

Neue Strategien zur Erzeugung von haploiden Kulturpflanzen durch Verfahren der Genomeliminierung

New strategies for the development of haploid crop plants via genome elimination

Frank Dunemann

Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

E-Mail: frank.dunemann@julius-kuehn.de

Die für eine Hybridsortenzüchtung erforderlichen genetisch homogenen Elternlinien, deren genetische Kombination die erwünschten Hybridgenotypen ergibt, werden gegenwärtig durch zeitintensive erzwungene Selbstbefruchtung (Inzucht) oder alternativ durch In-vitro-Techniken wie z. B. der Mikrosporenkultur erstellt. Für die meisten Nutzpflanzen, darunter auch die Kulturmöhre (*Daucus carota*), ist eine brauchbare In-vitro-Haploidisierungstechnologie nicht vorhanden oder nur für eine begrenzte Auswahl von Genotypen nutzbar. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse bei der Modellpflanze Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) haben gezeigt, dass der Prozess der Chromosomeneliminierung genetisch induzier- und steuerbar ist. Hierzu wird das Histon-Protein CENH3 aus der Zentromerregion der Chromosomen genetisch so verändert, dass nach Kreuzung zweier Pflanzen der Chromosomensatz des modifizierten Elters im Verlauf der Embryonalentwicklung eliminiert wird. So genannte *Inducer*-Genotypen mit modifiziertem CENH3 werden als Kreuzungselter mit dem Ziel verwendet, den Chromoso-

mensatz des modifizierten Elters zu eliminieren. Um diese neue Haploidentechnik der Zentromer-vermittelten Genomeliminierung für die Möhren-Hybridzüchtung zu entwickeln, wurden zunächst das CENH3-Gen der Möhre und einer weit entfernt verwandten Art, dem Ginseng (*Panax ginseng*) kloniert. Zur Induktion von *Knockout*-Mutationen innerhalb des Möhren-CENH3-Gens wurde die *Genome Editing*-Technologie CRISPR/Cas9 eingesetzt. Ein auf *Agrobacterium rhizogenes* basierendes Ko-Transformationssystem wird eingesetzt, um eine Komplementation des mutierten Möhren-CENH3-Gens durch das artfremde Ginseng-Gen zu erreichen. Regenerierte T0-Pflanzen werden als Kreuzungselter eingesetzt, mit dem Ziel (doppel)haploide Genotypen zu generieren. Bei der alternativen 'Einschritt'-Methode werden mittels CRISPR/Cas9 verschiedene zielgerichtete Mutationen im nativen Möhren-CENH3-Gen induziert, die nicht letal sein dürfen, letztlich aber zu der erwünschten Eigenschaft der Haploiden-Induktion führen sollen.

The generation of haploids is one of the most powerful means to accelerate the plant breeding process. In most crop species, an efficient haploid technology is not yet available or only applicable to a limited set of genotypes. Based on recent results published for *Arabidopsis thaliana*, manipulating the centromeres of the chromosomes has been proposed as universal novel method for the production of haploid plants. By this way, haploids can be generated through manual cross-fertilizations after manipulating a single centromere protein, the centromere-specific histone H3 variant CENH3, in one of the parents designated as 'haploid inducer'. Crosses with haploid inducer genotypes result in karyotypically unstable embryo cells, which have lost one of the parent-specific chromosome sets. To lay a first foundation of a putative alternative haploidization strategy based on centromere-mediated genome elimination

in cultivated carrots, functional CENH3 genes of several *Daucus* species and ginseng (*Panax ginseng*) were cloned and cytogenetically analyzed. Since our aim was to knock-out and complement the endo-genous carrot CENH3, a co-transformation of a CRISPR/Cas9-based carrot CENH3 knockout construct together with the ginseng CENH3 gene was performed by using a wild type *Agrobacterium rhizogenes* strain. Molecular analyses of regenerated hairy roots and carrot plants have shown that CRISPR/Cas9-based modifications within the carrot CENH3 gene have been achieved in some transgenic lines, and that the over-expressed ginseng CENH3 gene is functionally active. Additionally, 'one-step' approaches based on targeted induction of mutations within the endogenous CENH3 gene through CRISPR/Cas9 are tested for their use to develop carrot haploid inducer genotypes.