

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

DOI 10.5073/jka.2017.457.007



Zusammenfassung

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. 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. Neuere 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 Chromosomensatz des modifizierten Elters zu eliminieren. Um diese neue Haploidentechnik der Zentromervermittelten 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-Transformationsystem 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 ‚Ein-Schritt‘-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.

Stichwörter: CENH3, *Daucus carota*, Doppel-Haploide (DH), Haploide, Möhre, Zentromer

Abstract

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 endogenous 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.

Keywords: carrot, CENH3, centromer, *Daucus carota*, double-haploids (DH), haploids

Einleitung

Die Erzeugung von Haploiden ist eine der wirksamsten Methoden, um den Züchtungsprozess zu beschleunigen. Traditionell werden die insbesondere für die F_1 -Hybridsortenzüchtung benötigten genetisch homogenen (homozygoten) Elternlinien durch Selbstbefruchtung – bei Fremdbefruchtern auch als Inzucht bekannt – erstellt. Dieser Prozess erfordert oft sechs, sieben oder sogar acht Generationen, was jedoch insbesondere bei zweijährigen Pflanzenarten wie z. B. der Möhre oder der Zuckerrübe ausgesprochen zeitaufwendig ist. Als eine Alternative zur herkömmlichen Inzuchtlinien-Herstellung wird die Erzeugung von doppelt-haploiden Pflanzen (DH-Linien) angesehen, deren Genom auf nur einem elterlichen Chromosomensatz basiert. Durch eine Verdoppelung des zunächst haploiden Genoms, welche durch eine Kolchizinbehandlung induziert werden kann, oft aber auch spontan erfolgt, können reinerbige DH-Linien hergestellt werden. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden eine Reihe von In-vitro-Techniken entwickelt und in der Pflanzenzüchtung eingesetzt, wie z. B. die Antheren- und Mikrosporenkultur oder aber die Nutzung der Entstehung Haploider aus mütterlichen Gameten durch Kultur von Samenanlagen und Eizellen. Eine Übersicht zu dieser Thematik ist z. B. bei DUNWELL et al. (2010) zu finden. Da die Möglichkeiten der Regeneration von haploiden Pflanzen sehr stark von der jeweiligen Pflanzenart und darüber hinaus auch oft vom Genotyp beeinflusst werden, sind reine In-vitro-Methoden meist nicht sehr effektiv. Eine *in situ*-Induktion von Haploiden mütterlicher Herkunft kann in manchen Fällen auch durch Bestäubung mit bestrahltem Pollen der gleichen Spezies erfolgen. MUROVEC und BOHANEK (2012) listen eine Reihe von Arten auf, darunter auch die Zierpflanzen Nelken, Rosen und Petunien, bei denen, meist unter Zuhilfenahme von in-vitro-basierten ‚embryo rescue‘-Techniken, die Erzeugung Haploider erfolgreich war. Mais (*Zea mays*) stellt insofern eine Besonderheit dar, dass hier auch intra-spezifische Kreuzungen mit speziellen Induktor-Genotypen zu maternalen Haploiden führen. Insbesondere sogenannte ‚Inducer-Linien‘, welche vom Mais-Genotyp ‚Stock 6‘ abgeleitet wurden, haben bei Mais die moderne DH-Linien-basierte Hybridzüchtung erst möglich gemacht (PRIGGE und MELCHINGER, 2012). ‚Weite Kreuzungen‘ zwischen verschiedenen Arten einer Gattung haben sich vor allem bei einigen Getreidearten als eine sehr effektive Methode der Haploidengewinnung erwiesen. Seit längerem ist bekannt, dass bei Kreuzung verwandter Arten eine spontane Eliminierung eines kompletten elterlichen Chromosomensatzes erfolgen kann. Ein Beispiel hierfür ist die Kreuzung der Kulturgerste (*Hordeum vulgare*) mit der Wildart *H. bulbosum*, die auch unter dem Namen ‚Bulbosum-Technik‘ bekannt ist. Neuere wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass bei der Gerste die genetische Steuerung der uniparentalen Chromosomeneliminierung unter maßgeblicher Beteiligung des Histon-Proteins CENH3 aus der Zentromerregion der Chromosomen erfolgt (SANEI et al., 2011). Eine sehr ausführliche aktuelle Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten der Haploidentstehung als Folge von Chromosomeneliminierungen ist bei ISHII et al. (2016) zu finden.

Die Bedeutung des Zentromers für die Genomeliminierung

Das Zentromer ist ein unerlässlicher Bestandteil eines jeden eukaryotischen Chromosoms. Es handelt sich dabei um die Region eines Chromosoms, welche die Schwesterchromatiden zusammenhält und in der Meta- bzw. Anaphase der Mitose und Meiose als Ansatzpunkt für die Spindelfasern dient. Ursprünglich bezeichnete man als Zentromer den Bereich der primären Konstriktion (Einschnürungsstelle) eines Metaphase-Chromosoms. An Proteinkomplexen des Zentromers (Kinetochor) setzen die Mikrotubuli-Fasern des Spindelapparates an, die die Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen ziehen. Der Verlust des Zentromers führt in der Regel zur Inaktivierung des Chromosoms und schließlich auch zu dessen Verlust (WANG et al., 2009). Die Verpackung der DNA innerhalb eukaryotischer Zellkerne erfolgt unter Beteiligung verschiedener Histon-Proteine, darunter auch das Histon H3. Das als kanonische Histon H3 bezeichnete Protein ist als Grundbaustein der Nukleosomen ein Hauptbestandteil des Chromatins. In den Nukleosomen der Zentromerregion ist das kanonische H3 durch eine spezielle Variante, dem zentromerischen Histon H3 (engl. CENH3) ersetzt. CENH3 ist typisch für funktionale Zentromere, d. h. es ist maßgeblich am Andocken des Spindelfaserapparates an das Kinetochor beteiligt. Die hierbei ablaufenden Prozesse sind zum Teil noch unerforscht.

CENH3 ist ein universelles Protein, welches in allen Eukaryonten vorkommt. Trotz erheblicher Unterschiede in Länge und Sequenz zeigt das CENH3-Protein einen erheblichen Grad an Konservierung hinsichtlich seiner Struktur und Funktion. Insbesondere die C-terminale Histon-Faltungsdomäne (HFD) ist bei höheren Pflanzen hochgradig konserviert. Insbesondere die als CATD bezeichnete Region der HFD scheint für die Erkennungsreaktionen zwischen Kinetochor und Spindelfasern eine besondere Rolle zu spielen. Ein Ausschalten der CENH3-Expression oder auch starke Überexpression führt zu schwerwiegenden Störungen beim Andocken des Spindelfaserapparates und damit zu erheblichen Problemen bei der Zellteilung bis hin zu massiven Wuchsstörungen oder gar Letalität (WATTS et al., 2016).

Die genetische Kontrolle der CENH3-Bildung erfolgt in vielen Fällen, so z. B. bei *Arabidopsis thaliana*, Reis (*Oryza sativa*) oder Mais, aber auch in *Drosophila*, Hefe (*Saccharomyces*) und auch beim Menschen durch ein einziges (single copy) CENH3-Gen (WATTS et al., 2016). Ausnahmen sind einige Leguminosen und *Brassica*-Arten. Während der letzten zehn Jahre wurde das CENH3-Gen in etwa einem Dutzend Pflanzenarten identifiziert und kloniert, darunter auch in der Kulturmöhre (DUNEMANN et al., 2014) und der entfernt verwandten Art *Panax ginseng* (DUNEMANN, unveröff.). Ein Vergleich der CENH3-Proteinsequenzen von *Daucus carota*, drei *Daucus*-Wildarten und dem Echten Ginseng ist in Abbildung 1 dargestellt. Bei fast identischer Proteinlänge unterscheidet sich der Ginseng von der Möhre an mehr als 30 Positionen in der Aminosäuresequenz, und dies vor allem im hypervariablen N-terminalen Bereich des CENH3-Proteins.

MARTKHPAKRSSGHRSRGPPLSGTPTRRSXA	SPREADAQGGQQRKPHRFKPGTVALREI	RFKFKTWNLLI	PAAPFI	RTVR	Majority		
10	20	30	40	50	60	70	80
MARTKHPAKRRTSGHRSRGPPLSGTPRRRS	TAIPREADAQGGQQRKPHRFKPGTVALREI	RFKFKTWNLLI	PAAPFI	RTVR	<i>Daucus carota</i>		
MARTKHPAKRSSGHRSRGPPLSGTPR	RSTASPREADAQGGQQRKPHRFKPGTVALREI	RFKFKTWNLLI	PAAPFI	RTVR	<i>Daucus muciculus</i>		
MARTKHPAKRSSGHRSRGPPLSGTPRTR	TASPREADAQGGQQRKPHRFKPGTVALREI	RFKFKTWNLLI	PAAPFI	RTVR	<i>Daucus pusillus</i>		
MARTKHPAKRSSGHRSRGPPLSGTPRTR	TASPREADAQGGQQRKPHRFKPGTVALREI	RFKFKTWNLLI	PAAPFI	RTVR	<i>Daucus gluchidatus</i>		
MARTKQIAKRSTGHRTAGSSS	TPTKRSGRNVVPIGEGGQTQRKAHRYR	PGTVALREI	RHFQKTWNLLI	PAAPFI	RTVR	<i>Panax ginseng</i>	
EIFSYLAPSI	TRWQAEALRAIQEAAEDFI	IHLFEDAMLC	AIHARRVTVMKKDWELARRL	GKKAQPW	Majority		
90	100	110	120	130	140		
EIFSYLAPSI	TRWQAEALRAIQEAAEDFI	IHLFEDAMLC	AIHARRVTVMKKDWELARRL	GKKAQPW	<i>Daucus carota</i>		
EIFSYLAPSI	TRWQAEALRAIQEAAEDFI	IHLFEDAMLC	AIHARRVTVMKKDWELARRL	GKKAQPW	<i>Daucus muciculus</i>		
EIFSYLAPSI	TRWQAEALRAIQEAAEDFI	IHLFEDAMLC	AIHARRVTVMKKDWELARRL	GKKAQPW	<i>Daucus pusillus</i>		
EIFSYLAPSI	TRWQAEALRAIQEAAEDFI	IHLFEDAMLC	AIHARRVTVMKKDWELARRL	GKKAQPW	<i>Daucus gluchidatus</i>		
EIFSYLAPSV	TRWQAEALVAIQEAAEDV	LVHLFEDAMLC	AIHARRVTIMKKDWELARRL	GKKGQPW	<i>Panax ginseng</i>		

Abb. 1 Vergleich der CENH3-Proteinsequenzen von vier *Daucus*-Arten und Ginseng (*Panax ginseng*)

Fig. 1 Multiple sequence alignment of CENH3 proteins of four *Daucus* species and ginseng (*Panax ginseng*)

Als erste Pflanzenforscher konnten RAVI und CHAN (2010) am Modellsystem *A. thaliana* zeigen, dass gezielte genetische Veränderungen des CENH3-Gens und damit des CENH3-Proteins zur Produktion von Haploiden genutzt werden können. Zuerst wurden homozygote letale CENH3-Knockout-Mutanten hergestellt, welche anschließend mit artifizialen *Arabidopsis* CENH3-Konstrukten transformiert wurden, die u. a. mit einer zusätzlichen Green-Fluorescent-Protein-Sequenz als „tail“ versehen worden waren. Mit diesen CENH3-Konstrukten konnte nicht nur die Mutation komplementiert werden, sondern es wurden nach Kreuzung mit *A. thaliana*-Wildtypen in der F₂-Nachkommenschaft auch bis zu 30 % haploide Pflanzen aufgefunden. Etwas später konnte von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durchaus auch native artfremde CENH3-Gene mit gewisser Sequenz-Homologie für die Komplementation der Null-Mutanten und die Induktion von Haploiden verwendet werden können (MAHESHWARI et al., 2015). Interessanterweise waren es immer die Chromosomensätze des genetisch modifizierten Elters, welche eliminiert wurden, während die „Wildtyp“-Chromosomen erhalten blieben. Obwohl die genauen Mechanismen der uniparentalen Genomeliminierung bis heute nicht vollständig geklärt sind, wurde die CENH3-basierte Haploideninduktions-Methode als eine bahnbrechende biotechnologische Entdeckung mit großer Bedeutung für die Pflanzenzüchtung angesehen und als innovative Alternative zu herkömmlichen Haploiden-Verfahren propagiert (COMAI, 2014). Aufgrund des universellen CENH3-Wirkungsmechanismus wird angenommen, dass auch bei anderen (Kultur)Pflanzen über diesen Weg entsprechende Erfolge erreicht werden könnten. Ein Schema für den Ablauf der uniparentalen Genomeliminierung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Mittlerweile konzentrieren sich die CENH3-Forschungen vor allem auf eine etwas andere Strategie, die man als „Ein-Schritt“ („One-Step“)-Methode bezeichnen könnte. Hierbei werden keine künstlichen oder artfremden CENH3-Gene für die Wiederherstellung von Mutanten eingesetzt, sondern es wird versucht, geringfügige Sequenzveränderungen im nativen CENH3-Gen zu induzieren und für den Effekt der Haploideninduktion nutzbar zu machen. Diese Mutationen dürfen nicht letal sein, sie sollen aber ausreichen, um nach Kreuzung mit Wildtypen zum erwünschten Effekt zu führen, d. h. also Haploide zu generieren. Es werden durch die CENH3-Mutationen in den Induktions-Genotypen sozusagen „schwache“ Zentromere (weak centromeres) geschaffen, die ebenfalls – womöglich aufgrund der fehlenden vollständigen Kompatibilität mit den Spindelfasern – zum Prozess der Genomeliminierung führen können. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass einzelne Punktmutationen, die mittels der TILLING-Technik innerhalb der CATD-Region von CENH3 induziert wurden, zur Induktion von Haploiden bei *A. thaliana* führten (KARIMI-ASHTIYANI et al., 2015). Punktmutationen im zentromerischen CENH3-Gen könnten heutzutage neben der eher zufälligen Mutagenese wie z. B. der TILLING-Methode auch gezielter durch moderne Verfahren des Genome Editing erreicht werden. Auch hier würde am Ende die Kreuzung von mutierten mit nicht-mutierten Genotypen zur uniparentalen Genomeliminierung führen. Als Genome Editing-Techniken stehen verschiedene Technologien zur Verfügung, die alle auf Sequenz-spezifischen Nukleasen beruhen, wie Meganukleasen, Zink-Finger-Nukleasen, Transcription-Activator-Like-Effector-Nucleases (TALENs) und ganz besonders die CRISPR/Cas9-Technologie. Eine gute Übersicht über aktuelle Genome Editing-Techniken geben PUCHTA und FAUSER (2014) oder SPRINK et al. (2015).

Stand und Perspektiven der CENH3-basierten Genomeliminierung am Beispiel Möhre

Am Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen des Julius Kühn-Instituts in Quedlinburg wird seit einiger Zeit die Frage untersucht, ob die bei der Modellpflanze *A. thaliana* entwickelte Zentromer-basierte uniparentale Genomeliminierung auch bei einer gemüsebaulichen Leitkultur wie der Möhre möglich ist. Die Möhre bietet sich für diese Forschungen aus verschiedenen Gründen an. Zum einen hat sie mit einer jährlichen Produktion von 37 Mio. t auf 1,5 Mio. ha Anbaufläche weltweit (FAOSTAT, 2015) eine große wirtschaftliche Bedeutung. Andererseits wird im kommerziellen Erwerbsanbau fast nur noch F_1 -Hybridsaatgut verwendet. Die für die Hybridsortenzüchtung erforderlichen Elternlinien werden gegenwärtig vorwiegend durch die sehr zeitintensive Inzucht oder bei großen, international tätigen Gemüsezüchtungsfirmen auch durch Mikrosporenkultur erstellt. Letztere ist bei der Möhre jedoch wenig effizient oder nur für eine begrenzte Auswahl von Genotypen nutzbar. So genannte „Inducer“-Linien mit modifiziertem CENH3 könnten als Kreuzungselter mit dem Ziel verwendet werden, den Chromosomensatz des modifizierten Elters zu eliminieren.

Um die Grundlagen für ein alternatives Verfahren zur Haploiden-Gewinnung bei Möhren durch uniparentale Genomeliminierung zu schaffen, wurden zunächst auf Basis von *Daucus*-Transkriptomdaten funktionell aktive CENH3-Gene aus Kultursorten der Möhre und drei entfernt verwandten *Daucus*-Wildarten PCR-gestützt kloniert. Vergleiche der abgeleiteten Proteinsequenzen mit CENH3-Sequenzen verschiedener anderer Pflanzenarten legten nahe, dass es sich bei den klonierten *Daucus*-Genen um authentische CENH3-Gene handelte. Zum funktionellen Nachweis wurden Chromosomen-Präparate und isolierte Zellkerne zytogenetisch mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern für Möhren-CENH3 per Immunofluoreszenz-Färbung analysiert. Die Lokalisierung der CENH3-Proteine ausschließlich im Zentromerbereich der Chromosomen wurde bestätigt (DUNEMANN et al., 2014).

Im Folgenden wurde aus Ginseng (*Panax ginseng*), einer verwandtschaftlich weit entfernten Art aus der Familie Araliaceae (Ordnung Doldenblütlerartige – Apiales), ebenfalls das entsprechende CENH3-Gen isoliert und für Transformationsexperimente in einen binären pflanzlichen Expressionsvektor kloniert. Vor dem Hintergrund der vorgeschlagenen Strategie zur Haploiden-Induktion wurde angestrebt, eine Komplementation des nativen Möhren-CENH3-Gens durch ein artfremdes homologes Gen zu erreichen. Mit Hilfe einer auf dem *Agrobacterium rhizogenes*-Wildstamm 15834 beruhenden Ko-Transformation, bei der das Ginseng-CENH3 *PgCENH3* zusammen mit einem CRISPR/Cas9-Konstrukt für ein putatives „knockout“ des Möhren-CENH3-Gens verwendet wurde,

konnten transgene Hairy-root-Linien erzeugt werden.

Durch Sequenzierung, HRM (high resolution melting)-Schmelzkurven-Analytik und hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese am LICOR-Sequenziergerät konnten molekulare Modifikationen (Mutationen) innerhalb der Möhren-CENH3-Sequenz nachgewiesen werden, die offensichtlich in einigen Fällen zu einem deutlich reduzierten Wurzel- und Pflanzenwachstum führten. Das mit Hilfe eines doppelten 35S-Promotors überexprimierte Ginseng-CENH3-Gen war in diesen Linien anscheinend funktionell voll aktiv.

Das verwendete Hairy-root-System hat sich für die vorliegenden Fragestellungen zur CENH3-Funktion als ein ideales Testsystem erwiesen. Bereits wenige Wochen nach Wurzelregeneration, die in der Regel an den kultivierten Möhrenexplantaten nach zwei Wochen Kulturdauer einsetzte, erfolgten erste zytogenetische Analysen der Mitosen von Wurzelspitzenzellen. Auch DNA-Isolierungen wurden zu diesem Zeitpunkt für erste PCR-Analysen und HRM-Analysen am Real-Time PCR-Gerät vorgenommen.

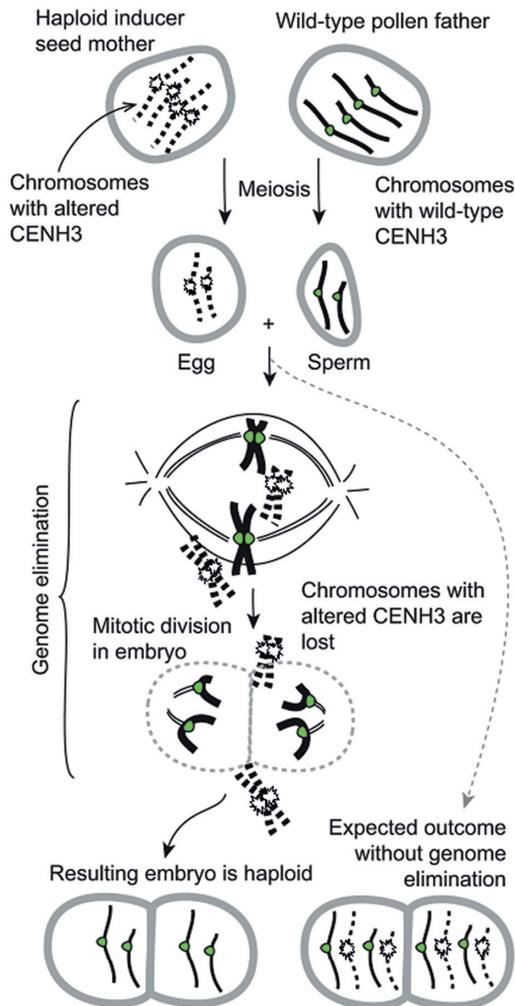


Abb. 2 Genomeliminierung infolge von genetischer Veränderung des zentromerischen Histons H3 (CENH3); COMAI (2014), modifiziert

Fig. 2 Genome elimination by genetic manipulation of centromeric histone H3 (CENH3); COMAI (2014), modified

Über eine vergleichsweise kurze Kallusphase wurden innerhalb von etwa drei Monaten somatische Embryonen und Pflanzen regeneriert. Nach erfolgter Vernalisation im Gewächshaus wurden die T0-Pflanzen für Kreuzungsexperimente zur Gewinnung von Saatgut der T1-Generation herangezogen. Die ersten T1-Sämlinge werden gegenwärtig zytogenetisch und mit Hilfe von molekularen Markern auf das Vorliegen putativ haploider bzw. doppel-haploider Sämlinge analysiert. Während zytogenetische Analysen der T0-Pflanzen mittel Doppel-Immunofluoreszenzfärbung zeigten, dass in den regenerierten Pflanzen wohl noch beide CENH3-Gene aktiv sind, ergab sich bislang bei den Pflanzen der nächsten Generation noch kein einheitliches Bild.

Parallel zu den beschriebenen Arbeiten zur Komplementation des mutierten nativen Möhren-CENH3-Gens wurden auch erste Versuche zur Etablierung einer One-Step-Methode durchgeführt. Hierzu wurde die Möhren-CENH3-Sequenz auf das Vorliegen von geeigneten CRISPR/Cas9-Target-Sites analysiert. Verschiedene putativ geeignete Targets wurden für die Klonierung entsprechender sgRNA-Konstrukte auf Basis des pDECas9 Vector-Systems (FAUSER et al., 2014) verwendet. Für die Transformationen wurde ebenfalls das Hairy-root-System genutzt. Bislang wurden drei verschiedene Targets in Einzeltransformations-Experimenten getestet. Insbesondere mit dem Konstrukt für die Targetregion 4' konnten Mutationen im CENH3-Gen induziert werden, welche sich in einigen Hairy-root-Linien signifikant negativ auf die Ausbildung von CENH3-Protein auswirkte (SPRINK, UNKEL, BUDAHN und DUNEMANN, in Vorbereitung). In diesem Jahr sollen auch bis zu drei Konstrukte für verschiedene CENH3-Targets in Ko-Transformationsexperimenten gleichzeitig eingesetzt werden.

Bei den beschriebenen Arbeiten zur Modifikation des CENH3-Gens bei Möhren wurden bislang ausschließlich gentechnische Verfahren eingesetzt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass generativ erstellte haploide Nachkommen in den meisten Fällen kein(e) Transgen(e) mehr aufweisen. Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie sind aber mittlerweile auch Gentechnik-freie Ansätze realisierbar. Insbesondere Protoplasten-Kulturen der Möhre sollen daher in Kürze für Versuche genutzt werden, mittels transienter Expression des Cas9-Proteins funktionell partiell aktive CENH3-Genvarianten herzustellen. Ergänzend sollen neuartige Verfahren zur vektorfreien (DNA-freien) Genmodifikation auf der Basis von Möhrenprotoplasten untersucht werden.

Literatur

- COMAI, L., 2014: Genome elimination: Translating basic research into a future tool for plant breeding. *PLOS Biology* **12** (6), e1001876.
- DUNEMANN, F., SCHRADER, O., BUDAHN, H. UND A. HOUBEN, 2014: Characterization of centromeric histone H3 (CENH3) variants in cultivated and wild carrots (*Daucus* sp.). *PLOS One* **9** (6), e98504.
- DUNWELL, J. M., 2010: Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 377-424.
- FAUSER, F., SCHMIL, S. UND H. PUCHTA, 2014: Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **79** (2), 348-359.
- ISHII, T., KARIMI-ASHTIYANI, R. UND A. HOUBEN, 2016: Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **76**, 421-438.
- KARIMI-ASHTIYANI, R., ISHII, T., NIESSEN, M., STEIN, N., HECKMANN, S., GURUSHIDZE, M., BANAEI-MOGHADDAM, A. M., SCHUBERT, V., KOCH, K., WEISS, O., DEMIDOV, D., SCHMIDT, K., KUMLEHN, J. UND A. HOUBEN, 2015: Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **112** (36), 11211-11216.
- MAHESHWARI, S., TAN, E. H., WEST, A., FRANKLIN, F. C. H., COMAI, L. UND S. W. L. CHAN, 2015: Naturally occurring differences in CENH3 affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids. *PLOS Genetics* **11** (2), e1004970.
- MUROVEC, J. UND B. BOHANEK, 2012: Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. InTech, www.intechopen.com, ISBN 978-953-307-932-5, 87-106.
- PRIGGE, V. UND A. E. MELCHINGER, 2012: Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods Mol Biol* **877**, 161-172.
- PUCHTA, H. UND F. FAUSER, 2014: Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant Journal* **78**, 727-741.
- RAVI, M. UND S. W. L. CHAN, 2010: Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464** (7288), 615-618.
- SANEI, M., PICKERING, R., KUMKE, K., NASUDA, S. UND A. HOUBEN, 2011: Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, E498- E505
- SPRINK, T., METJE, J. UND F. HARTUNG, 2015: Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Curr. Opinion in Biotechnology* **32**, 47-53.
- WANG, G., ZHANG, X. UND W. JIN, 2009: An overview of plant centromeres. *J. Genet. Genomics* **36**, 529-537.
- WATTS, A., KUMAR, V. UND S. R. BHAT, 2016: Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **25** (4), DOI 10.1007/s13562-016-0368-4.