



UPPSALA
UNIVERSITET

Hur får vi potatis resistent mot *Phytophthora infestans*?

Josefin Pettersson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Hur får vi potatis resistent mot *Phytophthora infestans*?

Josefin Pettersson

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Globalt sett är potatis den fjärde viktigaste grödan som vi människor livnär oss på. Ett problem som potatisproduktionen måste handskas med är den parasiterande algsvampen, *Phytophthora infestans* som orsakar bladmögel och ger stor produktionsförlust. För att kunna producera all potatis och bekämpa algsvampen sker mycket besprutning med ämnen som kan vara skadliga. Ett alternativ till besprutning är att införa resistens mot bladmögel i potatis. Potatissorter resistenta mot bladmögel finns och den egenskapen kan hämtas från den resistenta sorten och inkorporeras i en potatis som inte är resistent. Skapandet av en resistent potatissort kan göras på olika sätt. Traditionell växtförädling för att skapa resistenta potatissorter görs genom att korsa två potatissorter, där en av de två har resistensgener. Genen för resistens kan också genom genmodifiering föras in i potatisens genom. Resistensgenen kan hämtas från samma art vid cisgen transformation eller från en annan vid transgen transformation. Trots att en potatissort har resistensgener mot bladmögel är motståndskraften inte nödvändigtvis varaktigt. Parasiten kan komma runt potatisens försvar och infektera hela växten. För hållbar bladmögelresistens ska flera resistensgener introduceras. Vid ytterligare åtgärder för att minska potatisens mottaglighet för infektion utförs förlust av funktionsmutation i växtcellernas gener för att hindra parasiten till att kunna utnyttja cellen för spridning.

Inledning

Potatis är vår fjärde viktigaste gröda och odlas i stor utsträckning över hela världen (Haverkort *et al.* 2008). För att kunna bibehålla den stora produktionen används rikligt med kemiska bekämpningsmedel (Foolad *et al.* 2008). Dessa ämnen är skadliga men samtidigt mycket givande för potatisproduktionen. De motverkar parasitangrepp som annars orsakar en sjukdom för potatis, förstör odlingar och orsakar skördebortfall. Med stor efterfrågan är det viktigt att produktionen kan leva upp till det som krävs. Mycket potatis ska kunna odlas och säljas. Efterfrågan på ekologisk potatis som inte är besprutad försvårar framställandet av potatis då den lättare blir infekterad av parasiterande organismer. Ett problem är att trots besprutning med pesticider säkras inte användandet ett försvar för potatisen. Det finns en risk för resistens (Zhao *et al.* 2003). Parasiten kan anpassas till att bli motståndskraftig mot bekämpningsmedlet och på så sätt kunna angripa potatisväxten trots aktivt handlande mot det. När användandet av bekämpningsmedel inte verkar, finns det då alternativ till besprutningen?

En stor del av den mat vi människor äter odlas kommersiellt. Det är många olika grödor som ska produceras i stora mängder för att kunna föda jordens ökande befolkning. Att producera så mycket mat är krävande. Det krävs mycket arbete för att klara av de många utmaningar som finns. Förhållandena för odling är inte alltid optimala. Det kan vara torka, näringsbrist eller parasitangrepp. Mycket resurser krävs för att komma runt problemen då de kan vara förödande och ge ett stort bortfall vid produktionen. Parasitangrepp var orsaken till en mycket stor svält på 1840-talet i Irland. Svälten ledde till att många dog eller emigrerade (Zadoks 2008). Orsaken var att nästan all potatisskörd som befolkningen livnärde sig på var förstörd. Det som låg bakom denna förödande katastrof var en algsvamp (oomycet) vid namn *Phytophthora infestans*. *P. infestans* hindrar växten från att bilda någon potatis eller så får den knölnarna till att bara bli mycket små. I värsta fall får parasiten växten att till sist dö och den blir oanvändbar och oätlig. Där den infekterade potatisväxten tidigare var grön blir den istället

brun när den stegvis dör (Fawke *et al.* 2015), illustrerat i figur 1. Denna algsvamp var ett stort problem på 1800-talet och är det än idag. Skillnaden från nu och då är att idag kan vi hantera infektioner på ett bättre sätt. Oomyceten angriper och utgör problem även för andra släktingar inom Solanaceae som till exempel äggplanta (Foolad *et al.* 2008).



Figur 1. Potatisväxt infekterad av *P. infestans*. Från Howard F. Schwartz, Colorado State University, United States, med tillstånd från upphovsrättsinnehavaren.

Växtsjukdomen som *P. infestans* orsakar kallas bladmögel eller brunröta. Infektion av parasiten minskar den effektivitet som hade kunnat finnas i potatisproduktionen. Resistens mot åkomman hade varit mycket gynnsamt. Det finns vild-typer av potatis som är resistent mot bladmögel. Många av de resistensgener som finns hittas i de mexikanska naturligt förekommande resistent potatissorterna (Foolad *et al.* 2008). Egenskapen kan uppkomma spontant i naturen utan någon nödvändig mänsklig påverkan. Om man vill ha nya resistent sorter går det mycket snabbare att inducera mutationen på ett laboratorium. Genom att utnyttja att det redan finns resistens hos andra sorter kan man ta de generna och sätta in de i den sort som saknar resistens. Det finns redan flera resistent potatissorter som skapats på sådant vis. Detta sättet har även används på många andra arter av grödor som majs och sojaböner för att skapa resistent sorter som finns kommersiellt odlade, tillgängliga för konsumenten. Växtförädling är en metod vi använder oss av för att anpassa och förbättra växter efter hur vi vill ha dem. Vi kan få grödor att innehålla mer näring, ha en annan färg eller bli mer tåliga och på så sätt kunna öka produktionen. Genom att ändra organismers genetiska material har grödor fått nya egenskaper och hänvisas då till som GM-grödor (genmodifierade). Odlandet av dessa GM-grödor har i allmänhet ökat med åren (James 2007). Skapandet och användandet av GM-produkter är mycket strikt reglerat i EU (Jacobsen & Schouten 2008). Idag brukas genmodifierade grödor i 27 länder (James 2013) De egenskaper man vill ha kan hittas hos andra varianter inom arten eller utom arten. Vid klassisk växtförädling är endast gener av korsningsbara sorter tillgängliga. I fallet med potatisens resistens mot bladmögel är inte klassisk växtförädling effektiv i längden. Anledningen är att

det tar lång tid att framställa en ny resistent växtsort och att parasiten snabbt hinner anpassa sig till den (Jacobsen & Schouten 2009). Det gör att den nya resistent potatissorten som skapats, kort efter dess uppkomst inte längre är motståndskraftig mot parasiten och en ny resistent potatissort behöver skapas. Under tiden att den nya resistent potatissorten skapas saknas motståndskraftiga potatisar och bekämpningsmedel måste användas om parasiten ska hindras från att infektera potatisodlingar.

Med resistent grödor ges möjligheten att undvika pesticider och på så sätt spara mycket pengar och arbete (Haverkort *et al.* 2009). Utan behovet av att sprida bekämpningsmedel med traktor besparas också traktorns koldioxidutsläpp till atmosfären. Bekämpning brukar ske flera gånger per år, och det förekommer att vissa odlingar besprutas nästan varje vecka (Haverkort *et al.* 2008). Odlingar besprutas både innan sjukdomen utbrutit i förebyggande syfte, och när den har brutit ut (Foolad *et al.* 2008). Besprutning av växterna går inte alltid att förlita sig på för i vissa fall är oomyceten resistent mot bekämpningsmedlet metalaxyl (Lehtinen *et al.* 2008). Utspridd i miljön, är fungiciden skadlig för både människans hälsa och miljön. De resistent potatissorterna gör att utspridandet av fungiciden inte behöver ske med sin påverkan på ekonomin och miljön (Foolad *et al.* 2008). Resistensen mot bladmögel skulle ge mycket i längden beträffande de resurser som sparas. På lång sikt är odlandet av potatis som är resistent mot bladmögel mer hållbart än att behöva sprida ut bekämpningsmedel flera gånger (Chandel *et al.* 2015).

Genom mutationer ges variation. Växtförädling genom att introducera mutationer för att ge en förändrad egenskap hos organismen kan göras på ett antal olika sätt. När man går djupare och undersöker vad gäller skapandet av potatis som är resistent mot *P. infestans* finns även där olika metoder. Bladmögelresistens kan introduceras genom att exempelvis hämta resistensgener från olika organismer, sammansmälta protoplaster eller mutera gener. Det leder till en frågeställning om hur det går till när en potatissort som är motståndskraftig mot *P. infestans*-infektion skapas.

Hur introduceras hållbar resistens mot *Phytophthora infestans* hos potatis?

Bakgrund

Potatis, *Solanum tuberosum* är knölar som växer under jorden och har funnits med i jordbruket i Europa i över 400 år (Zadoks 2008). Det är den fjärde viktigaste grödan, som handelsvara i världen (Haverkort *et al.* 2008). Från början kommer potatisen från Central- och Sydamerika och har sedan av människan följt med och spridits bland annat hit till nordn. Den potatis som vi har här nu är annorlunda från den vilda som finns i Amerika (Zadoks 2008). De olika potatissorterna har förädlats och skiljer sig åt. Potatis är en global matvara och odlas för produktion av produkter som chips, men också för dess stärkelse och egenskap som foder (Friedman *et al.* 1997). Den kommersiella potatisen är tetraploid men vild-typer är diploida. På grund av de två olika ploiditeterna går det inte att korsa kommersiell potatis med en vild-typ genom vanlig sexuell reproduktion eftersom de är icke-kompatibla (Barrell *et al.* 2013). För att bringa en egenskap som resistens mot bladmögel från en vild-typ till en kommersiell potatissort krävs först en del bearbetning av det genetiska materialet innan det kan inkorporeras i potatisens genom (Krenek *et al.* 2015).

Phytophthora-patogener är oomyceter som finns i flera former och angriper flera olika växtarter än potatis. De skapar stor skada på odlingar och kan orsaka kostsamma förluster (Haverkort *et al.* 2009). Patogenens levnadscykel har både en asexuell och sexuell

reproduktion (Lehtinen *et al.* 2008). I dess asexuella levnadscykeln sprider den ut luftburna sporer för att föröka sig. De sporer som skickats ut i luften landar sedan och sätter sig först på en del av bladen på potatisväxtens ovanliggande varifrån den sprider sig snabbt från cell till cell i växten. För att den ska kunna infektera växten måste den ta sig runt potatisväxtens försvar. Den måste först kunna tränga sig igenom cellväggen hos de celler som den är på väg att infektera. Sedan får den växten att ruttna genom att åstadkomma vävnadsdöd i området som infekterats, och till sist får den hela växten att dö (Foolad *et al.* 2008, Fawke *et al.* 2015). Den sexuella reproduktionscykeln avser parning mellan de två parningstyperna av arten, A1 och A2. Närvaron av två parningstyper möjliggör större variation hos parasiten som ökar dess anpassningsförmåga (Flier *et al.* 2003). Förhållandet mellan antalet av oomycetens två parningstyper är en del av det som avgör dess förekomst i olika områden. Finns det färre av den ena kan bristen av den parningstypen begränsa parningen. Patogenens möjlighet till inverkan på odlingen varierar med väderförhållandena för det året. De år och perioder då det är svalare och mer fuktigt frodas parasiten som mest (Foolad *et al.* 2008)

Algsvampen kan vara svår att upptäcka och under den tid det tar att upptäcka den och göra något åt saken har den hunnit sprida sig vidare och infekterat ännu fler växter. Eftersom den sprids snabbt när den har släppt ut sina sporer tar parasiten snabbt över en odling. Som sporer kan de under vintern klara svåra förhållanden och komma igen året därefter (Foolad *et al.* 2008, Widmark 2010), vilket gör det svårare att bli av med *P. infestans* från odlingsmarken. I Nederländerna är det obligatoriskt att avlägsna den infekterade bladen i en odling. Även all blast på andra potatisväxter på samma fält, trots att de inte är infekterade, måste förstöras när de växer i samma odling. Den dåvarande odlingen blir förstörd men det är en åtgärd för att skydda marken mot parasiten nästa odlingsäsong för att inte riskera spridning av oomyceten. Det leder till en förlust större än den som enbart infektionen i sig orsakar (Bueren *et al.* 2008).

Framställning av bladmögelresistens hos potatis

För att växterna ska kunna försvara sig behövs receptorer på utsidan av växtcellerna som känner igen patogenen. Försvaret fungerar med mönsterigenkännande receptorer (Sun *et al.* 2016). De kan känna igen patogenen på olika kännetecken, till exempel flagelin som indikerar flageller. För att komma runt det försvarssystemet använder sig patogenen av effektorer. Effektorer är proteiner som stör försvarssystemets signalvägar och gör i slutändan att patogenen inte angrips. Har cellen resistens finns det receptorer som känner igen effektorerna, och de effektorer som känns igen av potatisväxten kallas avirulensproteiner (AVR). De gener som är för resistens brukar hänvisas till som R-gener och i fallet med resistens mot *P. infestans* kallas resistensgenerna för Rpi-gener. Genprodukterna av Rpi-gener känner igen genprodukterna av AVR-gener. Flera resistensgeners genprodukter kan känna igen samma effektor (Vleeshouwers *et al.* 2008). Rpi-gener gör att de specifika effektorerna som hör till *P. infestans* känns igen, vilket leder till en hypersensitivitetsrespons. Igenkännandet startar en mekanism som hindrar vidare tillväxt av *P. infestans* genom att döda den infekterade cellen (van Poppel *et al.* 2009). Genom att kartlägga Rpi-gener mot bladmögel ges en uppfattning om de gener som finns. Med kartläggning menas sammanställning av information om de olika generna, som hur brett spektrum av effektorer som känns igen för bladmögelresistens av en gen. De gener som ger bredast spektrum i försvar mot bladmögel väljs ut och används vid växtförädling för att skapa bladmögelresistent potatis (Haverkort *et al.* 2016). Skapandet av GM-grödor kan vara dyrt men genom att utveckla användandet kan priserna sänkas och brukandet ökas (Haverkort *et al.* 2008). Flera potatissorter som fått resistens mot bladmögel, både genom cisgen genmodifiering och transgen genmodifiering är på en testnivå till att bli kommersiellt tillgängliga i Europa (Ricroch & Hénard-Damave 2016).

Traditionell växtförädling

Genetiskt inducerat försvar genom traditionell växtförädling utförs med endast de gener tillgängliga i den egna korsningsbara artens genpool. För att lägga till en egenskap till en annan potatissort som i det här fallet med resistens mot bladmögel, hämtas egenskapen från en besläktad vild-typ. På så sätt skapas flera sorter av potatis som är resistent mot bladmögel. Men det finns komplikationer. Introduktionen av resistens från vild-typer kräver bearbetning. Ett problem som uppstår är att när en gen förs över till den andra potatisvarianten följer flera andra gener med i överföringen som kan störa funktionen av genen av intresse (Jacobsen & Schouten 2008). För att undvika det krävs mycket bearbetning av donatorns genetiska information för att rena fram endast genen med egenskapen som är tänkt att användas. När genen av intresse är utsållad och den tas upp i ett genom är det slumpmässigt var i genomet genen hamnar. Det kan vara ett problem om genen placeras på ett sätt som gör att en annan gen mister sin funktion.

Transformation

Transformation är ett sätt att få en bakterie att ta upp främmande genetisk information. Främmande gener förs in i en ny organism och rekombination sker mellan det främmande DNA:t och organismens egna gener så att det nya DNA:t inkorporeras i bakteriens genom och skapar en genetisk förändring. Det kan ske naturligt eller med hjälp av en behandling, till exempel med kemikalier. Receptorer som sitter på utsidan av den mottagande cellen upptäcker det fria främmande DNA:t och ser till att det släpps in. När den genetiska informationen som kommer utifrån tagit sig in rekombineras den in med en homolog, motsvarande del i mottagarens genom. En vild-typ av potatis med resistens mot bladmögel som ofta brukar användas för transformationen är *Solanum bulbocastanum* (Bueren *et al.* 2008). Resistensgenen hänvisas till som RB-gen.

I praktiken

När transformation av R-gener till en potatissort har genomförts odlas den genmodifierade växten upp i växthus. Odlandet kan i det isolerade växthuset ske kontrollerat och på så sätt hindra mutantens spridande ut i naturen (Haverkort *et al.* 2008). I en isolerad miljö kan man också kontrollera olika förhållanden. Ett problem med de förhållanden som skapas för experimentet är att allt som finns ute i den naturliga miljön inte kan inkluderas. Det går inte att korrekt återskapa den verkliga miljön med alla faktorer i förhållanden som finns som kan påverka resultatet. Risken för spridning av patogenen gör experimenten till ett risktagande (Jacobsen & Schouten 2007). I brist på kontroll över vilka modifierade växter som växer fritt ute i naturen där de kan sprida sig, kan det leda till att balansen i ekosystemet störs. Är den modifierade växten anpassad till att klara av påfrestningar från miljön bättre kan den överleva längre och kan då utkonkurrera andra växter. Det kan leda till att andra växter dör ut och det i sin tur ger en minskad artdiversitet.

De regler som finns över hur användandet av genmodifiering får gå till är strikta (Jacobsen & Schouten 2008). Det är krav som måste uppfyllas och saker som måste tas hänsyn till. Situationen idag med de lagar som finns över användandet är att cisgen transformation bedöms som transgen transformation, trots skillnader i risker mellan de två olika metoderna. Enligt Haverkort med kollegor (2008) bör de nuvarande reglerna ses över och förnyas så att de anpassas mer efter olika möjliga metoder. Traditionell genmodifiering är i jämförelse inte lika strikt begränsat som andra typer av genmodifiering.

Fler gener- bra och dåligt

En gen för resistens är inte alltid tillräckligt för att uppehålla motståndskraften mot parasiten (Zhao *et al.* 2003). Utvecklar oomyceten ett försvar mot potatisens resistens, är potatisen inte längre resistent mot bladmögel. Ett sätt att säkra resistensen är att föra in flera Rpi-gener. Generna staplas, med flera resistensgener som uttrycks efter varann i potatisens genom (Jo *et al.* 2014). Flera olika gener för resistens bidrar till en varaktig resistens eftersom flera olika gener måste förändras för att potatisen ska kunna bli infekterad med bladmögel. Parasiten måste även anpassas på flera sätt för att komma runt resistensen som potatisen har mot den. Flera gener för resistens minskar betydelsen om Rpi-gener skulle muteras eftersom det fortfarande finns flera stycken andra resistensgener som kan uppehålla resistensen. Fler resistensgener breddar det spektrum av resistens potatisen har mot oomyceten och ger potatisväxten en stor fördel mot *P. infestans* angrepp. Innan den skapade sorten kan börja användas för kommersiell odling görs tester på den för att försäkra att det ger den fenotyp som förväntas och att inget annat har hänt som ger bieffekter (Jacobsen & Schouten 2008). Ett problem som kan uppstå när det sker korsningar med vild-typer är att egenskapen att producera glykoalkaloider kan finnas i den nya potatissorten. Glykoalkaloider är giftiga ämnen som potatisen kan innehålla och verkar som ett försvar. Konsumtion av dessa ämnen är skadligt för människor och andra djur då det orsakar sjukdomssymtom som illamående och i extremfall, död (Hansen 1925, Friedman *et al.* 1997). Därför bör mängden glykoalkaloider i potatis kontrolleras. För att potatis ska få odlas för kommersiellt bruk måste nivåerna av giftet vara under en viss gräns (Jacobsen & Schouten 2008).

Fördel med flera gener

En mutation hos effektorerna kan göra att parasiten inte känns igen och undkommer försvarssystemet. Det gör det svårare att erhålla en hållbar resistens om parasiten anpassas till potatisens försvarssystem. *P. infestans* har förmågan att förändras och är benägen till att göra det. Olika varianter av patogenen är olika mycket benägna till att anpassas efter potatisen och de mer snabbanpassade kan ses som aggressiva (Cooke *et al.* 2012). Den stora anpassningsförmågan gör att det blir svårare att få fram resistens som också är varaktig. Det sker en kapplöpning mellan *P. infestans* och potatis när de båda anpassas till varandras anpassningar (Haverkort *et al.* 2016). När resistens mot bladmögel introduceras hos en potatissort skulle en potatis med två resistensgener ha sina gener hela och verksamma längre än en potatis som bara har en Rpi-gen. Oomyceten kan anpassas och komma runt det försvar som den första resistensgenen utgör men då har mutanten med två resistensgener fortfarande en gen som är verksam kvar. Effekten av fler resistensgener gör att egenskapen på så sätt kan fungera på längre sikt. Trots att det finns flera gener för resistens kan ändå resistensen försvinna (Haverkort *et al.* 2016).

Protoplastfusion

När en gen av intresse, för resistens mot bladmögel finns hos en vild-typ som är diploid går det inte att föra över den genen genom att korsa vild-typen med den kommersiella tetraploida potatissorten direkt. Chandel och medförfattare (2015) har lyckas med att föra över resistensgener från en diploid potatis till en tetraploid genom att skapa hybrider och komma runt hindret med sexuell inkompatibilitet. De tog vild-typen *Solanum cardiophyllum* som har resistensgener mot bladmögel. Genom att korsa den diploida (2n) *S. cardiophyllum* med den dihaploida (2n) *Solanum tuberosum* C-13 skapade de en somatisk hybrid. Vid korsning sker en sammansmältning mellan cellernas protoplaster och både gener i cellkärnan och ute i cytoplasten utbyts. Protoplastfusion är ett vidgande från traditionell växtförädling för större utnyttjande av vild-typer och breddande av diversiteten. Av många gjorda fusioner var bara några somatiska hybrider sanna, som i det här fallet innebar att avkommorna var av båda

föräldrars gener och hade resistensgenen. För att säkerställa att hybriderna var sanna gjordes kontroller. En av kontrollerna gjordes genom RAPD-analys med slumpmässigt amplifierat polymorfiskt DNA. Primrar för sekvenser specifika för föräldrarna blandades med hybriderna och efter PCR separerades produkterna i en agarosgel (Chandel *et al.* 2015). De som hade två band hade en från vardera föräldern och var därför vid det steget en sann hybrid.

Cytoplasmatyp analyserades också med markörer med PCR och elektrofores för att sälla bort de sorter som är sterila. För att hybriderna ska vara kompatibla för traditionell korsning med den vanliga potatisen måste de ha samma ploiditet. Ploiditeten kontrollerades för att se till att hybriderna var tetraploid så att den kunde korsas med den vanliga tetraploida potatisen. Efter alla kontroller kan de sanna hybriderna korsas på traditionellt sätt med den kommersiella potatisen (Chandel *et al.* 2015). Med den här metoden minskas den nödvändiga bearbetningen av genen av intresse som annars kräver mer tid och arbete under traditionell transformation. Med protoplastfusion, precis som för traditionell transformation, finns problemet med att inget styr var R-genen sätts in efter korsning. I Sverige är användandet av protoplastfusion lagligt (Zeteo 2000).

Cisgen transformation

Med cisgen transformation sker korsning av hela gener från endast korsningsbara potatissorter. Här används cis-gener och till skillnad från intragener är de hela gener. Intragener är ihopsatta med olika delar från korsningsbara varianter av växten som ger nya kombinationer medan cis-gener är gener som funnits sedan tidigare och som skulle kunna föras över i en ny sort genom traditionell transformation utan människans påverkan. Cisgen transformation har samma gen-pool som traditionell och är ett sätt som är närmare traditionell växtförädling än transgen transformation och är därför också mer etiskt accepterat. Till skillnad från i traditionell transformation, tas bara den utvalda genen med i cisgen transformation, utan att några extra gener följer med i överföringen (Schouten *et al.* 2006). Tiden och arbetet som vid traditionell transformation behövde läggas till för att sortera fram endast genen av intresse sparas nu. Det är en markörfri metod som alltså inte använder sig av antibiotikaresistens som indikator. Markörerna i sig som används skulle göra metoden transgen för att de kommer från ej korsningsbara sorter (Jo *et al.* 2014). Kort sett utförs själva metoden av cisgen transformation genom att genen av intresse från donatorn först klonas. Den kan sen bearbetas och efter att genen inkorporerats i mottagaren selekteras de växter som tagit upp genen med minst bieffekter fram, baserat på deras tillväxt (Jacobsen & Schouten 2007).

Ett problem som finns med cisgen transformation är att när den utvalda genen ska tas upp i mottagarens DNA går det inte att bestämma var i genomet det händer (Jacobsen & Schouten 2008). Transformationen går alltså inte att kontrollera och en missgynnande placering kan leda till förlust av en annan gens funktion. Samma problem finns dock hos traditionell transformation och protoplastfusion. Något problem med glykoalkolider förväntas inte finnas vid transformation av cis-gener om de sorter som används visats vara säkra vid tidigare användning. På så sätt kan korsningar göras utan att ha lika stort behov av kontroller för att se om transformationen gått rätt till. Genom att ha kartlagt de möjliga glykoalkolidhalter som kan komma av produkten av transformationen går det att visa att alla nya möjliga potatisvarianter till större del har låga halter (Jacobsen & Schouten 2008). Cisgen transformation leder inte till några nya risker utöver de som finns med traditionell växtförädling.

Transgen transformation

Transgen transformation tillåter korsning av gener mellan olika arter som annars inte hade varit möjligt. Det breddar den genpool som med traditionell växtförädling bara inkluderar

gener från korsningsbara sorter. Den transgena genpoolen inkluderar utöver gener från andra ej korsningsbara växter, även gener från virus och bakterier. För potatis ingår gener för antibiotikaresistens som transgena gener. De generna som räknas med är både sekvenser som kodar och sådana som reglerar. För att ta fram de sorter som tagit upp gener för resistens mot *P. infestans* används antibiotika- eller herbicidresistens som markör (Jo *et al.* 2014). När antibiotikaresistens används som markör är det vanligt att det är resistens mot Kanamycin som används för att avgöra om resistensgenen mot bladmögel inkorporerats i mottagarens genom (Jacobsen & Schouten 2007). Det finns även markörfria metoder som använder sig av PCR för transgen transformation (de Vetten *et al.* 2003). För att avgöra effektiviteten av transformationen kan gener för GFP (grönt fluorescerande protein) sättas in i genomet tillsammans med genen av intresse och sedan användas genom att mäta dess uttryck (Valkov *et al.* 2011). Inom jordbruk är det vanligare med GM-växter framställda genom transgen transformation än med de som tagits fram på det cisgena sättet (Jacobsen & Schouten 2008). Transgen transformation används till exempel till kommersiellt tillgänglig raps (Ricroch & Hénard-Damave 2016).

Agrobacterium tumefaciens-medierad transformation (ATMT)

Agrobacterium tumefaciens är en växtpatogen som angriper växter och inkorporerar sitt eget DNA i växtens genom. Den överför gener som är tumörinducerande (Ti). Genom att modifiera dessa gener kan man göra så att den inte längre skadar växten men fortfarande får särskilda gener överförda. Den egenskapen utnyttjas i metoden som kallas *A. tumefaciens*-medierad transformation (ATMT). Vektorer används till transformationen utan att bakteriens egna DNA inkorporeras (Covert *et al.* 2001). Till största del används ATMT för horisontell genöverföring vid transgen transformation. I försök för att föra in bladmögelresistensgener hos potatis av Haverkort *et al.* (2016) användes ATMT. Först valde de ut resistensgener för bladmögel med ett brett täckande spektrum. Resistensgenerna klonades i *Escherichia coli* i en vektor och fördes sedan över till *A. tumefaciens* som transformerade in Rpi-genen i potatis. ATMT är en metod som också används inom cisgen transformation på samma sätt förutom att genen av intresse kommer från samma art (Barrell *et al.* 2013). Användandet av *A. tumefaciens* är en patenterad metod. Det är ett sätt som går snabbare än traditionell transformation för att ge bladmögelresistens till potatis (Wendt *et al.* 2011).

Ensifer adhaerens-medierad transformation (EMT)

Ensifer adhaerens är en stam av en bakterie som har visat sig kunna mediera transformation av potatis som *A. tumefaciens*. Den är inte en växtpatogen till skillnad från *A. tumefaciens*. Bakterien har kunnat användas till att föra över RB-genen för resistens mot bladmögel hos potatis. Det här utgör ett alternativ till ATMT vid gentransformation inom växtförädling (Wendt *et al.* 2011). För överföring av gener för bladmögelresistens har *E. adhaerens* variant OV14 använts av Wendt *et al.* (2011) för dess effektivitet vid transformation hos potatis som alternativ. EMT är inte alltid lika snabbt som metoden med ATMT men det är ett alternativ om man inte har ett tillstånd mot patenten av ATMT. För att sälla ut lyckade transformationer används antibiotikaresistens som markör. För EMT med OV14 är effektiviteten av transformationen och sedan translationen av RB-genen signifikant och är därför en metod som kan anses som ett alternativ till ATMT då EMT är en väl fungerande metod (Wendt *et al.* 2011).

För att testa effektiviteten av transformation, kollar man på tillväxten av kallas (ansamling celler) med skott. Det är en skillnad i effektivitet vad gäller transformation mellan den som är gjord med transgener som tar hjälp av markörer och den med cisgener som inte gör det. Det finns även en skillnad i transformationseffektivitet mellan olika potatissorter (Jo *et al.* 2014).

Förlust av funktion

Ett alternativ till att ge potatisen resistensgener mot bladmögel som skydd, är att istället modifiera gener som gör cellerna mindre mottagliga till att bli infekterade. Det görs genom förlust av funktion-mutation på känslighetsgener (S-gener) som parasiten annars använder till sin vinning (Sun *et al.* 2016). Genom att tysta flera S-gener med reglerande RNAi har Sun med kollegor (2016) lyckats framkalla hållbar resistens mot bladmögel hos potatis. Av de 11 S-gener som fanns gjorde tystandet av sex av dem att mottagligheten av parasiten minskade. Tystandet av de andra fem S-generna gjorde att växten blev helt resistent. Ett problem med resistensmutationen i S-generna är att de ärvs recessivt (Sun *et al.* 2016). Forskarna menar också att eftersom mutation på S-gener för att nå resistens är ett nytt område finns det fortfarande mycket att utforska inom det. Flera försök måste göras för att ta reda på hur hållbar resistens mot bladmögel, den här metoden skapar.

Diskussion

Att växtförädling används inom jordbruket är något bra. Med de förbättringar som görs på grödor ökar produktionen samtidigt som bortfallet minskar. Potatis som kunnat bli resistent mot bladmögel, har precis som andra grödor en möjlighet att öka i produktion, även i behövande utvecklingsländer. Om grödan är resistent mot oomyceten krävs inte bekämpningsmedel i lika stor utsträckning. Användandet av motståndskraftiga potatissorter skulle vara bra för miljön när inte lika mycket giftiga ämnen släpps ut i samband med besprutning av bekämpningsmedel. Av de olika sätt som finns för att skapa denna resistent potatis finns det olika fördelar med de olika metoderna, som hur lång tid framställandet av den resistent potatisen tar.

Människan

Människan har krav på hur vi vill ha potatisen. Den ska ha en viss smak eller viss textur för att kunna tillagas lätt. Det räcker inte med att man har framställt en potatis som är resistent mot bladmögel. Den behöver leva upp till flera krav än resistens. Dessutom måste konsumenterna acceptera konceptet med att deras mat är genmodifierat.

Tid

Det tar olika lång tid att framställa potatis resistent mot bladmögel beroende på vilken metod som används. Utöver den tid som det tar att få fram en resistent potatis finns det även extraarbete med kontroller som att kolla hur varaktig egenskapen är över flera cykler. Bara att ta fram en bladmögelresistent potatissort genom cisgen transformation tar 3–4 år (Jo *et al.* 2014). När en resistent potatissort framställts bör den också vara långsiktigt hållbar och varaktig. En gen för resistens ger ofta inte en hållbar resistens och en ny variant av patogenen kan lätt besegra försvaret (Foolad *et al.* 2008).

Metoderna

Oavsett om det är traditionell, transgen eller cisgen transformation eller protoplastfusion som används ger användandet resistens. Det som gör att en metod föredras över en annan är snarare tiden framställandet av resistensen tar, hur mycket arbete som krävs och hur hållbar resistensen är. En kombination av dessa faktorer avgör hur användandet ser ut. En fråga som har stor betydelse över brukandet är hur lagarna för användandet av metoderna ser ut i världen. Cisgen och transgen transformation särskiljs inte vad gäller vilka regler som gäller för brukandet av de två metoderna trots att de skiljer sig åt. Det gör att cisgen modifiering klassas som transgen modifiering och begränsas på så sätt (Schouten *et al.* 2006). Med nya

utvecklade metoder för växtförädling som befinner sig etiskt mellan traditionell och transgen genmodifiering, anses det att reglerna bör uppdateras och anpassas efter detta (Haverkort *et al.* 2008). När reglerna uppdaterats kan metoderna för införandet av bladmögelresistens hos potatis fortsätta utvecklas med eventuellt mindre begränsningar.

Förlust av funktion-mutation i S-generna ger resistens mot bladmögel men utan R-gener. Att mutationer ska återgå och att *P. infestans* ska kunna infektera igen är inte lika troligt när det är förändringar i flera gener som har skett för att skapa resistensen. Eftersom egenskapen av muterade S-gener ärvs recessivt är den mindre trolig att bevaras genom flera generationer i jämförelse med resistens som utgörs av resistensgener.

Slutsats

Jag tror att en kombination av användandet av muterade S-gener och flera Rpi-gener ger den mest hållbara resistensen mot bladmögel hos potatis.

Genom att odla genetiskt modifierade potatissorter som har resistens mot bladmögel behöver inte kostsam besprutning med fungicider göras. Kostsam är också processen att få fram de resistent potatissorterna (Haverkort *et al.* 2009). Mycket pengar och arbete sparas i längden om de kommersiella potatissorterna är resistent mot bladmögel, speciellt om resistensen är hållbar.

Tack

Tack till mina granskare Ebyon Mohamud Hassan, Mariam Khammari och Linnéa Hamberg, samt min handledare Anna Larsson för er hjälp.

Referenser

- Barrell PJ, Meiyalaghan S, Jacobs JME, Conner AJ. 2013. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. *Plant Biotechnology Journal* 11: 907–920.
- Bueren ETL van, Tiemens-Hulscher M, Struik PC. 2008. Cisgenesis Does Not Solve the Late Blight Problem of Organic Potato Production: Alternative Breeding Strategies. *Potato Research* 51: 89.
- Chandel P, Tiwari JK, Ali N, Devi S, Sharma S, Sharma S, Luthra SK, Singh BP. 2015. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*, potential sources of late blight resistance breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 123: 579–589.
- Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, Grünwald NJ, Hein I, MacLean D, McNicol JW, Randall E, Oliva RF, Pel MA, Shaw DS, Squires JN, Taylor MC, Vleeshouwers VGAA, Birch PRJ, Lees AK, Kamoun S. 2012. Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. *PLOS Pathogens* 8: e1002940.
- Covert SF, Kapoor P, Lee M, Briley A, Nairn CJ. 2001. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research* 105: 259–264.
- de Vetten N, Wolters A-M, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology* 21: 439–442.
- Fawke S, Doumane M, Schornack S. 2015. Oomycete Interactions with Plants: Infection

- Strategies and Resistance Principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 263–280.
- Flier WG, van den Bosch GBM, Turkensteen LJ. 2003. Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 52: 326–337.
- Foolad MR, Merk HL, Ashrafi H. 2008. Genetics, Genomics and Breeding of Late Blight and Early Blight Resistance in Tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27: 75–107.
- Friedman M, McDonald GM, Filadelfi-Keszi PM. 1997. Potato Glycoalkaloids: Chemistry, Analysis, Safety, and Plant Physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16: 55–132.
- Hansen AA. 1925. Two Fatal Cases of Potato Poisoning. *Science* 61: 340–341.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz L a. P, Kessel GJT, Visser RGF, Vossen EAG van der. 2008. Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research* 51: 47–57.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Vossen JH, Visser RGF. 2016. Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project. *Potato Research* 59: 35–66.
- Haverkort AJ, Struik PC, Visser RGF, Jacobsen E. 2009. Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 52: 249–264.
- Jacobsen E, Schouten HJ. 2008. Cisgenesis, a New Tool for Traditional Plant Breeding, Should be Exempted from the Regulation on Genetically Modified Organisms in a Step by Step Approach. *Potato Research* 51: 75.
- Jacobsen E, Schouten HJ. 2009. Cisgenesis: an important sub-invention for traditional plant breeding companies. *Euphytica* 170: 235.
- Jacobsen E, Schouten HJ. 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology* 25: 219–223.
- Jo K-R, Kim C-J, Kim S-J, Kim T-Y, Bergervoet M, Jongsma MA, Visser RG, Jacobsen E, Vossen JH. 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology* 14: 50.
- Jochemsen H. 2008. An Ethical Assessment of Cisgenesis in Breeding Late Blight Resistant Potato. *Potato Research* 51: 59–73.
- Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Duskocilova A, Komis G, Samaj J. 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances* 33: 1024–1042.
- Lehtinen A, Hannukkala A, Andersson B, Hermansen A, Le VH, Nærstad R, Brurberg MB, Nielsen BJ, Hansen JG, Yuen J. 2008. Phenotypic variation in Nordic populations of *Phytophthora infestans* in 2003. *Plant Pathology* 57: 227–234.
- Ricroch AE, Hénard-Damave M-C. 2016. Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 675–690.
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO reports* 7: 750–753.
- Sun K, Wolters A-MA, Vossen JH, Rouwet ME, Loonen AEHM, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y. 2016. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Research* 25: 731–742.
- Valkov VT, Gargano D, Manna C, Formisano G, Dix PJ, Gray JC, Scotti N, Cardi T. 2011. High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences.

- Transgenic Research 20: 137–151.
- van Poppel PMJA, Huigen DJ, Govers F. 2009. Differential Recognition of Phytophthora infestans Races in Potato R4 Breeding Lines. *Phytopathology* 99: 1150–1155.
- Vleeshouwers VGAA, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh S-K, Wang M, Bouwmeester K, Vosman B, Visser RGF, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, Vossen EAGV der. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and Phytophthora Infestans Avirulence Genes. *PLOS ONE* 3: e2875.
- Wendt T, Doohan F, Mullins E. 2011. Production of Phytophthora infestans-resistant potato (*Solanum tuberosum*) utilising *Ensifer adhaerens* OV14. *Transgenic Research* 21: 567–578.
- Widmark A-K. 2010. The late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. WWW-dokument 2010-: <http://pub.epsilon.slu.se/2210/>. Hämtad 2017-03-02.
- Zadoks JC. 2008. The Potato Murrain on the European Continent and the Revolutions of 1848. *Potato Research* 51: 5–45.
- Zhao J-Z, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology* 21: 1493–1497.
- James. 2007. ISAAA Brief 37-2007 - Executive Summary > ISAAA.org. WWW-dokument: <http://www.isaaa.org/Resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.htm> l. Hämtad 2017-a-03-01.
- James. 2013. Executive Summary: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013 - ISAAA Brief 46-2013 | ISAAA.org. WWW-dokument: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/>. Hämtad 2017-b-03-05.
- Zeteo | Förordning (2000:271) om innesluten användning av genetiskt modifierade organismer. WWW-dokument: https://zeteo-wolterskluwer-se.ezproxy.its.uu.se/document/sfs6_sfs2000271?searchItemId=170305034816538458b3872cca4898984e7fe1f3b362ea!0000000001!sfs6_sfs2000271. Hämtad 2017-c-03-05.

[Hur får vi potatis resistent mot *Phytophthora infestans*?]: etisk bilaga

Josefin Pettersson

Självständigt arbete i biologi 2015

Är det rätt att använda transgena gener för genmodifiering?

Transgena gener kommer från andra icke korsningsbara arter (Jacobsen & Schouten 2008). De gener som inkorporeras i den andra sortens genom hade inte kunnat inkorporerats på traditionellt sätt. Transgen transformation rör en större genpool än traditionell transformation, vilket ger fler möjligheter. Fördelar med transgen genmodifiering över traditionell finns men det finns också saker som talar emot. Är det rätt att använda transgena gener för genmodifiering?

Läget idag

Idag är situationen med hur genmodifiering får gå till reglerad av de regler som finns satta av EU. De regler som finns idag var satta för ett antal år sen. De som sattes är baserade på transgen genmodifiering (Jacobsen & Schouten 2008). Ur en etisk synvinkel är det mindre acceptabelt att föra över gener till en annan art än mellan nära besläktade organismer. Traditionell genmodifiering är mer accepterad för att den anses vara mer ”naturlig”. Dessa resonemang handlar om att människan inte ska göra för stora förändringar när vi inte kan förutse konsekvenserna vi skapar för naturen.

För- och nackdelar

Användandet av transgena gener kan både ses som något bra eller dåligt (Jochemsen 2008). Den transgena tekniken kan användas till många goda ändamål men det finns även saker som talar emot användandet.

För transgen genmodifiering

Transgen genmodifiering utförs för att förbättra. Det kan ge en växt egenskaper som patogenresistens mot algsvampen *Phytophthora infestans* som orsakar bladmögel. Det minskar behovet av resurser som annars används vid bekämpning. Tillgången på flera gener möjliggör de egenskaper som annars kanske inte hade varit tillgängliga. Med det redskapet kan man skapa många nya sorters organismer med anpassade egenskaper för att klara av olika utmaningar för organismens överlevnad. I jämförelse med traditionell genmodifiering är transgen transformation mer kontrollerat vad gäller produkterna som kontrolleras med antibiotikaresistens som markör.

Mot transgen genmodifiering

Vid insättning av gener är det slumpmässigt var i genomet de nya generna sätts in vid transgen genmodifiering, men det samma gäller för traditionell transformation. I etisk argumentation mot genmodifiering finns argumentet att vi människor inte ska lägga oss i och manipulera det som evolutionen selekterat fram. Det är inget argument specifikt mot transgen genmodifiering, utan i allmänhet. Men användandet av transgener innebär större möjligheter eftersom det ger alternativ som annars inte hade funnits. En risk som är större hos transgen transformation är utkonkurrerandet som den framställda organismen kan orsaka om den sprids. Om modifieringen var gynnsam för organismen ökar dess överlevnadsförmåga och den utgör då större konkurrens. Om modifieringen istället är något som gynnar oss människor och inte organismens överlevnad är dock inte spridning av den ett större problem för balansen i ekosystemen.

Slutsats

Trots risker med transgen genmodifiering är resultatet av användandet av metoden mycket givande. Eftersom fördelen med användandet är mycket givande och riskerna kan minskas kan fördelarna anses väga upp. Användandet av transgener kan därför bedömas som acceptabelt.

Referenser

- Jacobsen E, Schouten HJ. 2008. Cisgenesis, a New Tool for Traditional Plant Breeding, Should be Exempted from the Regulation on Genetically Modified Organisms in a Step by Step Approach. *Potato Research* 51: 75.
- Jochemsen H. 2008. An Ethical Assessment of Cisgenesis in Breeding Late Blight Resistant Potato. *Potato Research* 51: 59–73.