

## Zielgerichtete Mutagenese bei Weizen nach Übertragung von CRISPR-RNA und Cas-Endonuklease durch Bestäubung mit Mais



Gatersleben, 21.07.2020 Die neuen Methoden der zielgerichteten - und damit punktgenauen - Mutagenese erleichtern die Erforschung von Genfunktionen und können den Fortschritt der Pflanzenzüchtung enorm beschleunigen, indem neue, genspezifische Biodiversität erzeugt oder aber bekannte Genvarianten in anderen Zuchtlinien reproduziert werden. Allerdings ist die Anwendung der gezielten Mutagenese bei Weizen aufgrund der hohen Komplexität seines Erbgutes und der stark von der verwendeten Zuchtlinie abhängigen DNA-Transfermethoden eine besondere Herausforderung. Eine neue Studie (Budhagatapalli *et al.*, 2020), die jetzt im renommierten *Plant Biotechnology Journal* veröffentlicht worden ist, zeigt, wie eine punktgenaue Mutagenese durch artenübergreifende Bestäubung von Weizen mit CRIPR-RNA/Cas-Endonuklease-transgenem Mais in beliebigem Weizenzuchtmaterial erreicht werden kann.

Zur Veranschaulichung des entwickelten Prinzips wurden neue Varianten für die beiden Weizengene *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1)* und *SEMIDWARF 1 (SD1)* generiert, die für die Regulierung des agronomisch wichtigen Merkmals Pflanzenhöhe eine entscheidende Rolle spielen.

Insgesamt wurden unter 174 generierten Weizenpflanzen 15 unabhängig entstandene, zielgenspezifische Mutanten identifiziert. Die Effizienz der Mutagenese bezogen auf die Anzahl hergestellter Weizenpflanzen reichte von 3,6% bis 50%. Mutanten wurden in allen in der Studie verwendeten Weizen-Typen gefunden - darunter die drei Sommerweizen BW, W5 und K15, der Winterweizen S96 sowie die beiden Pastaweizen D6 und D7. In allen drei angesteuerten Zielmotiven des Weizen-Erbgutes wurden Mutationen nachgewiesen. Erwartungsgemäß war in keiner der 15 Mutanten aufgrund des verwendeten methodischen Ansatzes ein Transgen vorhanden.

„Die wichtigsten in der vorliegenden Studie erzielten Fortschritte umfassen (1) eine im Vergleich zu bisher verfügbaren Methoden wesentlich geringere Abhängigkeit von der verwendeten Weizenzuchtlinie, (2) die Möglichkeit, mit nur einer einzigen CRISPR-RNA und Cas-Endonuklease-übertragenden Maispflanze praktisch beliebig viele verschiedene Weizenzuchtlinien im Zielgen mutieren zu können, sowie (3) die Möglichkeit der Erzeugung von zielgenspezifischen Mutanten, die frei von jeglichen Transgenen sind“, sagt Dr. Nagaveni Budhagatapalli, die an der am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben durchgeführten Studie maßgeblich beteiligte Wissenschaftlerin.

Es gibt jedoch noch Spielraum für Verbesserungen dieses Ansatzes, z.B. durch eine stärkere Aktivierung von CRISPR-RNA und Cas-Endonuklease im Maispollen oder durch die Entwicklung verbesserter Protokolle für die bei der neuen Methode verwendeten Herstellung von doppelhaploiden Weizenpflanzen.

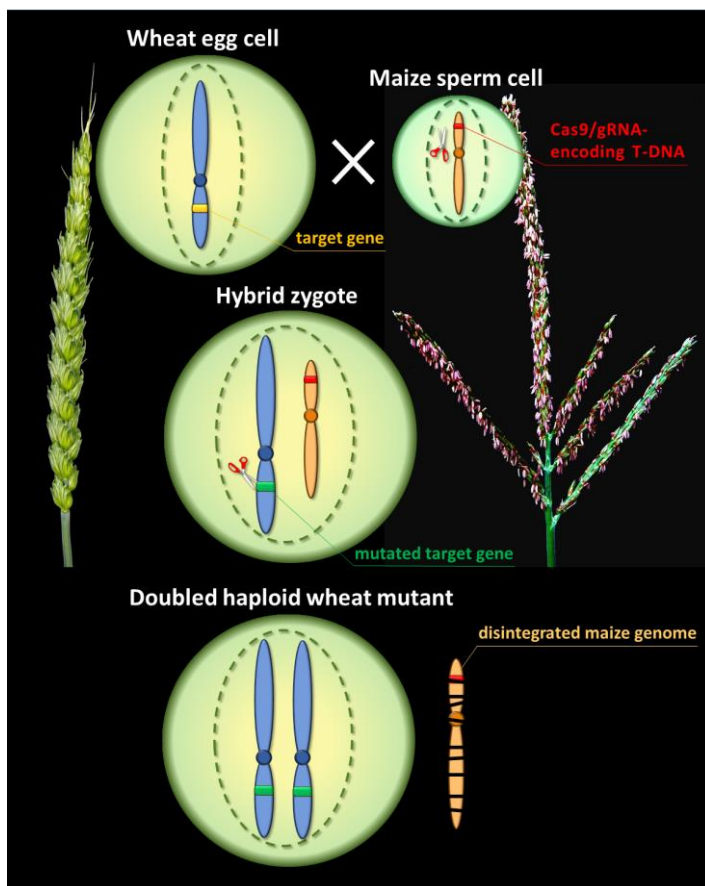
Wissenschaftlicher Kontakt  
Dr. Jochen Kumlehn  
Tel.: +49 39482 5-361  
[kumlehn@ipk-gatersleben.de](mailto:kumlehn@ipk-gatersleben.de)

Medienkontakt  
Christian Schafmeister  
Tel.: +49 39482 5-461  
[schafmeister@ipk-gatersleben.de](mailto:schafmeister@ipk-gatersleben.de)

**Originalpublikation:** Budhagatapalli *et al.* (2020), Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by *cas9* /guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer. *Plant Biotechnology Journal*. [doi.org/10.1111/pbi.13415](https://doi.org/10.1111/pbi.13415)

Abbildung (zur freien Verwendung):

<https://ipk-cloud.ipk-gatersleben.de/s/cpNBrkH8P5Z7AYK>



Die neu entwickelte Methode gestattet es, ein beliebiges Weizengen der Wahl in jeder beliebigen Zuchtlinie zu mutieren. Sie beruht darauf, dass zunächst Mais mit einem DNA-Abschnitt bestückt wird, der für eine molekulare Schere (eine Lotsen-RNA-geleitete Cas9-Endonuklease) kodiert. Nach Bestäubung von Weizen mit diesem Mais findet die mit dem Pollen übertragene Genschere ihr spezifisches Zielmotiv im Weizenerbgut und löst dort eine Mutation aus.

Während sich aus der Weizen x Mais-Hybridzygote im Weizenkorn ein Embryo entwickelt, werden die vom Maispollen eingebrachten Chromosomen abgebaut, da ihre Funktionalität nicht mit den zellulären Vorgängen im Weizen passfähig ist. Nach spontan erfolgreicher oder artifiziell induzierter identischer Verdopplung des aus der Weizen-Eizelle stammenden Erbgutes, einschließlich der darin ausgelösten Mutation, entsteht eine reinerbig mutierte, Genscheren-freie Weizenpflanze.