

# Het gebruik van **CRISPR-Cas** om “verborgen” **recessieve eigenschappen** tot uiting te brengen in **polyploide** gewassen



Arnaud Bovy

# TKI project

- Unlocking the hidden potential in polyploid crops: unmasking the value of favourable alleles using gene editing as a tool
  - Start: 1 January 2022
  - Projectduur: 4 jaar



# Introductie

- Aardbei genetica en veredeling:
  - Allo-octoploid: 4 diploide genomen die niet mixen en onafhankelijk van elkaar overerven
    - Tot 8 allelen per gen!
  - Uitkruisend gewas
  - Inteelt depressie
  - Selectie in F1 generatie
  - Vegetatieve vermeerdering via stek



# Recessieve genen

- Belangrijke agronomische eigenschappen worden bepaald door recessieve, “loss of function”, allelen:
  - Susceptibility genen
  - Vrucht grootte
  - Vrucht rijping (ethyleen biosynthese)
  - Kleur
  - Stevigheid: celwand afbraak genen
- Recessieve eigenschap komt alleen tot uiting in homozygote toestand



# In polyploide gewassen zijn deze recessieve eigenschappen “verborgen”

- Moeilijk om homozygote lijnen te verkrijgen
  - Zelf-incompatibiliteit
  - Inteelt depressie
  - Aantal allelen
- Welke genen (van een genfamilie) bepalen de recessieve eigenschap?
  - Welke allelen moeten we selecteren?

# Kansen voor gene editing!

- Gebruik CRISPR-Cas gene editing om KO mutanten te maken in target genen
  - KO van álle allelen: effect van een gen KO = gen functie
  - KO specifieke allelen: identificeren van functionele (dominante) of niet functionele (recessieve) allelen
- CRISPR-Cas gene editing maakt het mogelijk om de waarde van recessieve allelen te ontsluiten

# Doel van het TKI project

- Ontwikkelen van methodes om de “verborgen” eigenschappen van recessieve allelen in polyploide gewassen te kunnen bestuderen en te gebruiken d.m.v. gene editing
- Twee stappen:
  - KO van het hele gen
    - Welk gen bepaalt jouw recessieve eigenschap?
  - KO op allel niveau
    - Welke allelen moet je vóór en welke tegen selecteren?

# Waarom aardbei als model?

- Octoploid
- Genoom sequentie beschikbaar
- Gemakkelijk transformeerbare cultivar beschikbaar



# Belangrijkste eigenschappen in aardbei:

- Ziekte resistentie
- Houdbaarheid
  - Botrytis (Suzan Gabriels)
  - **Meeldauw**
  - **Stevigheid/kwetsbaarheid**
- Smaak



# Meeldauw resistentie

- Powdery mildew (*Podosphaera aphanis*)

- Blad en vrucht schimmelziekte
- Bestrijding met fungiciden



- Meeldauw resistentie

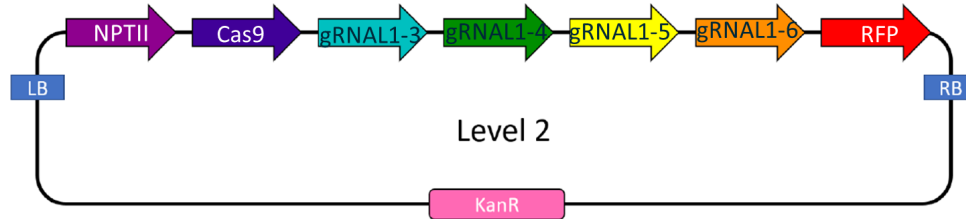
- *MLO* (mildew resistance locus O) is een familie van S-genen voor meeldauw
- In verschillende gewassen leiden “loss-of-function” mutaties tot resistentie tegen PM
- Pleiotrope effecten (versnelde veroudering, dwerggroei)

# *MLO* genen in aardbei

- 20 *MLO* genen in aardbei; max 8 allelen per gen
- Welke *MLO* genen moeten we editen?
  - Gen expressie: RNAseq data
  - Homologie met bekende *MLO* genen die fungeren als S genen
  - Literatuur in aardbei (Tapia et al 2021)
- **Focus op 3 *MLO* genen**

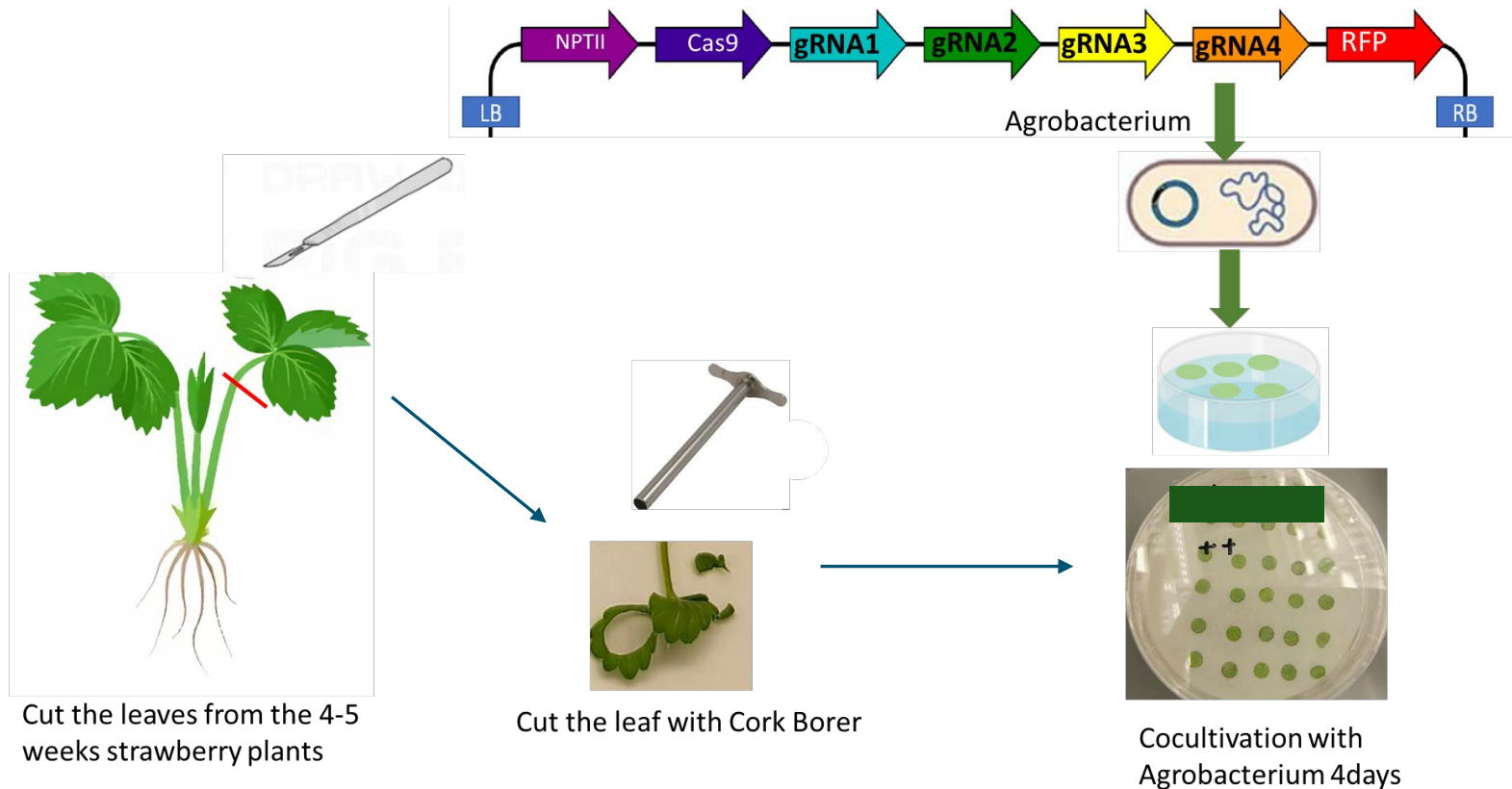
# Gen-specifieke gene editing

- CRISPR-Cas constructen met meerdere gRNAs in geconserveerde gebieden van de target genen
  - Sequentie alignment
  - gRNA design: 4 guides per gen
    - 1 gRNA kan alle 8 allelen editen



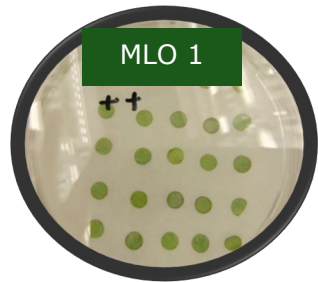
- Transformatie van een meeldauw-gevoelige aardbei selectie

# Aardbei transformatie



# Selectie van transgene planten

- Selectie: Km, RFP



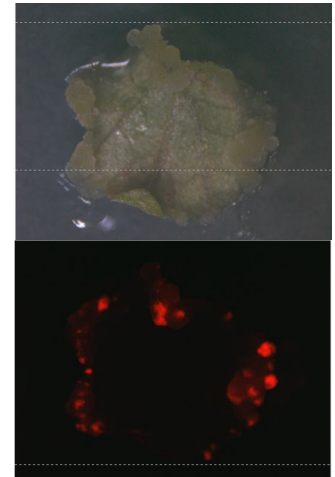
Dag 1



6 weken



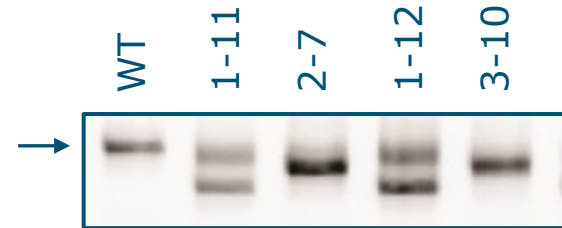
5 maanden



3 weken

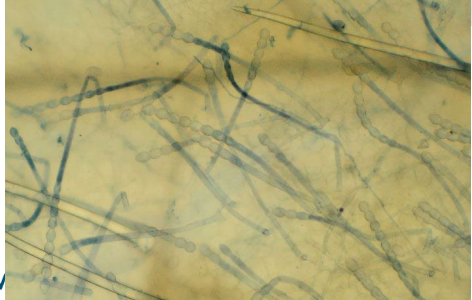
# Moleculaire analyse van transgene planten

- PCR: Km, Cas9, RFP (PCR)
- Mutaties in target genen:
  - PCR + gelelectroforese
  - Sequencen van alle target gen allelen: NGS (in progress)

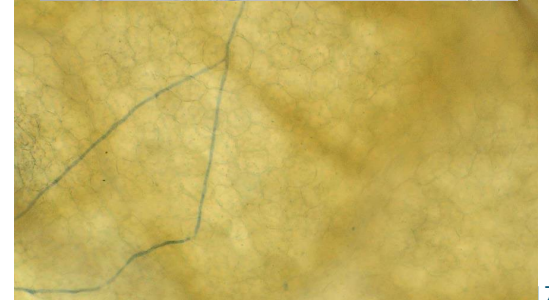
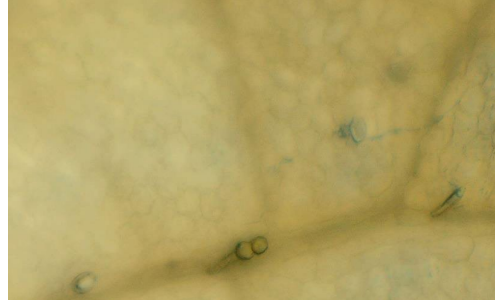


# Meeldauw ziekte toets op transgene planten

WT



MLO gene edited





# Samenvatting MLO gene editing

- Zeer efficiënte editing van MLO genen in transgene planten: 60-90%
  - Voor ieder MLO gen meerdere onafhankelijke meeldauw resistente planten!
- **Maar:**
- Planten zijn transgeen
  - Directe toepassing in veredeling heel moeilijk

# Transgen-vrije gene editing

- 1ste generatie: MLO mutanten met CRISPR-Cas construct in het genoom
- 2de generatie: MLO mutanten zonder inbouw CRISPR-Cas construct in het genoom
  - *Agrobacterium* transformatie van aardbei: CRISPR-Cas construct komt in de plant en kan *MLO* genen editen
  - Géén selectie op Km >> geen selectie voor integratie van CRISPR-Cas construct in het genoom
    - Construct verdwijnt weer zonder inbouw, maar mutaties blijven!
  - Selectie van transgen-vrije scheuten en MLO mutanten mbv moleculaire analyse

# Transgen-vrije gene editing

- $\approx 5\%$  van planten was ge-edit en transgen-vrij
- Voor ieder MLO gen transgen-vrije en meeldauw resistente planten
  - **Direct toepasbaar in veredeling als regelgeving versoepelt**



# Conclusies

- Efficiënte strategie voor gene editing in aardbei
  - Vereisten:
    - Goed trafo system
    - Kennis van de eigenschap en onderliggende genen
- KO van de 3 geselecteerde *MLO* genen leidt tot meeldauw resistentie in *in vitro* planten
  - Transgene en transgen-vrije mutanten
  - Directe toepassing in veredeling?

# Follow up experimenten

- Verdere karakterisering van de MLO mutanten
  - Sequencen van de allelen: welke mutaties in welke allelen
  - Meeldauw toetsen met planten in de kas
  - Pleiotrope effecten
- Allel-specifieke editing:
  - Welke allelen zijn wel/niet functioneel?
  - Welke allelen moeten we voor of tegen selecteren dmv MAS?

# Toepassing in veredeling

- Direct gebruik van de gene edited MLO mutanten als bron voor veredeling
  - Als regelgeving toelaat
- Gebruik van opgedane kennis in MAS
  - Nu al mogelijk op basis van sequentie en expressie informatie
  - Allel-specifieke editing helpt bij selectie van beste allelen
    - Meeldauw resistentie
    - Geen pleiotrope effecten

# Acknowledgements

- Yingjie Li
- Jan Schaart
- Gert van Arkel
- Betty Henken

