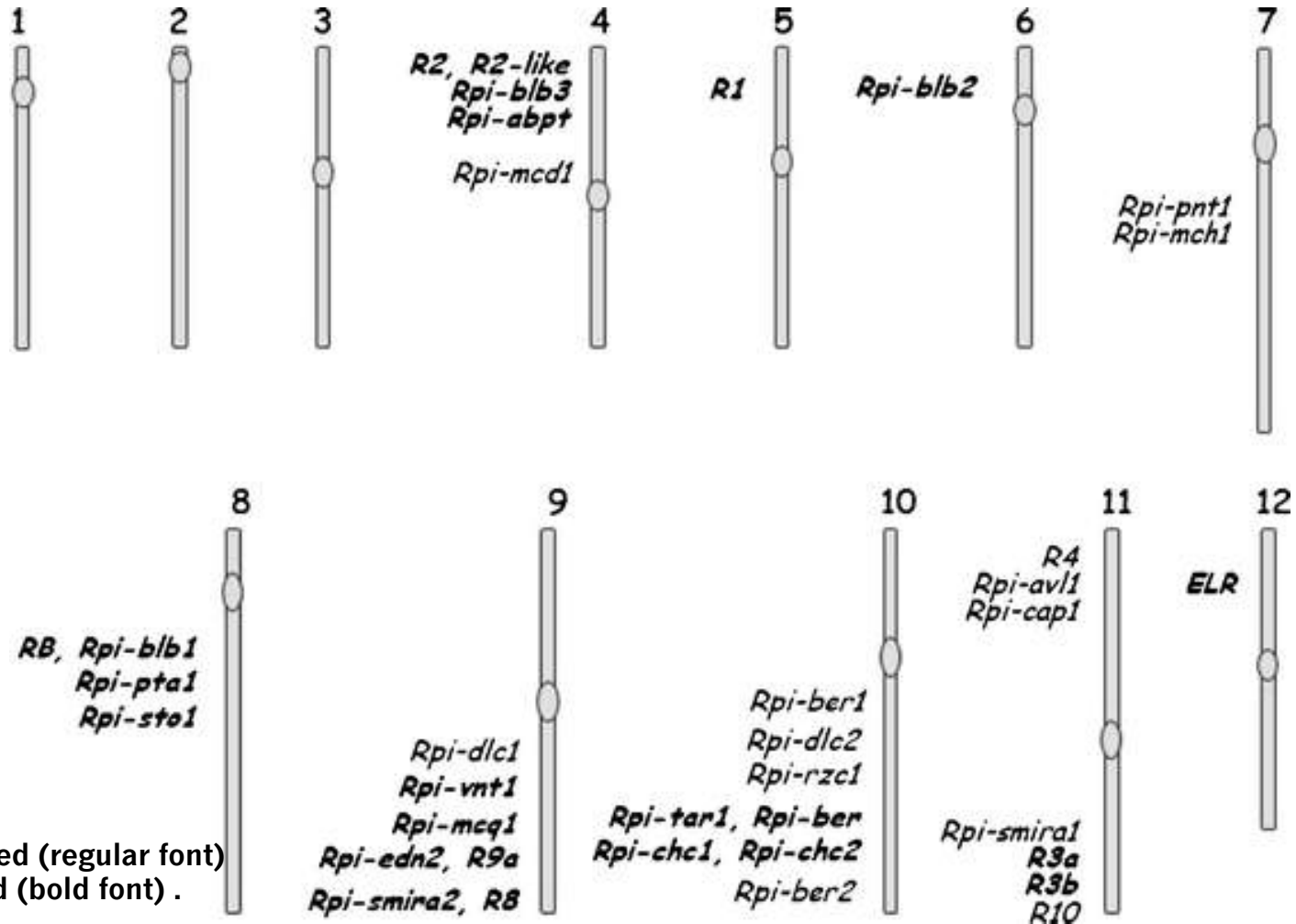
Screening von 1.000 Solanum-Zugängen



Kandidaten *R*-Gene

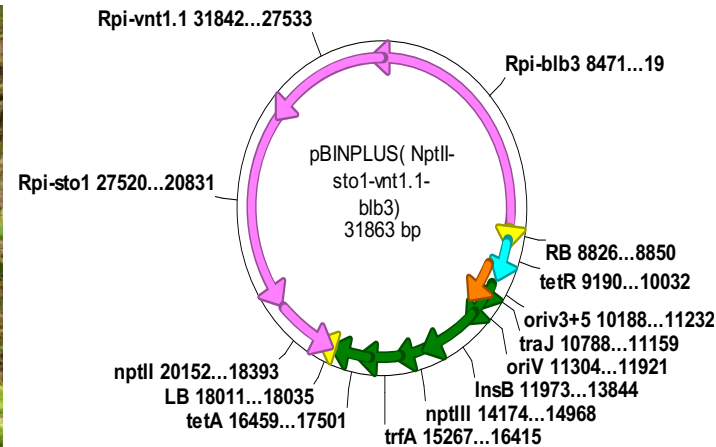
25 *R*-Gene geklont

R Gene lokalisiert und geklont



R genes mapped (regular font)
 R genes cloned (bold font) .

Drei *R*-Gene gegen *Phytophthora* machen die bestehende Kartoffelsorte Atlantic resistent



Before

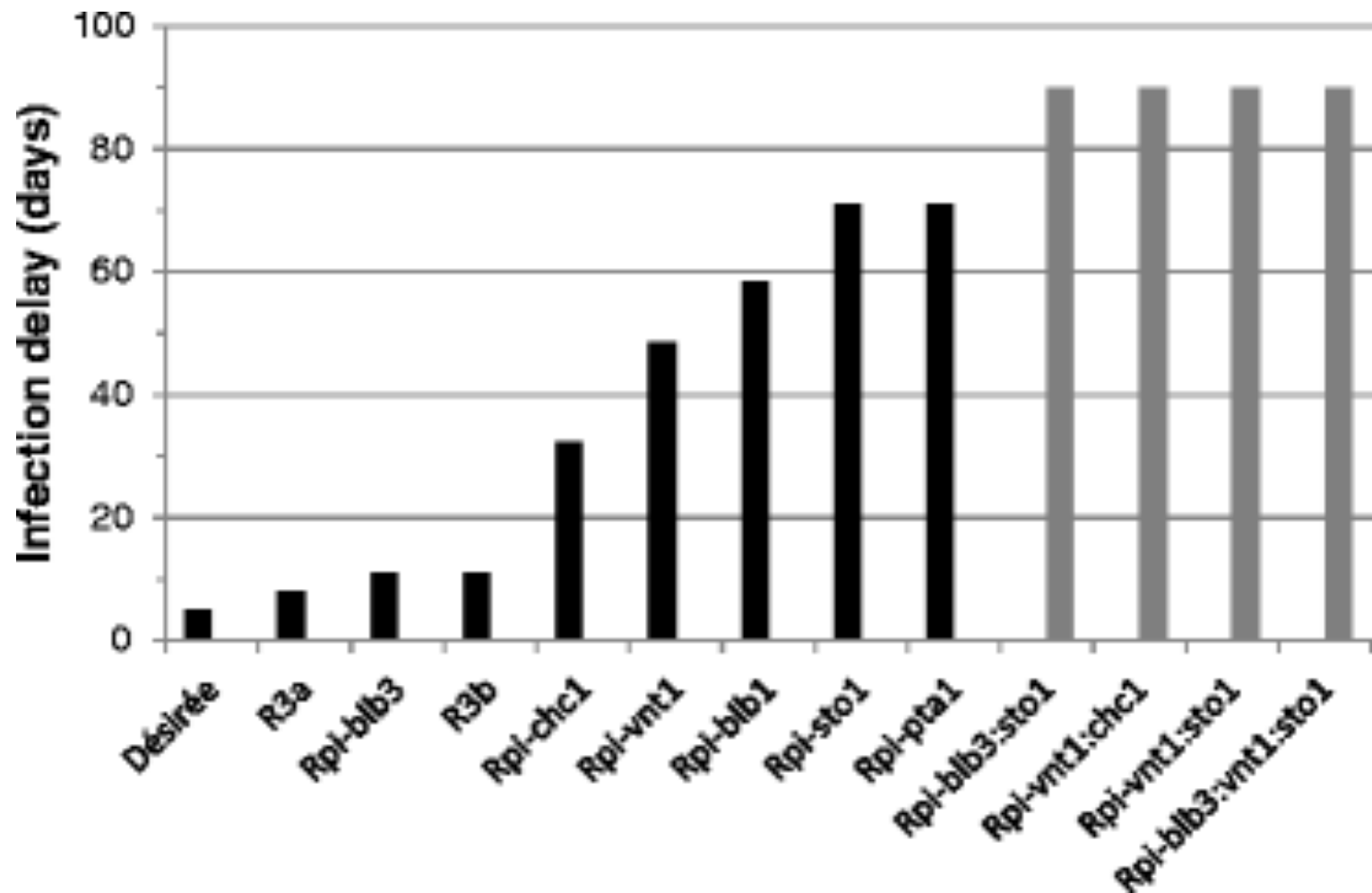
After

Knoltest

Avr-Gene für *R* Gen-Funktionstest

Feldtest

Virulenz-Monitoring unter Verwendung von Désirée und GM-Désirée mit einzelnen oder mehreren KKF *R*-Genen



Charakterisierung von cisgenen Transformanten versch. Kartoffelsorten, die 2 *Rpi*-Gene tragen

No	Plant ID	Host plant	PCR				Greenhouse	Agroinfiltration		DLA				
			<i>Rpi-vnt1.1</i>	<i>Rpi-sto1</i>	copy number ^a	back bone		<i>Rpi-vnt1.1</i>	<i>Rpi-sto1</i>	EC1	IPO-C	DHD11	90128	pic99189
1	H43-1	Atlantic	+	+	1/0	no		+	-	S	R	R	R	R
2	H43-2	Atlantic	+	+	1/1	no	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
3	H43-3	Atlantic	+	+	1/0	no	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
4	H43-4	Atlantic	+	+	1/0	no		+	-	S	S	S	S	S
5	H43-7	Atlantic	+	+	4/2	no		+	+	R	R	R	R	R
6	H43-8	Atlantic	+	+	4/1	no		+	+	R	R	R	R	R
7	H43-10	Atlantic	+	+	1/0	no		+	-	S	R	R	R	R
8	H43-11	Atlantic	+	+	3/1	no	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
9	H43-12	Atlantic	+	+	1/0	no		+	-	S	S	S	S	S
10	S43-2	Doip1	+	+	3/1	no		-	-	R	S	S	R	S
11	F43-1	Bintje	+	+	2/0	no		+	-	S	R	R	R	R
12	F43-2	Bintje	+	+	2/1	no		+	+	R	R	R	R	R
13	F43-3	Bintje	+	+	2/1	no		+	+	R	R	R	R	R
14	F43-4	Bintje	+	+	2/1	no		+	+	R	R	R	R	R
15	F43-5	Bintje	+	+	2/2	no		+	+	R	R	R	R	R
16	W43-1	Potae9	+	+	3/1	no		+	+	R	R	R	R	R
17	W43-2	Potae9	+	+	3/1	no	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
18	W43-3	Potae9	+	+	3/0	no		+	-	S	R	R	R	R
19	W43-4	Potae9	+	+	3/0	no	dwarf	n	n	n	n	n	n	n
20	W43-5	Potae9	+	+	3/1	no		+	+	R	R	R	R	R

a: Kopienzahl für *Rpi-vnt1.1* bzw. *Rpi-sto1*. "0" bedeutet, dass keine Schätzungen vorgenommen wurden
Agro-infiltration mit *Avr-vnt1.1* und *Avr-sto1*

Molekulare Analyse und Selektion von cisgenen Pflanzen mit mehreren KKF *R*-Genen

Klon	Code	Anzahl cisgene Pflanzen	Alle R Genen aktiv	normale Pflanzen form	Einzelne Kopie	Insertationsstelle bekannt	Rand deletio-nen
Klon A	vnt1:edn2	25	19	17	13	5	2
	chc1	16	8	8	2	7	2
Klon B	edn2	32	1	0			
	vnt1:blb3	9	9	6	5	2	1

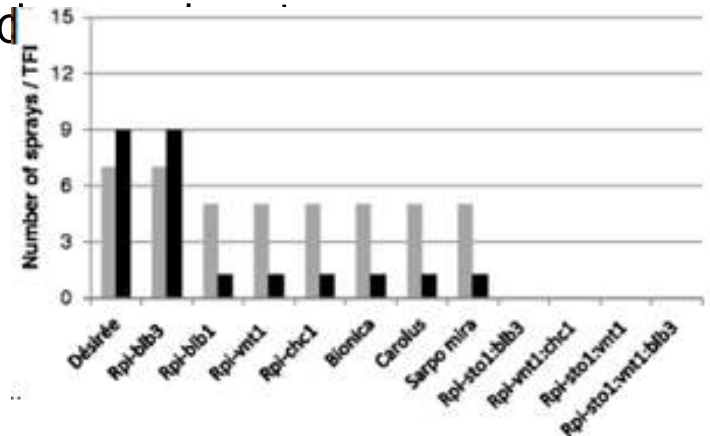
Cisgene Pflanzen können mit Einzelkopie-Einfügung, Randdeletionen und Lokalisation der *R*-Gen-Einfügungsstelle gewählt werden

2015:Öffentlicher Tag auf der Demonstrations-Testfeld mit cisgenen *Phytophthora*-resistenten Pflanzen



Cisgene Kartoffel-Experimente durch andere

- 1. **Belgien:** cisgene Kartoffeln wurden für mehrere Jahre angebaut und die gleiche hohe Widerstandskraft, wie in unseren Experimenten, wurde beobachtet
- 2. **Amiga:** In Irland wurde Desiree mit *Rpi-vnt1* mehrere Jahre mit hohem Niveau der Spätfäule Widerstand
- In der Schweiz



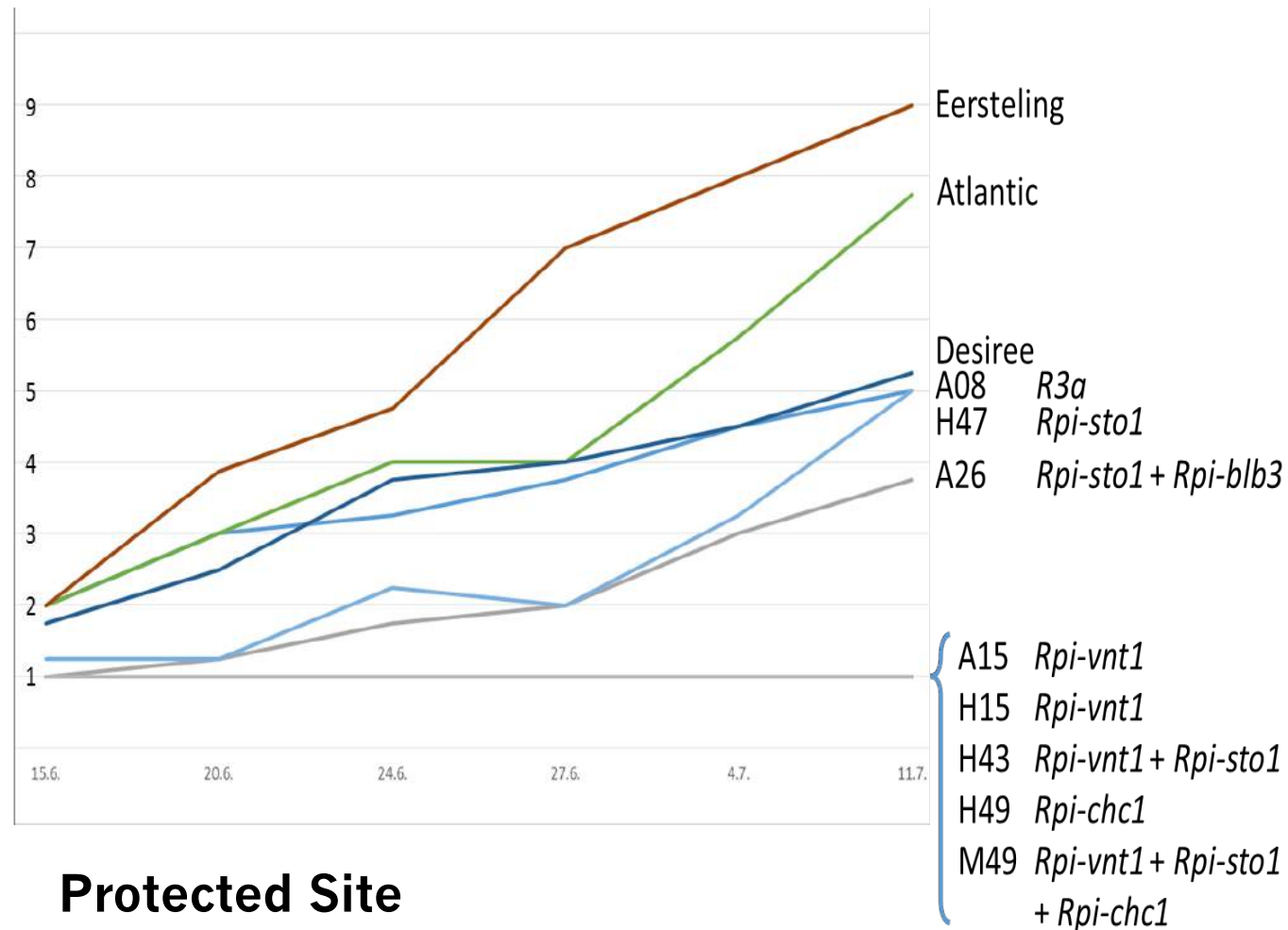
Kessel et al., in preparation

Amiga:

Die IPM2.0-Kontrollstrategie mit resistenten Kartoffelsorten reduziert Fungizid-Bedarf um 80-90%, ohne die Kontrollwirksamkeit zu beeinträchtigen.

➤ Cisgenese ist in der Lage, anfällige Sorten dauerhaft und bedeutend zu verbessern

Resultate 2016: *Phytophthora*-Bonitur in der Schweiz



Protected Site
Agroscope, Zürich-Reckenholz



EU-Definition GVO, inkl. vorgeschlagene Änderung

EU 2001/18/EC

Definition von GVO: Organismen, deren genetisches Material in einer nicht-natürliche Art und Weise geändert worden ist, durch

- Rekombinante DNA-Techniken
- Mikro-Injektion mit DNA
- Fusion von Zellen von nicht-kreuzbaren Organismen

Techniken, die nicht zu einen GVO (**Anhang 1A**), leiten:

- Polyploidisierung
- *In-vitro* Fertilisation

Techniken, die zu einer GVO leiten, aber die von der GVO-Vorschriften (**Anhang 1B**) befreit sind:

- Mutagenese
- Fusion von Zellen von kreuzbaren Pflanzen

Änderungsvorschlag: **CISGENESE** zu 1A oder 1B hinzufügen

Schlussfolgerungen

Warum Cisgenese?

1. Dauerhafte KKF-Resistenz mit mehreren R-Genen für starke Reduktion des Pestizidbedarfs
2. Zeitgewinn
3. Spezifisch; Nur gewünschte Allelen/Genen introduziert
4. Hochwertige Sorte verbessern
5. Mindestens so sicher wie klassische Züchtung
6. Von den Benutzern gegenüber Transgenese bevorzugt; natürliche Gene aus den Kulturarten selbst
7. Die Wissenschaft ist jetzt bereit
8. Jeder Pflanze ist schon in Kontakt mit *Agrobacterium*

Wir argumentieren, dass cisgene Pflanzen nicht durch die GV-Verordnung abgedeckt werden

Mitarbeiter

Wageningen University and Research

- Richard Visser
- Henk Schouten
- Jack Vossen
- Vivianne Vleeshouwers
- Yuling Bai
- Suxian Hardeman-Zhu
- Anton Haverkort
- Geert Kessel
- Bert Lotz
- Ronald Hutten

Nachfrage

WAS WÄHLEN SIE?

- Cisgenese mit einem theoretischen Risiko, das nicht größer ist als das der konventionellen Pflanzenzüchtung?
oder
- Jährlich **1500-2000 Tonnen Wirkstoff** in der Umwelt als Fungizid gegen *Phytophthora*, wie in den Niederlanden?