

DISS. ETH NO. 27805

**Field study to investigate consequences of the genetic
modification resulting in the fire blight resistant
cisgenic apple line C44.4.146**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

INA SCHLATHÖLTER

M.Sc. Biotechnology, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany

born on 09.07.1989

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruno Studer, examiner

Dr. Andrea Patocchi, co-examiner

Dr. Giovanni A. L. Broggini, co-examiner

Dr. Frans A. Krens, co-examiner

2021

Abstract

Apple is the third main produced fruit crop globally, with a production of around 87 million tons in 2019. Apple production relies on a few, mainly disease-susceptible, cultivars, which require the recurrent use of plant protection products during the growing season. One of the most devastating diseases in apple is fire blight, a bacterial disease caused by *Erwinia amylovora*. The management of fire blight produced estimated annual costs of more than US\$5 million in Switzerland between 1993 and 2013. The most effective and sustainable strategy to reduce yield losses caused by *E. amylovora* is the use of fire blight resistant cultivars. To achieve widespread success, resistant varieties must at least reach the quality level of cultivars currently available on the market. For this goal, breeders must face the challenges of apple's reproductive biology. The long juvenility phase and self-incompatibility of apple make the breeding and selection of new cultivars a long process. This is especially true for the introduction of resistance from wild apple material, where the most effective resistance genes have been identified so far.

Cisgenesis exploits genetic modification to transfer genes, including their own regulatory sequences, between sexually compatible plants. Thereby, it allows introducing a disease resistance gene from a wild apple in an established apple cultivar. While conventionally bred varieties always represent a novel genotype that needs to outcompete established cultivars with a superior combination of traits, cisgenic apple lines should resemble its untransformed cultivar except for the added trait. Therefore, cisgenesis could be the ideal tool to rapidly deploy disease resistances in apple production. However, the high regulatory requirements pose a challenge in the use of genetically modified crops in Europe. Although 30 years of research on genetically modified plants have not revealed any particular risks associated with the technology compared to conventionally bred plants, these regulatory requirements have not changed substantially. Nevertheless, each genetically modified apple line has the transferred gene integrated in a different location in the genome, which has the potential for a unique expression pattern and has to be evaluated case-by-case.

Therefore, the main goal of this work was to investigate the potential unintended effects of a cisgenic modification on apple in a multi-year field trial. The investigated cisgenic line C44.4.146 was derived from the fire blight susceptible cultivar 'Gala Galaxy' and was amended with the fire blight resistance gene *FB_MR5* which originated from the wild apple *Malus × robusta* 5. C44.4.146 carries a single copy of *FB_MR5* on chromosome 16 and was found to be resistant to fire blight when young shoots were inoculated with *E. amylovora*. This thesis describes the most extensive study aiming at the discovery of potential unintended effects of a cisgenic modification in apple. In addition, growing potted trees in the field allowed producing flowers that were inoculated with the pathogen in a quarantine greenhouse to assess if flowers of C44.4.146 were also resistant to fire blight.

In **Chapter 1** the importance of apple, the process and challenges of apple breeding, the current status of disease resistance breeding and applications of genetic modifications in apple are summarized.

Chapter 2 describes the establishment of the field trial and phenotypic assessments of the trees over five years. The design of the field trial gave a unique opportunity to compare trees and fruits of C44.4.146 to its untransformed wild type 'Gala Galaxy' as well as to 'Gala' and selected 'Gala' sports. Sports are spontaneous mutants of a cultivar. They derive from shoots in which one or more mutations in the meristem generated a new or modified phenotype. This phenotype is then maintained by grafting. In order to evaluate the extent of cisgenic modifications in C44.4.146, sports are ideal comparators, because they share the same genetic origin and maintain most of the characteristics of the original cultivar. In total 44 traits were investigated on tree- and fruit-level and two metabolome studies were carried out in two years. None of the assessed traits and no metabolite feature showed a significantly different expression pattern in C44.4.146 compared to its untransformed wild type and the 'Gala'-related genotypes in all years of investigation. In addition, the results showed that the *in vitro* cultivation of 'Gala Galaxy' introduced more evident changes than the genetic modification that led to C44.4.146. It was shown that the *in vitro* cultivation of 'Gala Galaxy' resulted in a disruption of a 'Gala Galaxy' fruit property, i.e., a

significantly reduced area of red over color of the fruits. This reduction in red over color was inherited by C44.4.146. Transient deviations of tree-related traits within the same genotype were also observed, which derived from different propagations before plantation. Finally, greenhouse experiments with field-grown trees confirmed that *FB_MR5* conferred fire blight resistance when the trees were inoculated through the flowers.

Chapter 3 investigates the molecular changes in C44.4.146 using a multi-omics approach, for generating RNA transcript, protein, and metabolite profiles of leaf material collected in the field. RNA transcript profiling was repeated after three years. The differences found in these profiles between C44.4.146 and its untransformed *in vitro* grown 'Gala Galaxy' were always within the range of differences found among 'Gala' and its sports. While no protein or metabolite feature were found to be differentially abundant, five and four genes showed a differential expression in C44.4.146 compared to the 'Gala'-related genotypes. Two out of these genes were identified in both years. As their gene function was mostly unknown, future experiments should investigate the function of these genes to see if the expression of these genes was modulated in a basal defense reaction caused by *FB_MR5* prior pathogen recognition or if it is a consequence of the transformation process.

Although the results of Chapters 2 and 3 found no clear risk associated to C44.4.146, two sensitive bioassays are described in **Chapter 4** and were performed to assess whether cisgenic leaf material from the field affects the fitness of two non-target soil arthropods. Arthropods are suitable for this risk assessment as they are an essential part of the soil ecosystem and sensitive to environmental contaminants. The study showed that leaf material of C44.4.146 did not affect the fitness of *Folsomia candida* or *Drosophila melanogaster* larvae. Additionally, the studies revealed that differences of the conventionally bred cultivar were greater than differences between the cisgenic line and its untransformed wild type or 'Gala' sports.

Finally, **Chapter 5** connects the extensive results from five years of phenotypical evaluations including metabolite profiles from fruits (Chapter 2), transcript, protein, and metabolite profiles from leaves (Chapter 3), as well as biosafety studies on leaf material (Chapter 4) to conclude that the cisgenic apple line C44.4.146 is not associated with higher alterations or risks than its *in vitro* cultured wild type or 'Gala' sports.

It was shown that *in vitro* culture and the mutations leading to 'Gala' sports can induce more evident differences than the cisgenic modification. Unlike genetically modified plants, tissue cultured plants and sports have not raised biosafety concerns, even though they have the potential to induce molecular and phenotypic alterations. This illustrates the unequal treatment of crops developed through genetic modification and supports that risk assessments should be adapted case-by-case to the plant and not be based on the technology used to generate it. The knowledge gained from the different approaches will be valuable in deciding how to setup future evaluations of cisgenic crops. Next to apple, other perennial, vegetatively propagated, and outcrossing fruit crops will benefit from this knowledge too. All in all, this extensive study on the unintended effects of a cisgenic modification in apple support the use of cisgenesis as complementary breeding tool for the development of improved cultivars.

Zusammenfassung

Der Apfel ist weltweit die dritt wichtigste Obstkultur mit einer Produktion von rund 87 Millionen Tonnen im Jahr 2019. Die Apfelproduktion beruht auf einigen wenigen, hauptsächlich krankheitsanfälligen Sorten, die einen wiederholten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln während der Anbausaison erfordern. Eine der verheerendsten Krankheiten beim Apfel ist Feuerbrand, eine bakterielle Krankheit, die durch *Erwinia amylovora* verursacht wird. Die Bekämpfung dieser Krankheit verursachte in der Schweiz zwischen 1993 und 2013 geschätzte jährliche Kosten von mehr als 5 Millionen US-Dollar. Die effektivste und nachhaltigste Strategie zur Verringerung des durch *E. amylovora* verursachten Schadens ist die Kultivierung von feuerbrandresistenten Sorten. Um auf breiter Front erfolgreich zu sein, sollten resistente Sorten mindestens dem Qualitätsniveau der gegenwärtig auf dem Markt angebotenen Sorten entsprechen. Dazu müssen sich Züchter den Herausforderungen der Reproduktionsbiologie des Apfels stellen. Die lange Juvenilitätsphase und die Selbstinkompatibilität des Apfels machen die Selektion von neuen Sorten zu einem zeitaufwändigen Prozess. Dies gilt vor allem für die Einführung von Resistenzen aus Wildapfelmaterial, in denen bisher die effektivsten Resistenzgene identifiziert wurden.

Die Cisgenese nutzt gentechnische Methoden, um Gene, einschliesslich der eigenen regulatorischen Sequenzen, zwischen sexuell kompatiblen Pflanzen zu übertragen. Dadurch ist es möglich, ein Resistenzgen aus einem Wildapfel in eine etablierte Apfelsorte einzuführen. Während konventionelle Züchtung immer zu einer neuen Sorte führt, die etablierte Sorten mit einer verbesserten Merkmalkombination übertreffen muss, sollten cisgene Apfelinien bis auf das hinzugefügte Merkmal der nicht transformierten Sorte entsprechen. Daher ist die Cisgenese das ideale Werkzeug, um Krankheitsresistenzen schnell in der Apfelproduktion einzubringen. Allerdings sind die hohen regulatorischen Anforderungen eine Herausforderung für den Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen in Europa. Obwohl in den vergangenen 30 Jahren der Forschung an gentechnisch veränderten Pflanzen keine besonderen Risiken im Vergleich zu konventionell gezüchteten Pflanzen festgestellt wurden, haben sich die regulatorischen Anforderungen nicht wesentlich geändert. Nichtsdestotrotz hat jede gentechnisch veränderte Apfelinie das übertragene Gen an einer anderen Stelle im Genom integriert, was ein einzigartiges Expressionsmuster zur Folge haben könnte und von Fall zu Fall bewertet werden muss.

Darum war das Hauptziel dieser Arbeit, die potenziellen unbeabsichtigten Effekte einer cisgenen Modifikation am Apfel in einem mehrjährigen Feldversuch zu untersuchen. Die verwendete cisgene Linie C44.4.146 entstand aus der feuerbrandanfälligen Sorte 'Gala Galaxy' und wurde mit dem Feuerbrandresistenzgen *FB_MR5* aus dem Wildapfel *Malus × robusta* 5 transformiert. C44.4.146 trägt eine einzelne Kopie von *FB_MR5* auf Chromosom 16 und zeigte Resistenz gegen Feuerbrand, wenn junge Triebe mit *E. amylovora* inokuliert wurden. Diese Arbeit beschreibt die umfangreichste Studie, die auf die Erforschung möglicher unbeabsichtigter Effekte einer cisgenen Modifikation im Apfel abzielt. Darüber hinaus konnten durch die Anzucht von Topfbäumen im Feld Blüten produziert werden, die im Quarantänegewächshaus mit dem Erreger inokuliert wurden, um festzustellen, ob die Blüten von C44.4.146 ebenfalls resistent gegen Feuerbrand sind.

Kapitel 1 fasst die Bedeutung des Apfels, der Prozess und die Herausforderungen der Apfelzüchtung, sowie der aktuelle Stand der Resistenzzüchtung und die Anwendungen von gentechnischen Veränderungen beim Apfel zusammen.

Kapitel 2 beschreibt die Erstellung des Feldversuchs und die phänotypischen Bonituren der Bäume über fünf Jahre. Das Design des Feldversuchs bot die einmalige Gelegenheit, Bäume und Früchte von C44.4.146 mit ihrem untransformierten Wildtyp 'Gala Galaxy' sowie mit 'Gala' und ausgewählten 'Gala' Mutanten (Sports) zu vergleichen. Sports sind natürliche, spontan auftretende Mutanten einer Sorte. Sie stammen von Sprossen ab, bei denen eine oder mehrere Mutationen im Meristem einen neuen oder modifizierten Phänotyp erzeugt haben. Dieser kann mittels Pfropfung erhalten werden. Um das Ausmaß der cisgenen Modifikationen bei C44.4.146 zu evaluieren, sind Sports ideale Vergleichssorten, da sie den gleichen genetischen Ursprung haben und die meisten Merkmale der ursprünglichen Sorte bewahren. Insgesamt wurden 44

Merkmale auf Baum- und Fruchtebene untersucht und zwei Metabolomstudien in zwei Jahren durchgeführt. Keines der untersuchten Merkmale und kein Metabolit zeigte in allen Untersuchungsjahren ein signifikant unterschiedliches Ausprägungsmuster bei C44.4.146 im Vergleich zum untransformierten Wildtyp und den 'Gala'-verwandten Genotypen. Darüber hinaus zeigten die Resultate, dass die *in vitro* Kultivierung von 'Gala Galaxy' zu deutlicheren Veränderungen führte als die genetische Modifikation in C44.4.146. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Kultivierung von 'Gala Galaxy' zu einer Veränderung einer Eigenschaft der 'Gala Galaxy'-Früchte führte, nämlich zu einem deutlich reduzierten Rotanteil der Deckfarbe der Früchte. Diese Reduktion der roten Deckfarbe wurde von C44.4.146 geerbt. Es wurden auch transiente Abweichungen von Baum-bezogenen Merkmalen innerhalb desselben Genotyps beobachtet, die auf unterschiedliche Vermehrungsprozesse vor der Pflanzung zurückzuführen sind. Schließlich bestätigten Gewächshausexperimente mit im Freiland angezogenen Bäumen, dass *FB_MR5* auch Feuerbrandresistenz verleiht, wenn die Bäume über die Blüten inokuliert werden.

In **Kapitel 3** wurden die molekularen Veränderungen bei C44.4.146 mit Hilfe eines Multi-omics-Ansatzes untersucht, um RNA-Transkript-, Protein- und Metabolitprofile von im Feld gesammeltem Blattmaterial zu erstellen. Die Analyse von RNA-Transkript-Profilen wurde nach drei Jahren wiederholt. Die Unterschiede, die in diesen Profilen zwischen C44.4.146 und der untransformierten, *in vitro* kultivierten 'Gala Galaxy' gefunden wurden, waren immer im Bereich der gefundenen Unterschiede zwischen 'Gala' und ihren Sports. Es wurden keine Proteine oder Metabolite gefunden, die differenziell abundant waren, aber fünf bzw. vier Gene zeigten eine differenzielle Expression in C44.4.146 im Vergleich zu den 'Gala'-verwandten Genotypen. Zwei dieser Gene wurden in beiden Jahren identifiziert. Da die Funktion dieser Gene größtenteils unbekannt ist, könnte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob ihre Expression durch eine basale Abwehrreaktion beeinflusst wurde, die durch *FB_MR5* vor der Erkennung des Pathogens ausgelöst wurde, oder ob sie eine Folge des Transformationsprozesses ist.

Obwohl die Ergebnisse der Kapitel 2 und 3 kein klar erkennbares Risiko in Verbindung mit C44.4.146 zeigten, wurden in **Kapitel 4** zwei sensitive Bioassays durchgeführt, mit denen bewertet wurde, ob cisgenes Blattmaterial aus dem Feld die Fitness von zwei Nicht-Ziel-Bodenarthropoden beeinflusst. Arthropoden sind für die Risikobewertung geeignet, da sie einen wesentlichen Teil des Bodenökosystems ausmachen und sensibel auf Umweltschadstoffe reagieren. Die Assays zeigten, dass Blattmaterial von C44.4.146 keinen Einfluss auf die Fitness von *Folsomia candida* oder *Drosophila melanogaster*-Larven hatte. Zusätzlich zeigten die Resultate, dass die Unterschiede der konventionell gezüchteten Sorte größer waren als die Unterschiede zwischen der cisgenen Linie und ihrem untransformierten Wildtyp bzw. 'Gala'-Sports.

Schließlich verbindet **Kapitel 5** die umfangreichen Ergebnisse aus fünf Jahren phänotypischer Bonituren, einschließlich Metabolitprofilen aus Früchten (Kapitel 2), Transkript-, Protein- und Metabolitprofilen aus Blättern (Kapitel 3) sowie Biosicherheitsstudien mit Blattmaterial (Kapitel 4), mit dem Ergebnis, dass die cisgene Apfellinie C44.4.146 nicht mit größeren Veränderungen oder Risiken verbunden ist als ihr *in vitro* kultivierter Wildtyp oder 'Gala' Sports. Es wurde gezeigt, dass die *in vitro* Kultur und die Mutationen, die zu 'Gala' Sports führen, deutlichere Unterschiede als die cisgene Modifikation hervorrufen können. Im Gegensatz zu gentechnisch veränderten Pflanzen bestehen bei *in vitro* kultivierten Pflanzen und Sports keine Bedenken hinsichtlich der biologischen Sicherheit, obwohl sie das Potenzial haben, molekulare und phänotypische Veränderungen zu generieren. Dies verdeutlicht die Ungleichbehandlung von Pflanzen, die durch gentechnische Veränderungen entwickelt wurden, und unterstreicht, dass Risikobewertungen fallspezifisch an die Pflanze angepasst und nicht anhand der Technologie, mit der sie erzeugt wurden, bewertet werden sollten. Die aus den unterschiedlichen Ansätzen gewonnenen Erkenntnisse werden wertvoll sein, um zu entscheiden, wie zukünftige Bewertungen von cisgenen Nutzpflanzen aufgebaut werden sollen. Neben Apfel werden auch andere mehrjährige, vegetativ vermehrte und sich auskreuzende Fruchtkulturen von diesem Wissen profitieren. Alles in allem unterstützt diese umfangreiche Studie über die unbeabsichtigten Effekte einer cisgenen Modifikation bei Apfel den Einsatz der Cisgenese als komplementäres Zuchtverfahren für die Entwicklung verbesserter Apfelsorten.