

Genom-Editierung in der Pflanzenzüchtung: Chancen und Risiken

Detlef Weigel

Max-Planck-Institut
für Entwicklungsbiologie
Tübingen

<http://weigelworld.org>



@PlantEvolution

Finanzielle Interessen



eLIFE

KWS



computomics®



weigelworld

plant biology, developmental genetics
and evolutionary genomics.



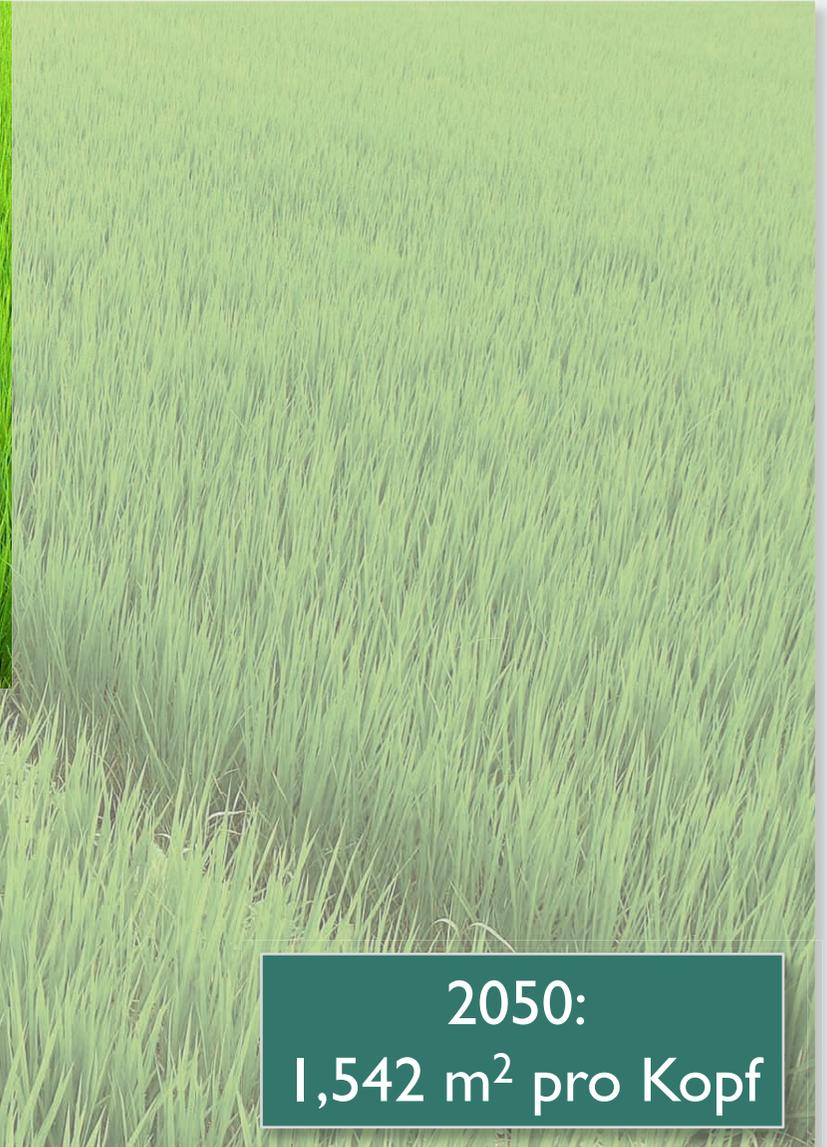
3.1 Milliarden

1961:
4,170 m² pro Kopf

Landwirtschaftliche Nutzfläche auf der Welt



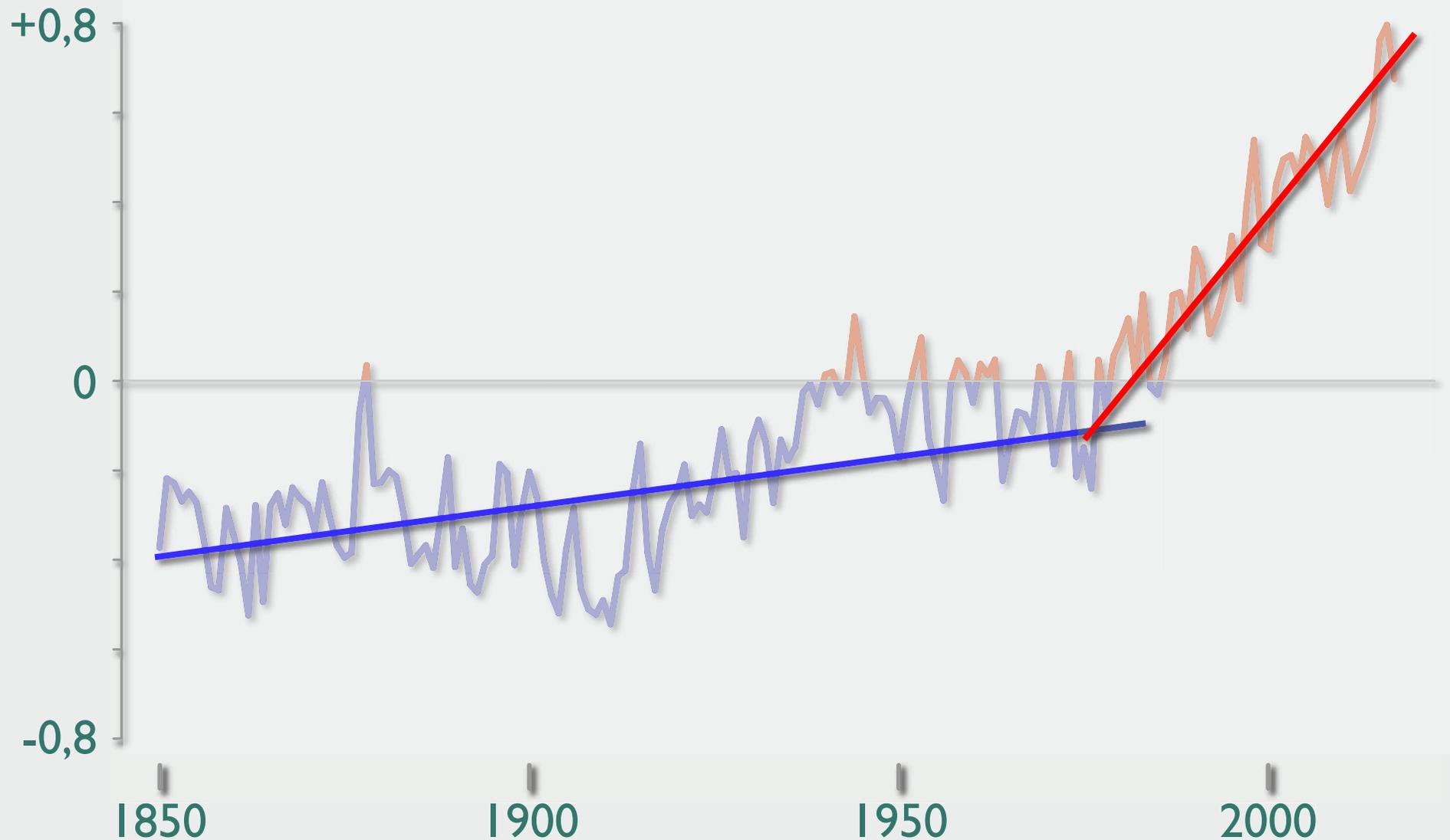
9.4 Milliarden



2050:
1,542 m² pro Kopf



Globale Abweichung vom 1961-1990 Mittel (in °C)



Zum Glück haben die Erträge (trotzdem) zugenommen



Züchtung hat Pflanzen dramatisch verändert



Teosinte



Mais





vidiplanet.com

800 Körner

12-16 Körnerreihen

„Nackte“ Körner

Kein Zerfall des reifen Kolbens



8-12 Körner

2 Körnerreihen

Schützende, harte Kapseln

Zerfall des reifen Kolbens

... produzieren fruchtbare Nachkommen

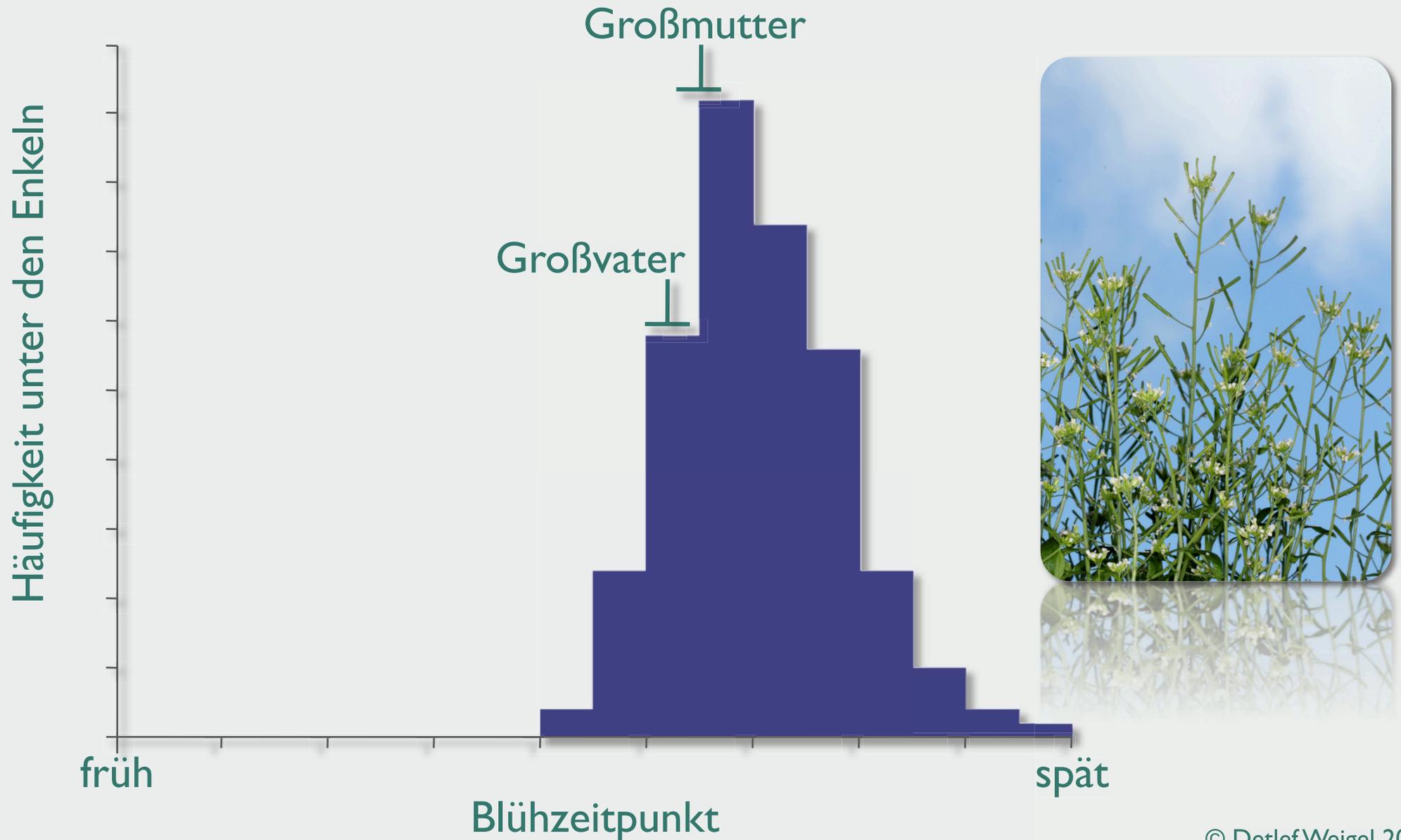


Teosinte

F₁ Hybride

Mais

Blühverhalten der Ackerschmalwand



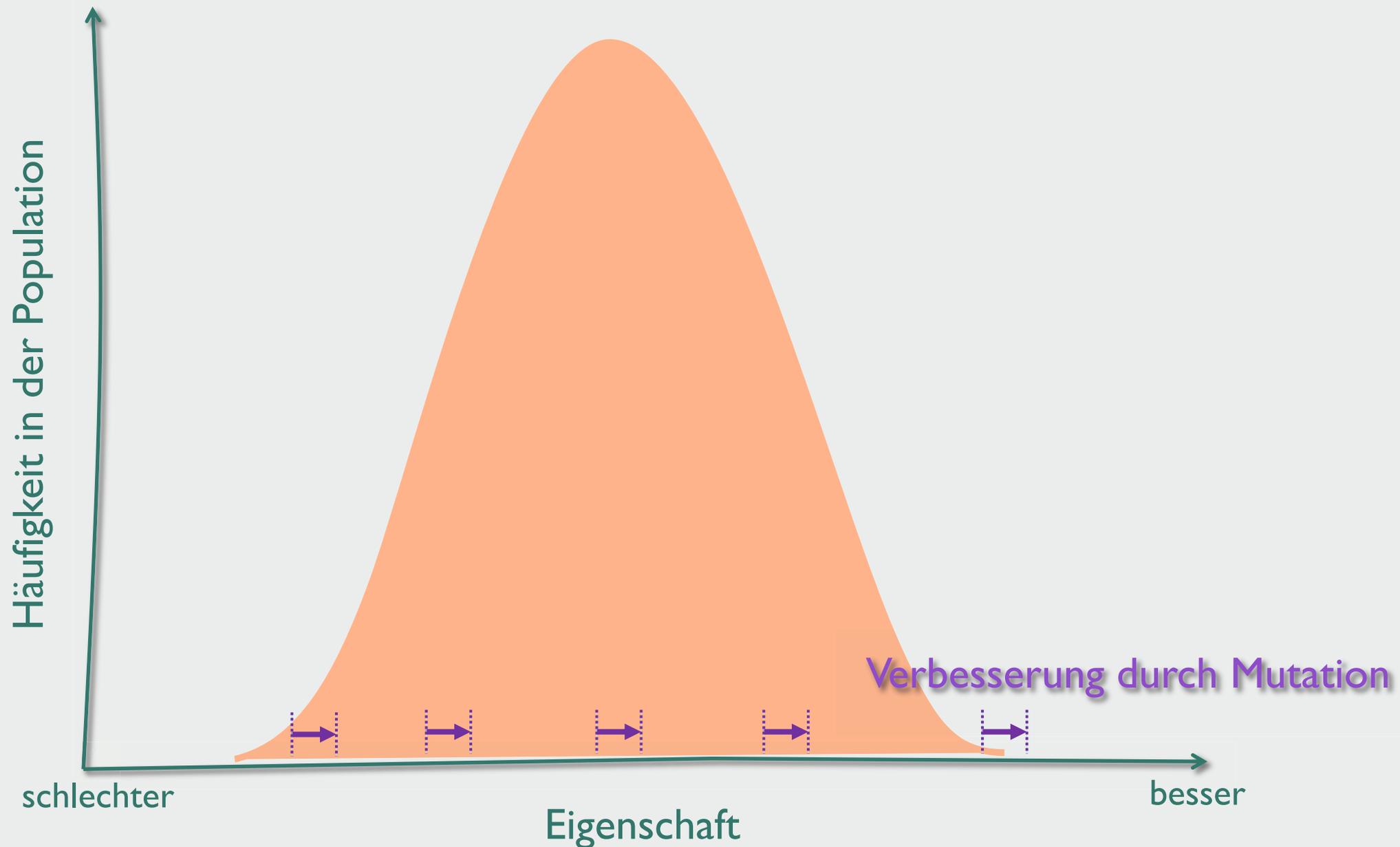


Großvatersorte (früh)



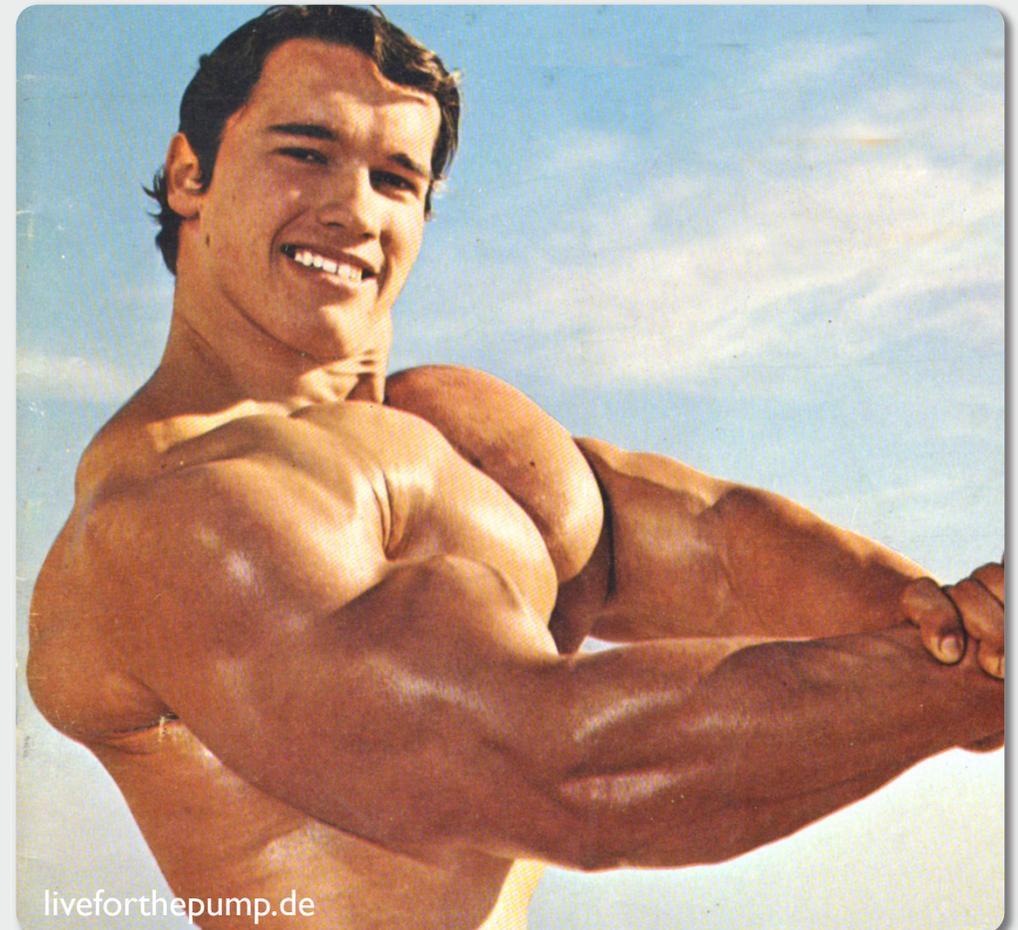
Großvatersorte +
I frühes Gen
von der Großmutter

Eine vorteilhafte Variante nützt daher nicht immer



Was macht die Züchtung sonst noch schwierig?

Körpergröße, ein Beispiel für Kompromisse





Normale Tomate
(„Wildtyp“)

Mutante

ohne Gießen



Ein Beispiel bei Pflanzen: Toleranz für Trockenstress



mit Gießen



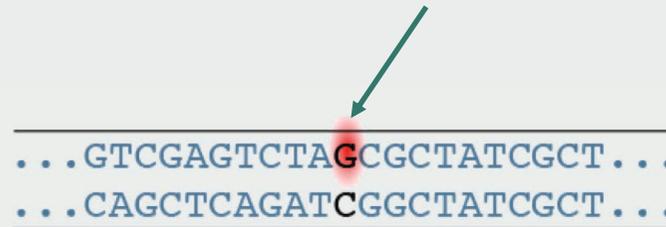
ohne Gießen



Wie verändert sich das Erbgut?



Mutation



Deletion



Insertion



Substitution



Substitution

DNA	C A G	C A A	T T T	A A G
Protein	Gln	Gln	Phe	Lys

Substitution

DNA	C A G	C A C	T T T	A A G
Protein	Gln	His	Phe	Lys

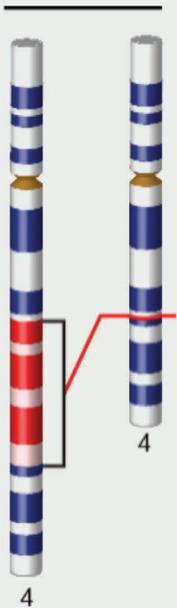
Deletion

DNA	C A G	C A-T	T T A	A G T
Protein	Gln	His	Leu	Ser

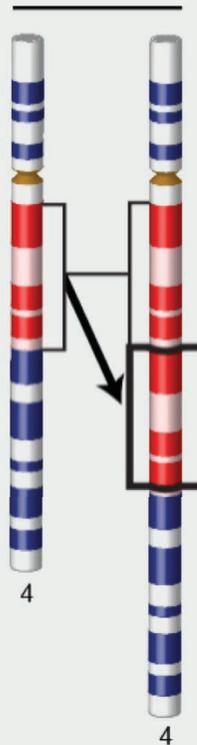
Insertion

DNA	C A G	C A G	G T T	T A A
Protein	Gln	Gln	Val	*

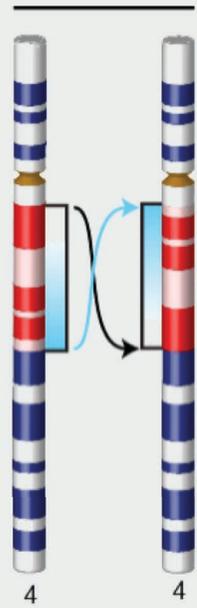
Defizienz



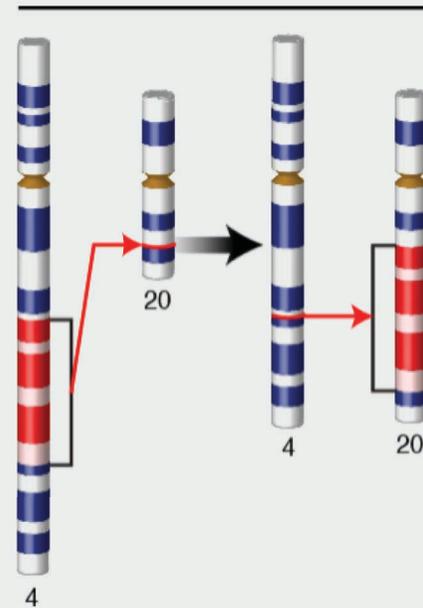
Duplikation



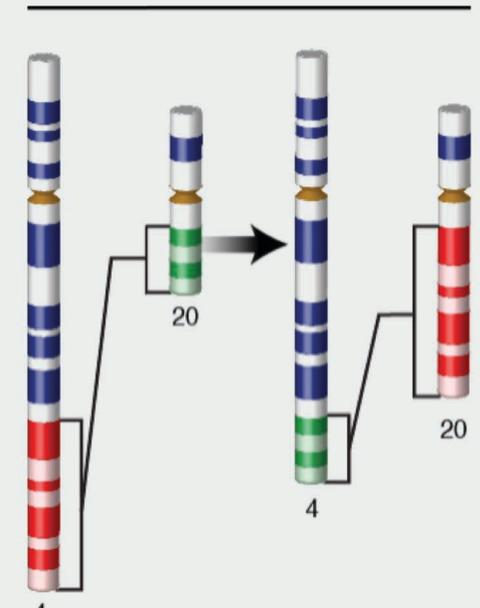
Inversion

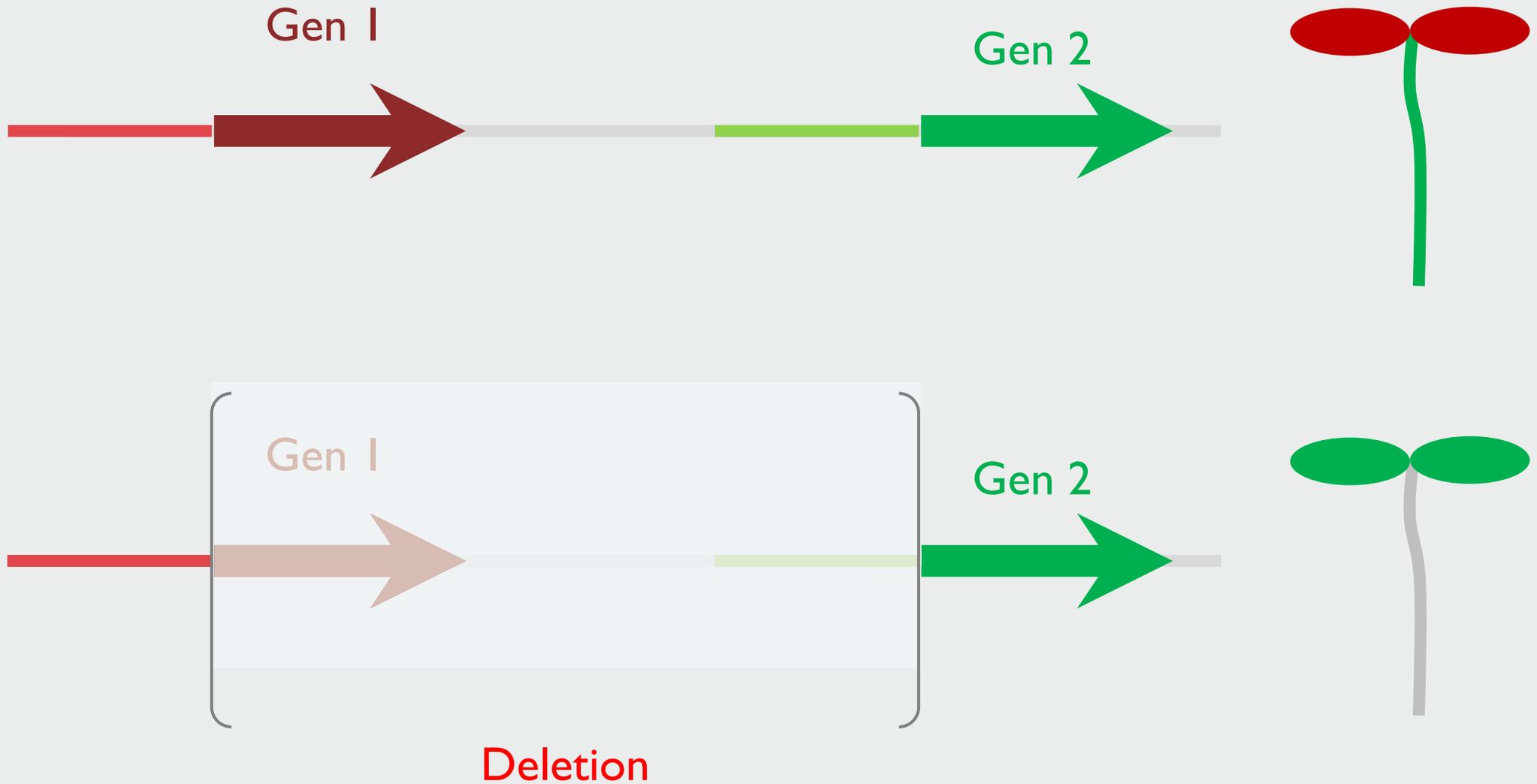


Transposition



Translokation

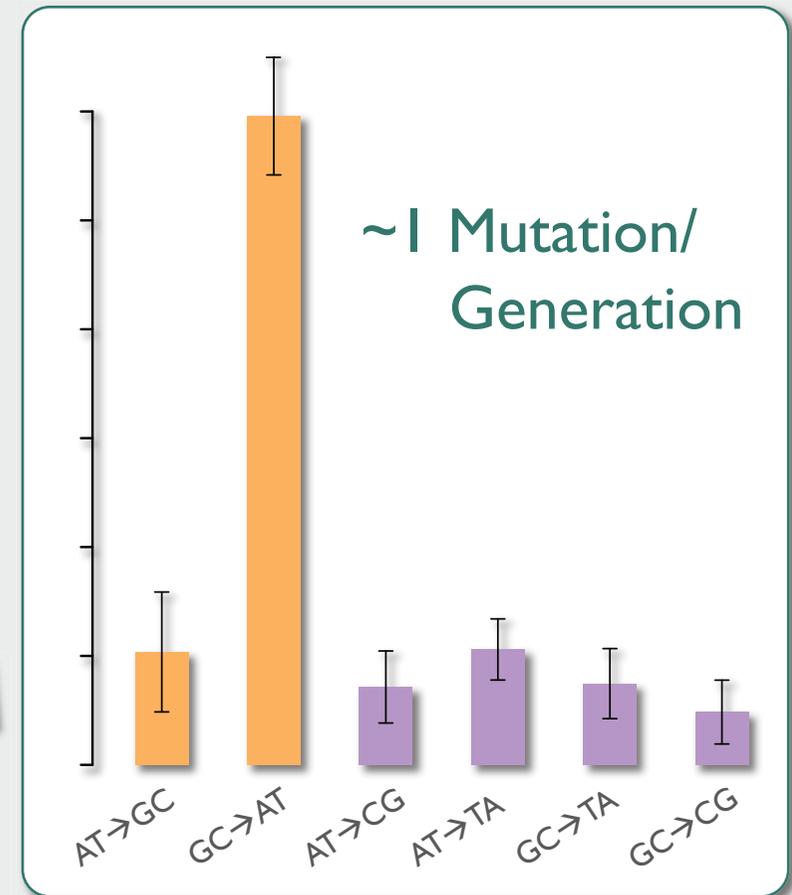
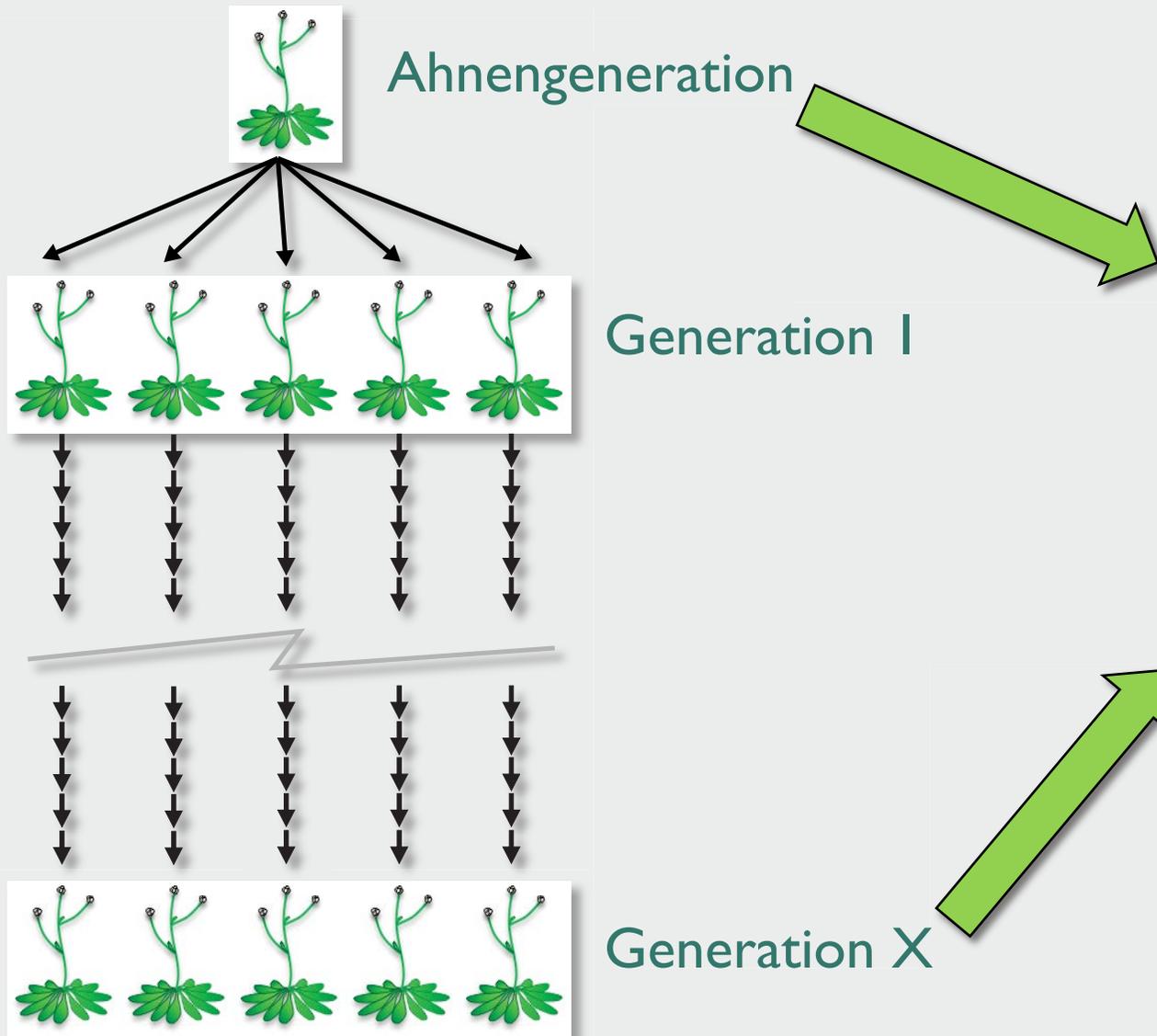




Wie häufig sind spontane Mutationen im Labor?



Mutationsakkumulationslinien

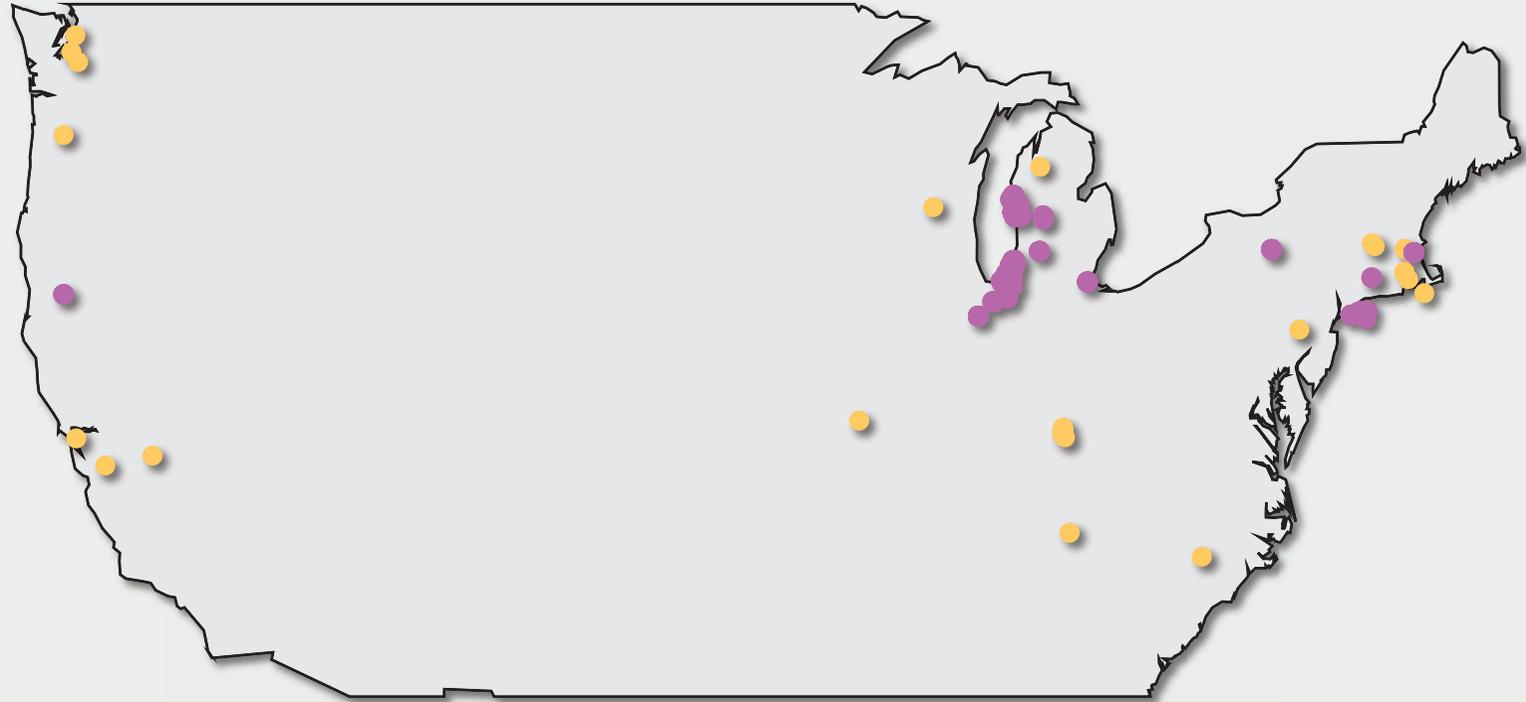
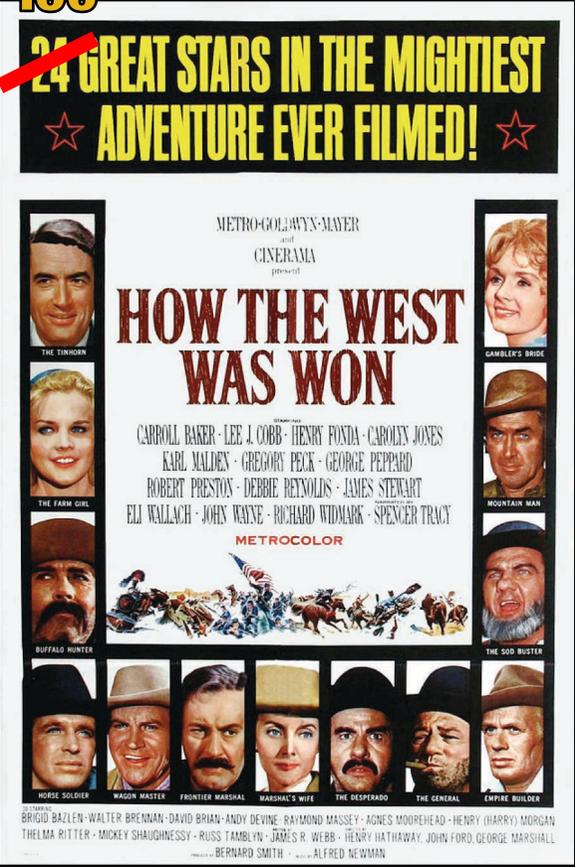


Ein natürliches Mutationsakkumulationsexperiment



Eine einzige Sorte der Ackerschmalwand dominiert in Nordamerika

100



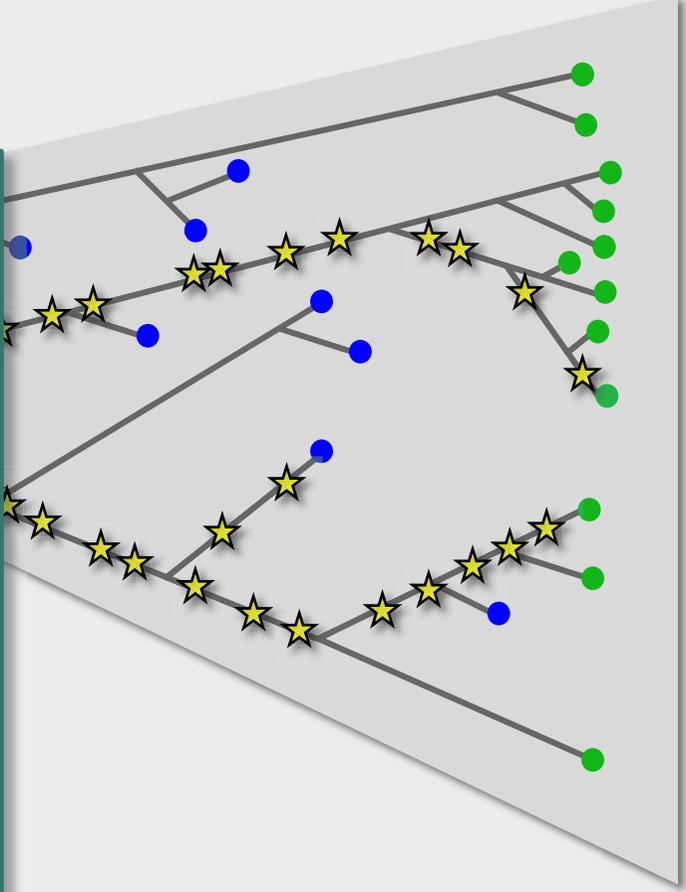
- US Sorte I
- Andere Sorten

Ein natürliches Mutationsexperiment



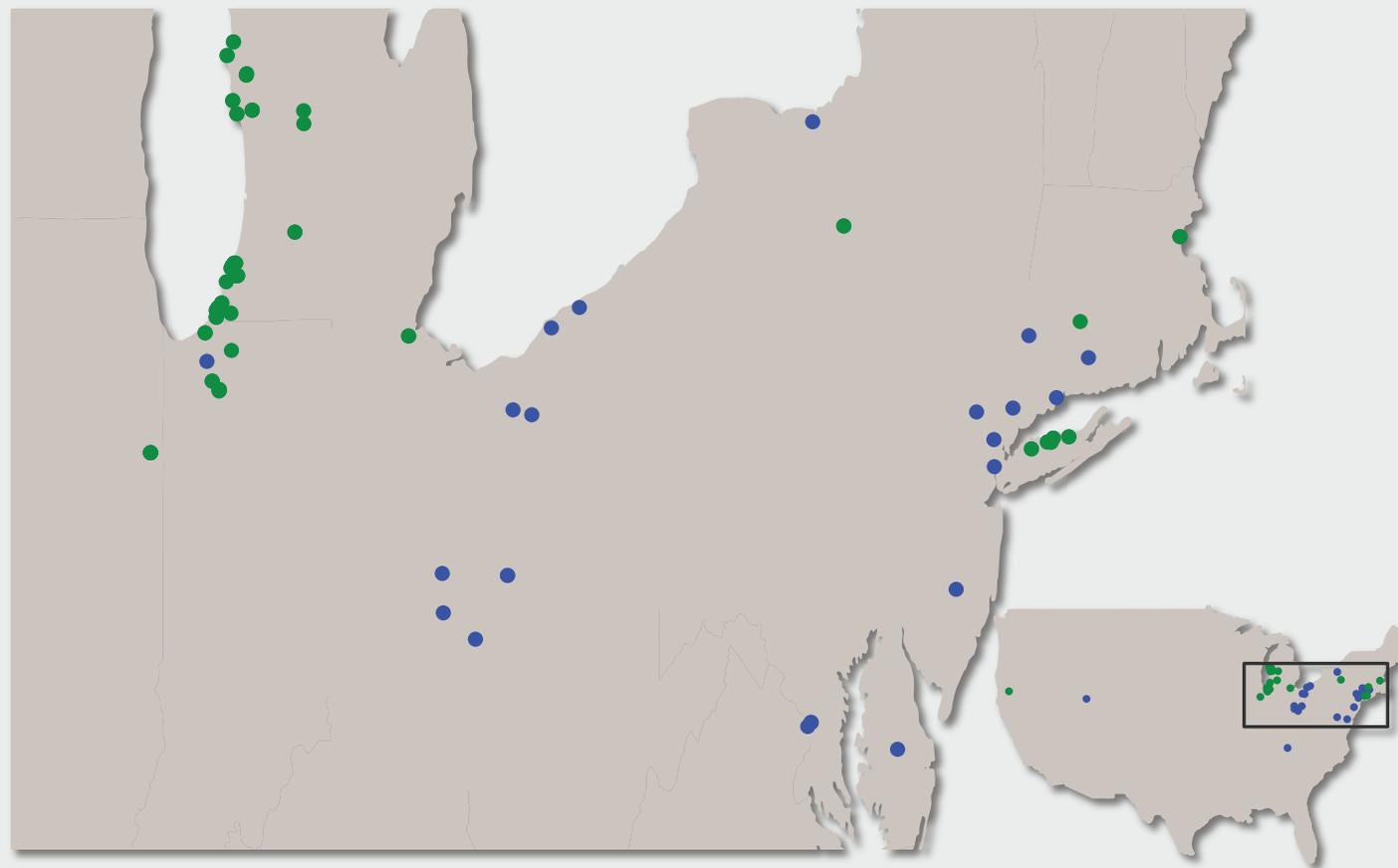
Ein europäischer Vofahre

Zeit



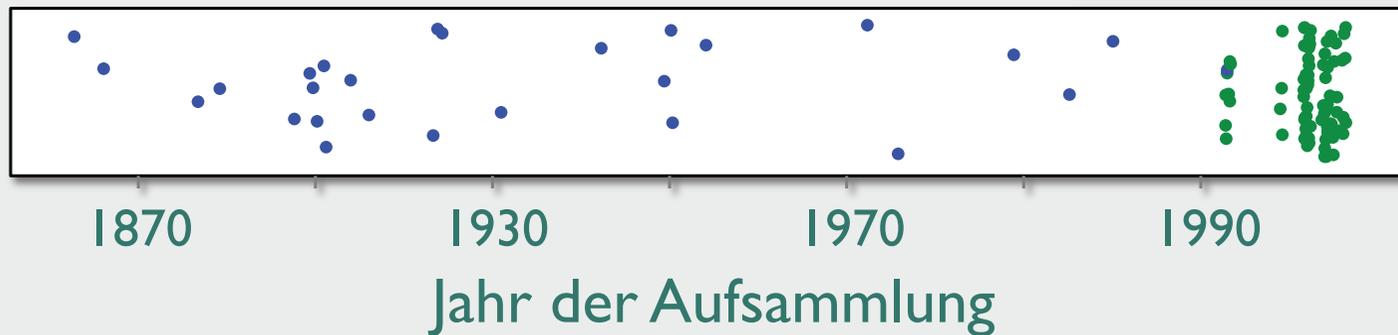
US Sorte I

Erbgutvergleich von Vertretern der US Sorte I



~~87~~ 73 moderne Genome
der US Sorte I

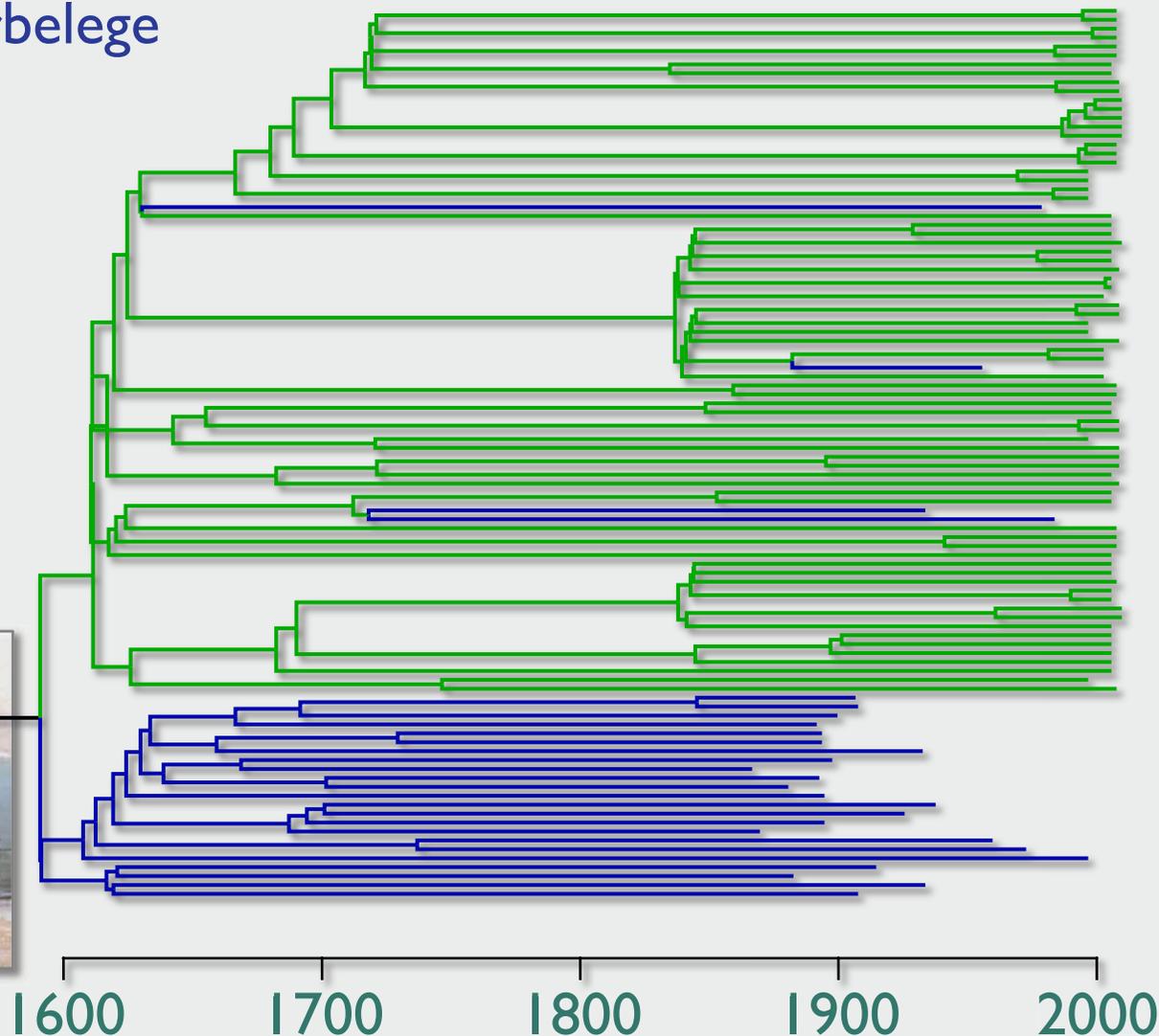
~~36~~ 27 Herbarbelege
der US Sorte I





moderne Genome

Herbarbelege



5.100 Punktmutationen

→ Mutationsraten im Labor und in der Natur sind ähnlich

Was bedeutet das für eine Pflanze wie den Weizen?



Ackerschmalwand: 1 Mutation/Genom (0,1 Milliarden bp)

Weizen: 100 Mutationen/Genom (10 Milliarden bp)

1 ha Feld \rightarrow 10 t = 10 Millionen g Weizen

1 Weizenkorn 50 mg \rightarrow 20 Körner/g

\rightarrow 200 Millionen Körner \rightarrow 20 Milliarden Mutationen



Extensive intraspecific gene order and gene structural variations between Mo17 and other maize genomes

Silong Sun^{1,15}, Yingsi Zhou^{1,15}, Jian Chen^{1,15}, Junpeng Shi^{1,15}, Haiming Zhao^{1,15}, Hainan Zhao¹, Weibin Song¹, Mei Zhang^{1,2}, Yang Cui¹, Xiaomei Dong¹, Han Liu¹, Xuxu Ma¹, Yinping Jiao³, Bo Wang³, Xuehong Wei³, Joshua C. Stein³, Jeff C. Glaubitz⁴, Fei Lu^{5,6,7}, Guoliang Yu⁸, Chengzhi Liang⁹, Kevin Fengler¹⁰, Bailin Li¹¹, Antoni Rafalski¹¹, Patrick S. Schnable¹², Doreen H. Ware^{3,13}, Edward S. Buckler^{5,13} and Jinsheng Lai^{1,14*}

Maize is an important crop with a high level of genome diversity and heterosis. The genome sequence of a typical female line, B73 was previously released. Here, we report a de novo genome assembly of a corresponding male representative line, Mo17. More than 96.4% of the 2,183 Mb assembled genome can be accounted for by 362 scaffolds in ten pseudochromosomes with 38,620 annotated protein-coding genes. Comparative analysis revealed large gene-order and gene structural variations: approximately 10% of the annotated genes were mutually nonsyntenic, and more than 20% of the predicted genes had either large-effect mutations or large structural variations, which might cause considerable protein divergence between the two inbred lines. Our study provides a high-quality reference-genome sequence of an important maize germplasm, and the intraspecific gene order and gene structural variations identified should have implications for heterosis and genome evolution.

Table 2 | Variations within genes between B73 and Mo17 genomes

Variation type	Syntenic genes		Nonsyntenic genes	
	B73 genes	Mo17 genes	B73 genes	Mo17 genes
Structurally conserved genes	28,122	28,186	1,534	1,216
Without amino acid substitutions	12,167	12,674	326	306
No DNA variation in CDS region	9,760	10,231	256	246
No DNA variation in CDS and intron region	6,870	7,344	169	169
No DNA variation in genic region ^b	2,498	2,458	12	10
With amino acid changes	15,955	15,512	1,198	910
With missense mutation in CDS	15,611	15,438	1,130	899
With 3n indel in CDS	5,941	5,632	186	221
Genes with large effect mutations	3,947	4,020	1,387	977
Start-codon mutation	240	374	175	109
Stop-codon mutation	268	418	244	236
Splice-donor mutation	170	124	73	37
Splice-acceptor mutation	256	162	175	90
With 3n ± 1 indel in CDS	2,044	1,983	547	384
Premature stop codon	2,692	2,635	922	648
Genes with large structural variations	1,612	1,391	2,112	1,765
At least one exon missing	1,025	811	1,725	1,508
PAV genes	-	-	72	50
Total	33,681 ^a	33,597 ^a	5,105 ^a	4,008 ^a

^aOnly genes and their best hits in the counterpart genome anchored in ten pseudomolecules were included for the analysis. ^bGenic regions include 2 kb upstream and downstream of the gene body.

Wie verschieden sind zum Beispiel zwei Maissorten?



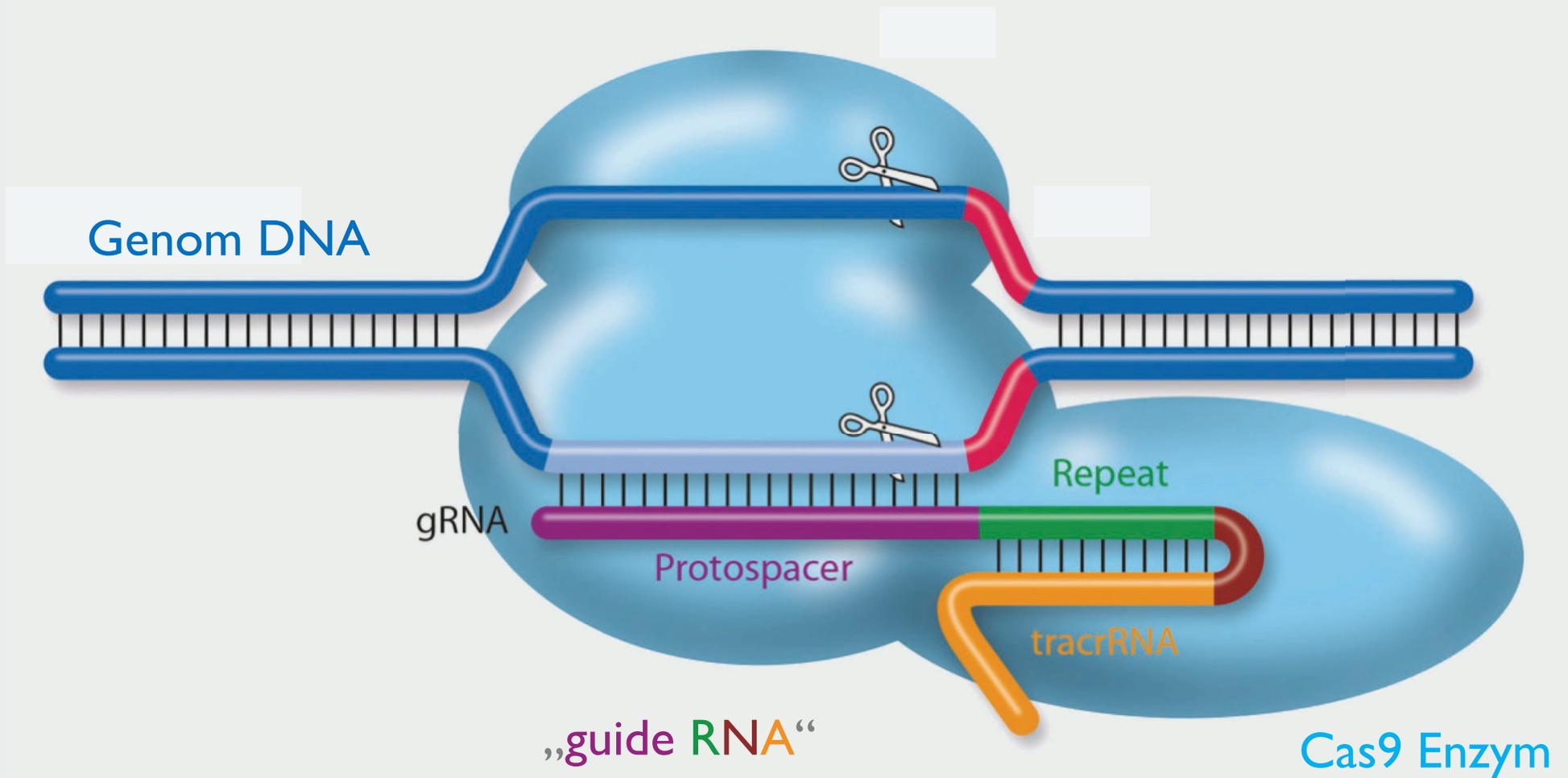
Table 2 | Variations within genes between B73 and Mo17 genomes

Variation type	Syntenic genes		Nonsyntenic genes	
	B73 genes	Mo17 genes	B73 genes	Mo17 genes
Structurally conserved genes	28,122	28,186	1,534	1,216
Without amino acid substitutions	12,167	12,674	326	306
No DNA variation in CDS region	9,760	10,231	256	246
No DNA variation in CDS and intron region	6,870	7,344	169	169
No DNA variation in genic region ^b	2,498	2,458	12	10
With amino acid changes	15,955	15,512	1,198	910
With missense mutation in CDS	15,611	15,438	1,130	899
With 3n indel in CDS	5,941	5,632	186	221
Genes with large effect mutations	3,947	4,020	1,387	977
Start-codon mutation	240	374	175	109
Stop-codon mutation	268	418	244	236
Splice-donor mutation	170	124	73	37
Splice-acceptor mutation	256	162	175	90
With 3n ± 1 indel in CDS	2,044	1,983	547	384
Premature stop codon	2,692	2,635	922	648
Genes with large structural variations	1,612	1,391	2,112	1,765
At least one exon missing	1,025	811	1,725	1,508
PAV genes	-	-	72	50
Total	33,681 ^a	33,597 ^a	5,105 ^a	4,008 ^a

^aOnly genes and their best hits in the counterpart genome anchored in ten pseudomolecules were included for the analysis. ^bGenic regions include 2 kb upstream and downstream of the gene body.

	B73	Mo17
Gesamtzahl der Gene	38,686	37,605
Missense-Mutation	16,744	16,437
Nonsense-Mutation	3,614	3,283
Mind. 1 Exon fehlend	2,750	2,319

Was kann Genom-Editierung?





CRISPR/Cas9-induzierte Mutation



Reparatur



CRISPR/Cas9-induzierte Mutation

...GTCGAGTCTA**G**CGCTATCGCT...
...CAGCTCAGAT**C**GGCTATCGCT...

...GTCGAGTCTA **CGCTATCGCT**...
...CAGCTCAGAT **GGCTATCGCT**...

Deletion

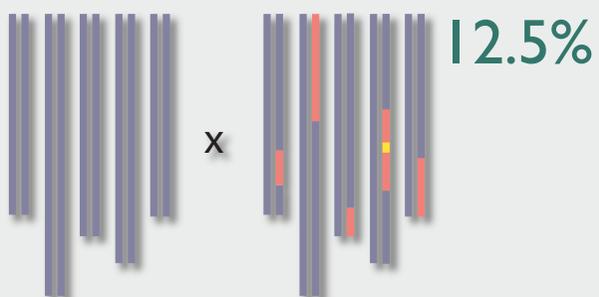
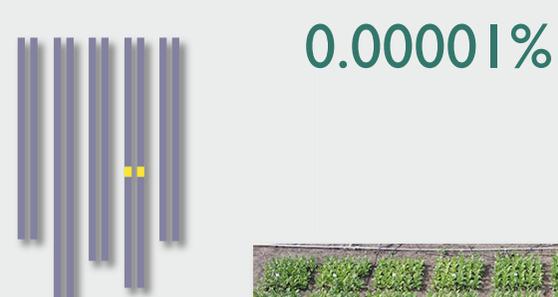
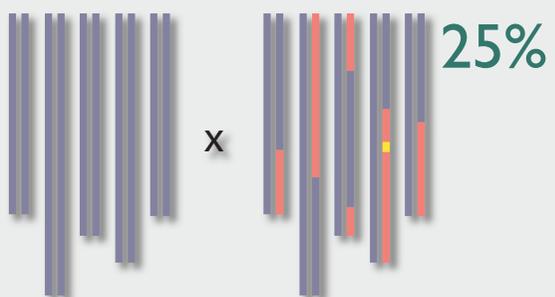
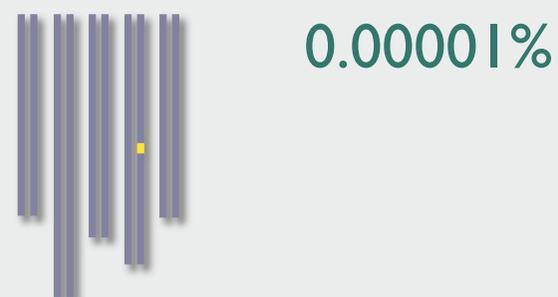
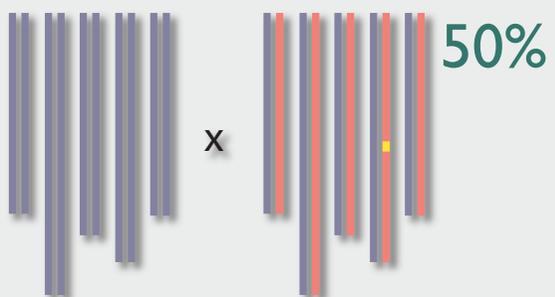
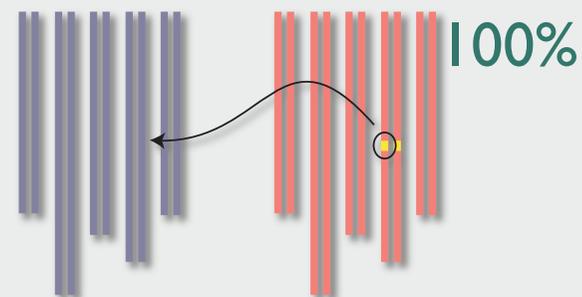
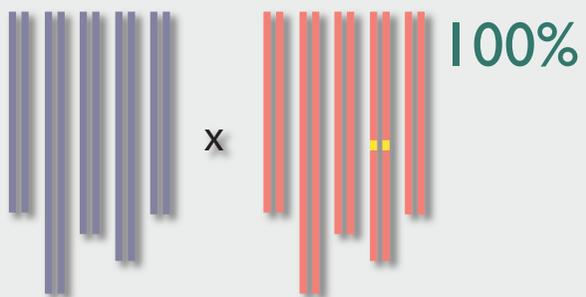
...GTCGAGTCTA **A**CGCTATCGCT...
...CAGCTCAGAT **T**CGGCTATCGCT...

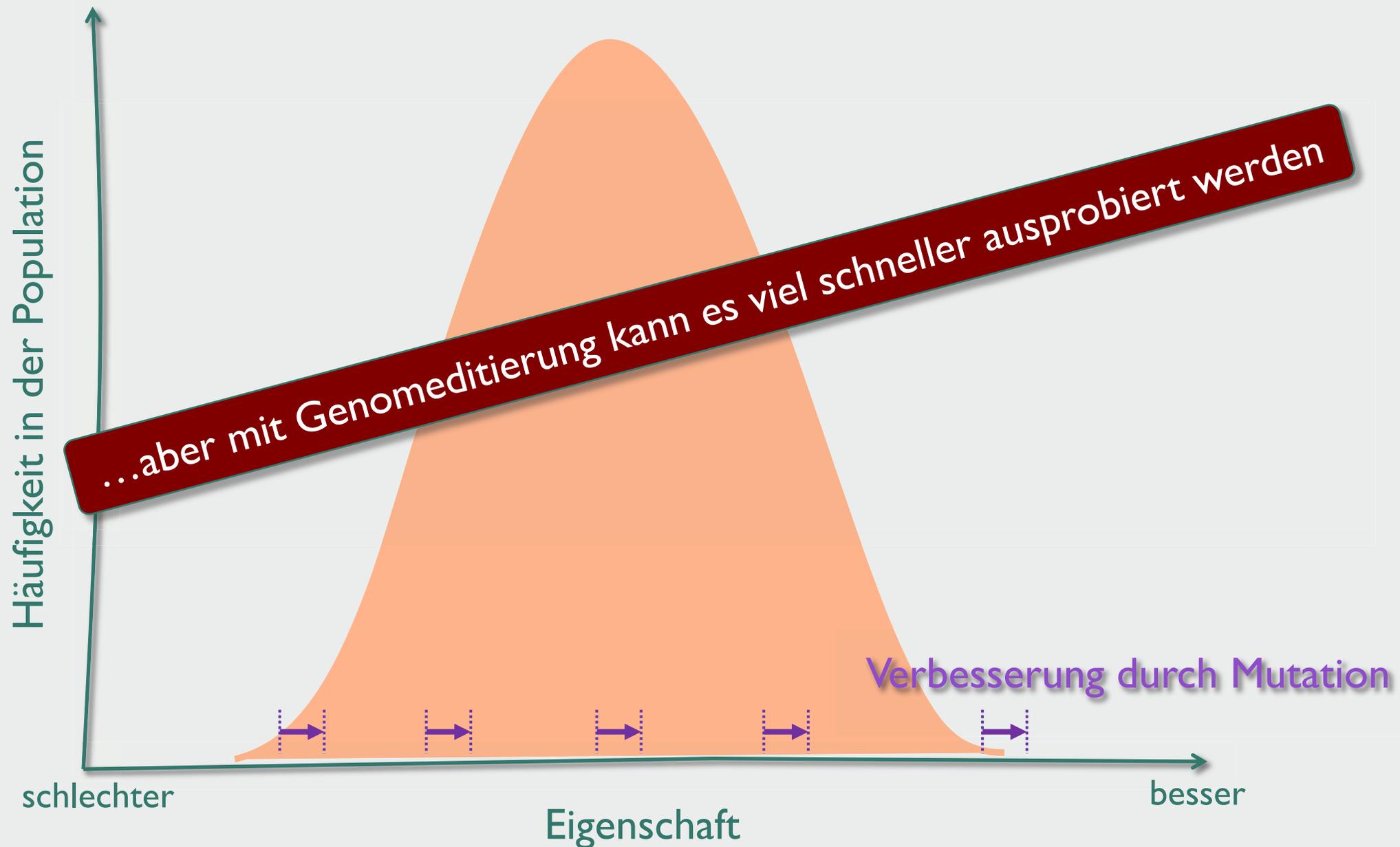
Insertion

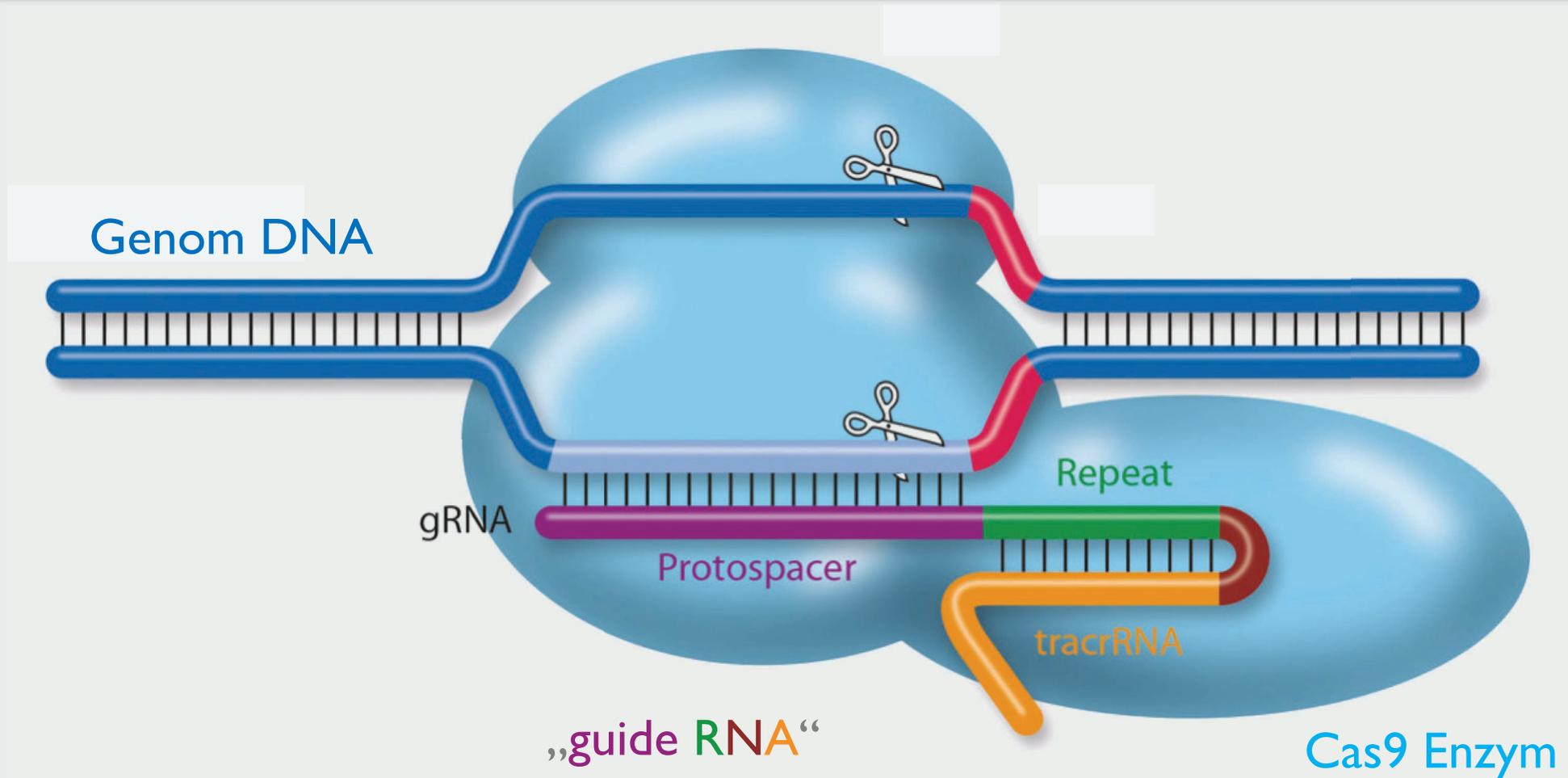
...GTCGAGTCTA **A**CGCTATCGCT...
...CAGCTCAGAT **C**GGCTATCGCT...

Substitution

Vergleich Konventionelle Züchtung / Genomeditierung







CRISPR/Cas9	1 bis wenige
Spontane Mutationen	Dutzende bis Hunderte
Chemische/ Röntgenmutagenese	Tausende

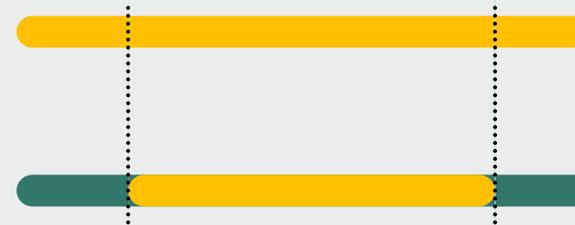


Punktmutationen



einfach

Austausch von Genvarianten



schwierig

Einsetzen neuer Gene



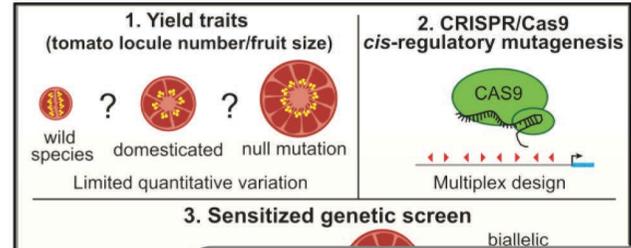
schwierig

Deletionen erlauben „fine tuning“ von Genaktivität



Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing

Graphical Abstract



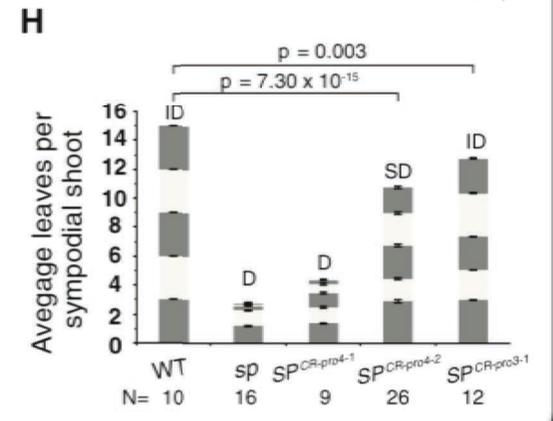
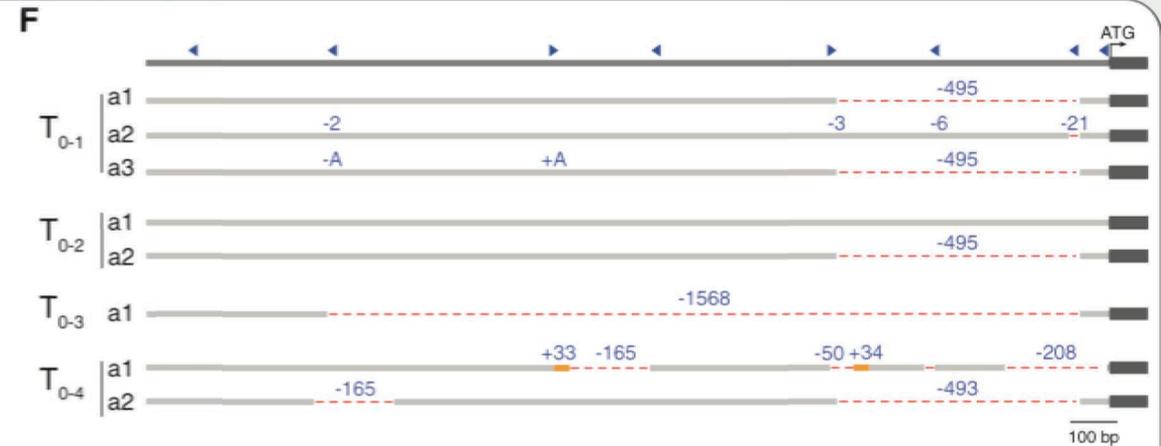
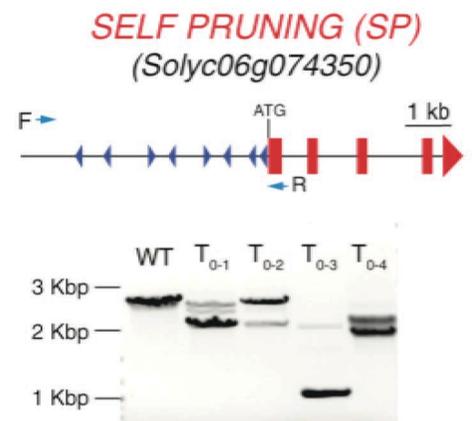
Authors

Daniel Rodríguez-Leal,
Zachary H. Lemmon, Jarrett Man,
Madeline E. Bartlett, Zachary B. Lippman

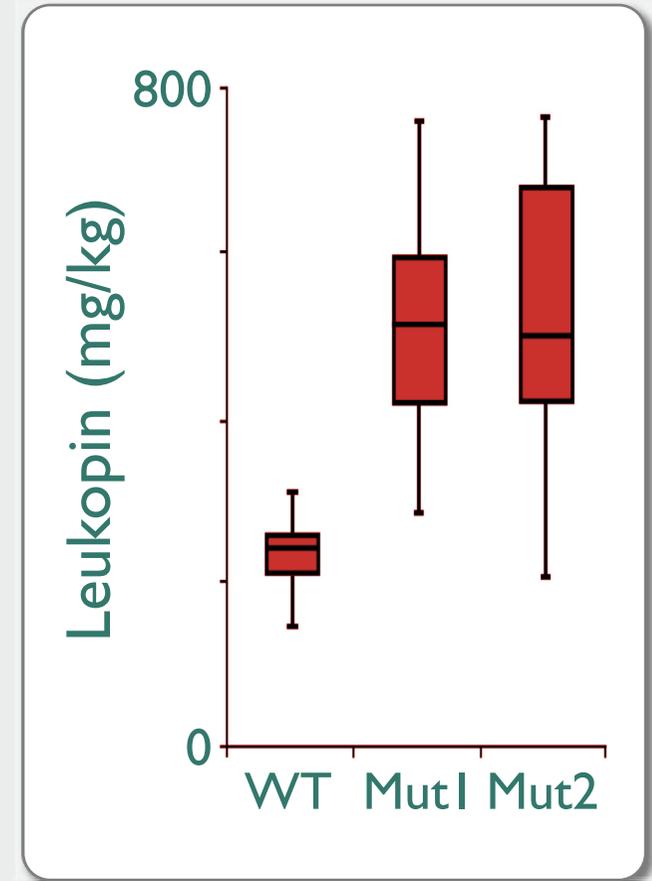
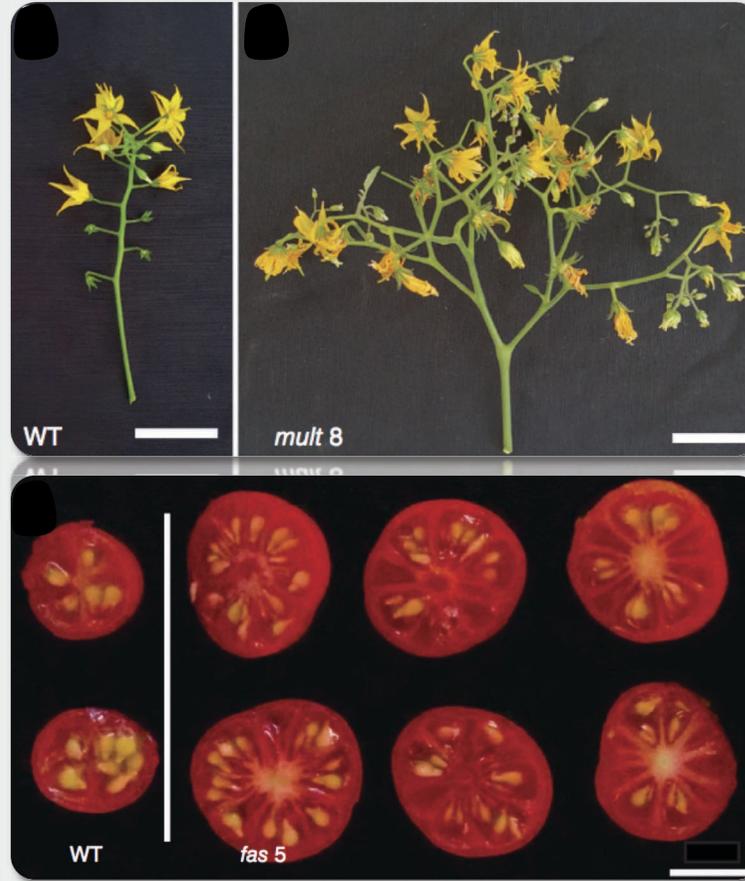
Correspondence

lippman@cschl.edu

In Brief



Wildtomate *Solanum pimpinellifolium*

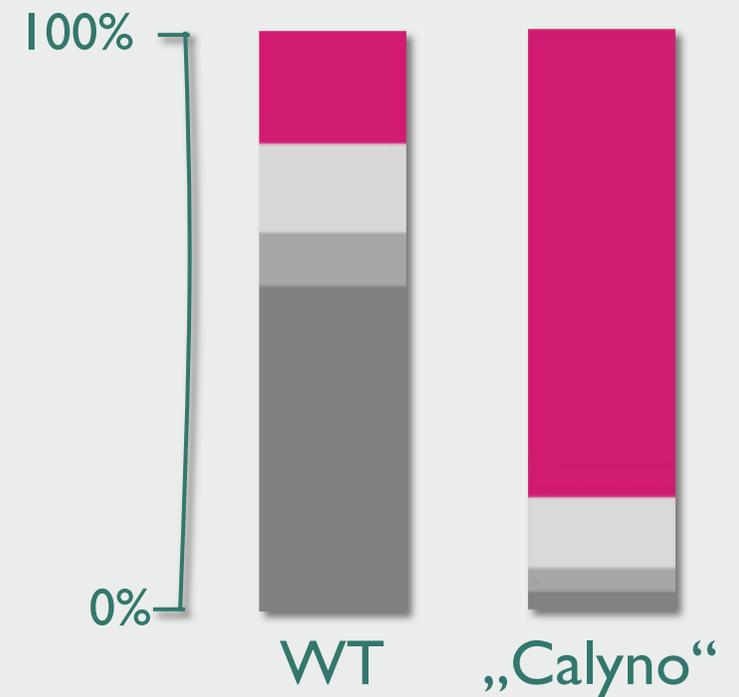


De novo domestication of wild tomato using genome editing

Nat. Biotech. 2018

Agustin Zsögön^{1,7}, Tomáš Čermák^{2,6,7}, Emmanuel Rezende Naves¹, Marcela Morato Notini³, Kai H Edel⁴, Stefan Weigl⁴, Luciano Freschi⁵, Daniel F Voytas², Jörg Kudla⁴ & Lázaro Eustáquio Pereira Peres³

Sojabohne

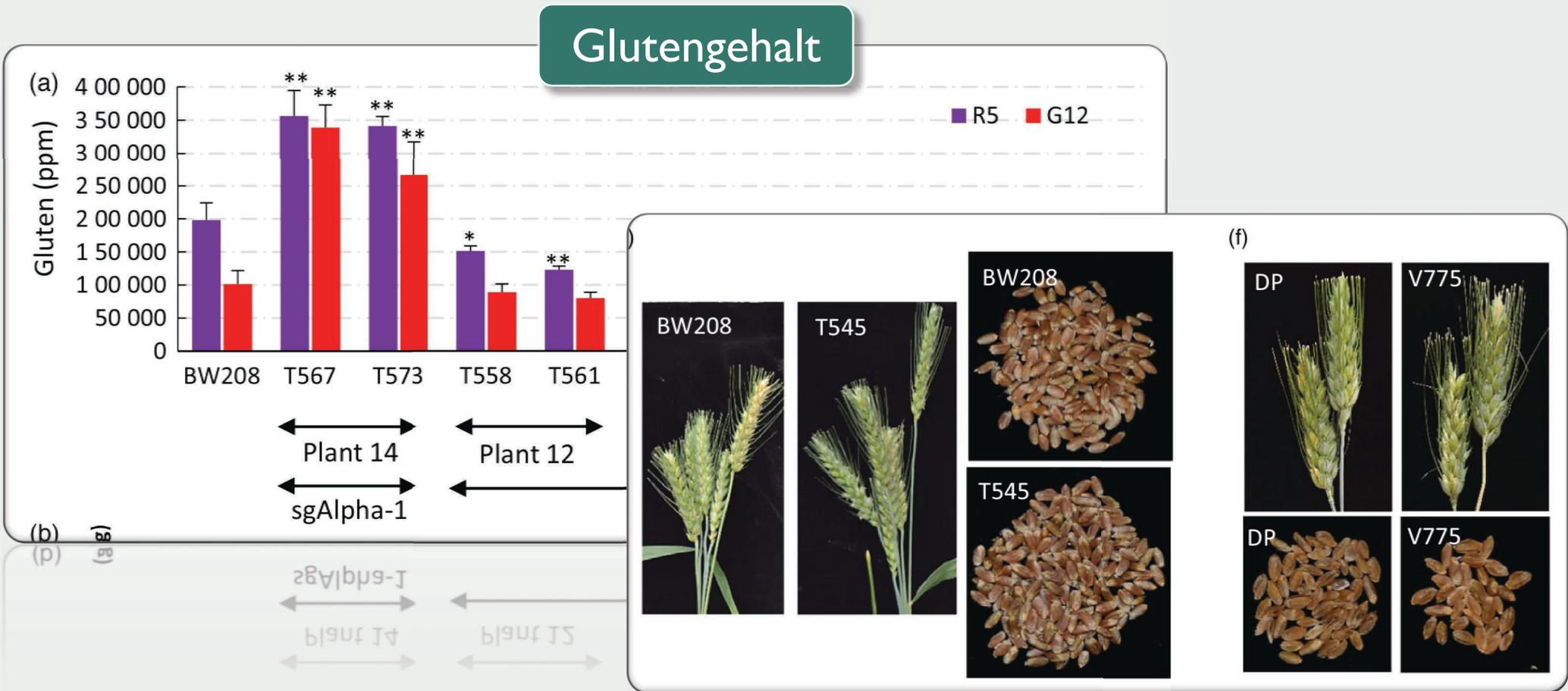


- Ölsäure
- Linolsäure
- Linolensäure
- Gesättigte Fettsäuren

Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 Plant Biotech. J., 2018

Susana Sánchez-León^{1,#}, Javier Gil-Humanes^{2,*,#}, Carmen V. Ozuna¹, María J. Giménez¹, Carolina Sousa³, Daniel F. Voytas² and Francisco Barro^{1,*}

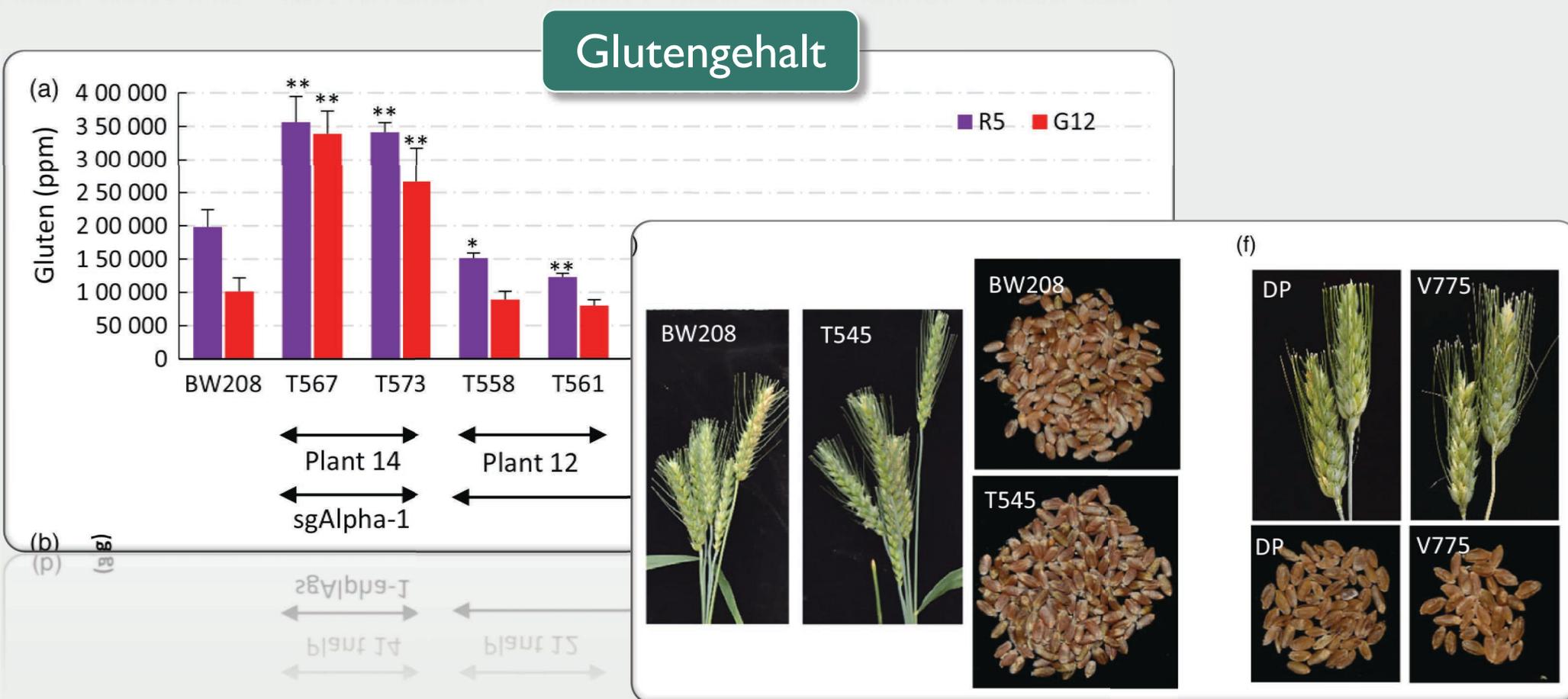
Daniel F. Voytas, and Francisco Barro, et al.



Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 Plant Biotech. J., 2018

Susana Sánchez-León^{1,#}, Javier Gil-Humanes^{2,*,#}, Carmen V. Ozuna¹, María J. Giménez¹, Carolina Sousa³, Daniel F. Voytas² and Francisco Barro^{1,*}

Daniel F. Voytas, and Francisco Barro, et al.

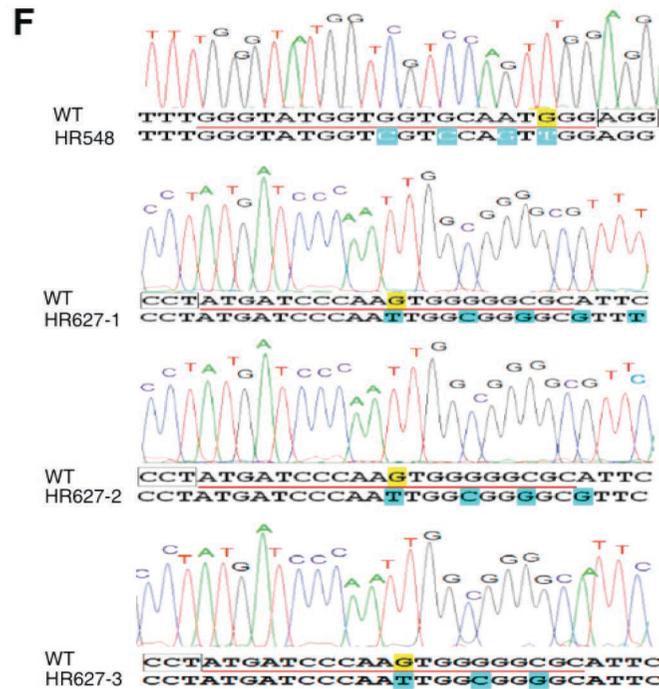


Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase

Dear Editor,

Genome editing technologies enable precise modifications of DNA sequences *in vivo* and offer great promise for crop improvement. CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short

donor. through particle bombardment (Supplemental Fig. 48L) even Sun et al., Mol. Plant 2016 demonstrating that this strategy works much less effie





Clearfield®



Mehr als nur reine Unkrautbekämpfung

Das Clearfield®-System

Das Clearfield®-Produktionssystem für Raps ist die Kombination aus einem hochwirksamen Clearfield®-Herbizid und den passenden Clearfield®-Rapssorten. Anders als herkömmliche Rapssorten sind Clearfield®-Sorten gegenüber dem Clearfield®-Wirkstoff Imazamox voll verträglich und garantieren ungestörtes Wachstum. Der Anbau von Clearfield®-Raps setzt auf Erfahrung und Innovation.

Eine kontinuierliche Weiterentwicklung des Clearfield®-Systems bietet dem Landwirt auch in Zukunft moderne Werkzeuge im Pflanzenschutz.

Mehr als nur Unkrautbekämpfung

Neben einer sicheren Unkraut- und Ungrasbekämpfung ermöglicht das Clearfield®-System optimale Bedingungen für eine perfekte, sortenreine Bestandesetablierung und Kulturführung ohne Konkurrenzdruck durch Altraps. Die hervorragende Herbizid-Verträglichkeit, auch gegenüber ALS-Rückständen aus der Vorfrucht, fördert eine rasche Jugendentwicklung, einhergehend mit ungestörtem Wurzelwachstum.

Dieser Vorteil des Clearfield®-Systems bietet somit auch mehr Flexibilität bei der Wahl des optimalen Aussaatzeitpunkts. Homogene Clearfield®-Bestände lassen sich leichter führen, sind ertragsstabil, reifen gleichmäßiger ab und sind letztendlich leichter und sauberer verlustfrei zu dreschen.



Infomaterial

[Clearfield® Produktbroschüre](#)

[Clearfield® Weißbuch](#)



Clearfield® Universal-Pack

Erfahren Sie mehr zu unserem Produkt.



RICHTLINIE 2001/18/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES

vom 12. März 2001

über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates

In
2.

ANHANG I B

VERFAHREN IM SINNE VON ARTIKEL 3

Verfahren/Methoden der genetischen Veränderung, aus denen Organismen hervorgehen, die von der Richtlinie auszuschließen sind, vorausgesetzt, es werden nur solche rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder genetisch veränderten Organismen verwendet, die in einem oder mehreren der folgenden Verfahren bzw. nach einer oder mehreren der folgenden Methoden hervorgegangen sind:

1. Mutagenese,
2. Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) von Pflanzenzellen von Organismen, die mittels herkömmlicher Züchtungstechniken genetisches Material austauschen können.

eine genetische Veränderung durch den Einsatz der in Anhang I B aufgeführten Verfahren herbeigeführt wurde.



RICHTLINIE 2001/18/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES

vom 12. März 2001

über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates

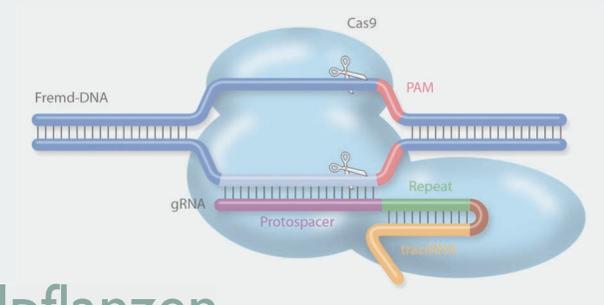
Mit seiner ersten Frage möchte das vorliegende Gericht zunächst wissen, ob Art. 2 Nr. 2 der Richtlinie 2001/18 dahin auszulegen ist, dass mit Verfahren/Methoden der Mutagenese gewonnene Organismen GVO im Sinne dieser Bestimmung darstellen. Sodann möchte es wissen, ob Art. 3 Abs. 1 der Richtlinie 2001/18 in Verbindung mit Nr. 1 ihres Anhangs I B und im Licht ihres 17. Erwägungsgrundes dahin auszulegen ist, dass solche Organismen nur dann vom Anwendungsbereich der Richtlinie ausgeschlossen sind, wenn sie mit Mutageneseverfahren gewonnen werden, die herkömmlich bei einer Reihe von Anwendungen angewandt wurden und seit langem als sicher gelten.

1. Mutagenese,

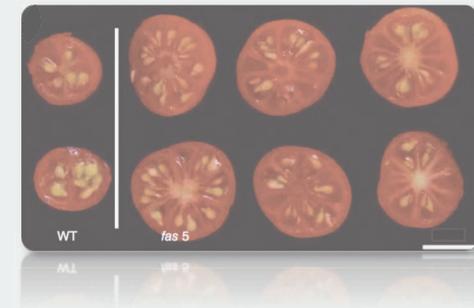
2. Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) von Pflanzenzellen von Organismen, die mittels herkömmlicher Züchtungstechniken genetisches Material austauschen können.

eine genetische Veränderung durch den Einsatz der in Anhang I B aufgeführten Verfahren herbeigeführt wurde.

- Schnellere Züchtung von etablierten Nutzpflanzen



- Schnelle Domestizierung und Verbesserung von Wildpflanzen



- Verbraucherfreundliche Sorten

- Manche Merkmale können unerwünschte Folgen haben



- Zugang zur Technologie ist teuer



