

Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences

C | A | U Plant Breeding
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Methoden zur gezielten Veränderung
züchterisch wichtiger Gene**

Dr. Siegbert Melzer
Institut für Pflanzenzüchtung
Universität Kiel

Plant Breeding Institute

**Methoden zur gezielten Veränderung
züchterisch wichtiger Gene**

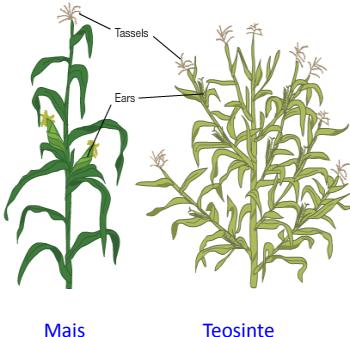
Pflanzenzüchtung führt zu genetischen Veränderungen von Pflanzen, damit sie ertragreicher und resistenter gegen Pathogene werden.

Züchtung ist Selektion und bedeutet "Einengung der genetischer Vielfalt in eine bestimmte Richtung"

Auf der Suche nach neuen nützlichen Genen, muss dem Züchter eine möglichst breite genetische Basis zur Verfügung stehen.
Er kann auf Wild- und Landsorten zurückgreifen und durch Kreuzungen immer wieder neue genetische Variation erzeugen.

Pflanzenzüchtung schränkt also einerseits die genetische Vielfalt ein, ist aber gleichzeitig an der Erhaltung der genetischen Vielfalt interessiert, die ihr als Genpool dient.

Bedeutung von Mutationen für die Evolution und Domestikation sowie die Züchtung von Kulturpflanzen



Mais **Teosinte**

Die Samenkörner bei Teosinte fallen aus ihren Schalen, sobald sie reif sind.
Die Maiskörner sitzen sehr fest an einer zentralen Spindel und haben die Fähigkeit, sich selbst auszusäen, verloren.

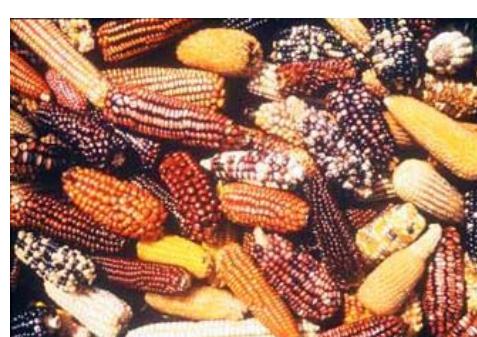


Teosinte **Zwischenformen** **Mais**

Mais ist aus dem Wildgras Teosinte domestiziert worden.
Dieses Wildgras wächst noch heute in einigen Gebieten Mexikos. Teosinte sieht völlig anders aus als unsere heutigen Maispflanzen.

Bedeutung von Mutationen für die Evolution und Domestikation sowie die Züchtung von Kulturpflanzen

Das Maisgen „teosinte branched 1 (tb1)“ unterdrückt das Wachstum der unteren Seitentriebe bei Maispflanzen.
Das Gen gehört zu einem Genpool, der während der Kultivierung von Mais maßgeblich für die Architektur der heutigen Pflanze verantwortlich ist. Ein Transposon sitzt in dem Promoter von tb1, wo es die Aktivität des Gens verstärkt.
Ein Transposon ist also dafür verantwortlich, dass unser heutiger Mais durch die Veränderung eines einzigen Genes so anders aussieht als Teosinte.



Methoden zur Erhöhung der genetischen Variation

Kombination existierender Variation durch Kreuzung von verschiedenen Linien, Varietäten, Landrassen etc.

Bestrahlung

- UV Licht (nur beim Pollen)
- Röntgenstrahlung
- Gammastrahlung
- Schnelle Neutronen

Chemische Mutagenese

- EMS
- Colchicin

Insertionsmutagenese

Genom Editing

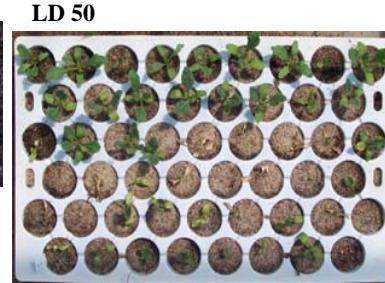
Chemische Mutagenese

Ethyl methanesulphonate (EMS)

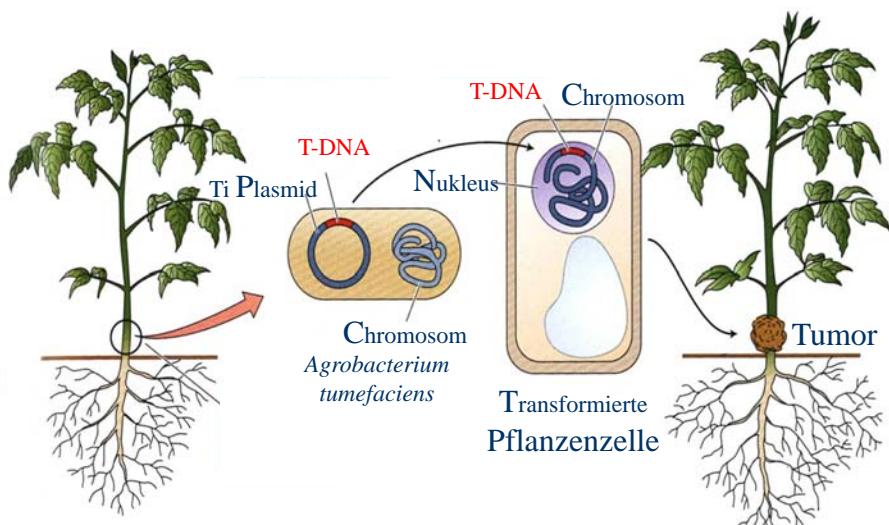


EMS-Mutagenese bei Zuckerrüben: M₁ Generation

- Wachstumsretardierung
- Albinos
- Veränderte Epidermis
- Nährstoffaufnahme
- Blühzeitpunkt



Agrobacterium tumefaciens kann Pflanzen genetisch modifizieren



Quelle: Taiz & Zeiger, Plant Physiology

Agrobacterium tumefaciens kann Pflanzen genetisch modifizieren



T-DNA Transfer im Detail

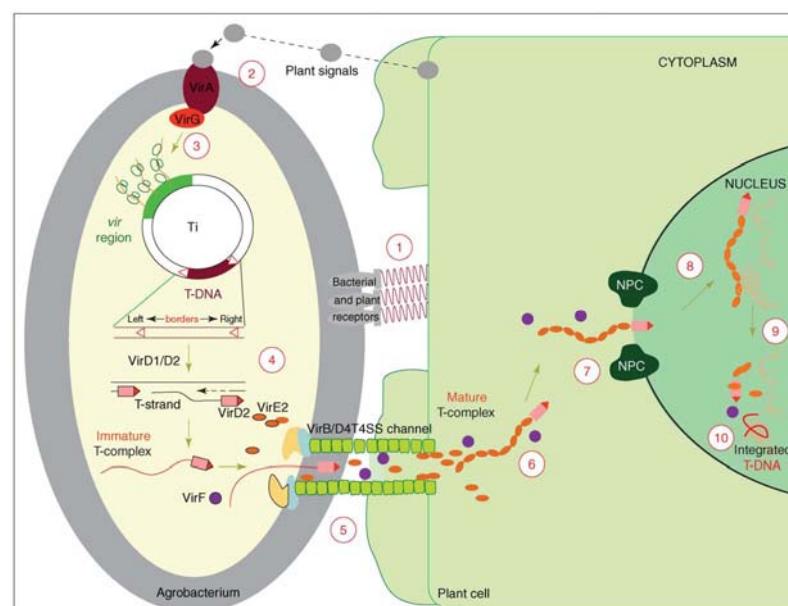
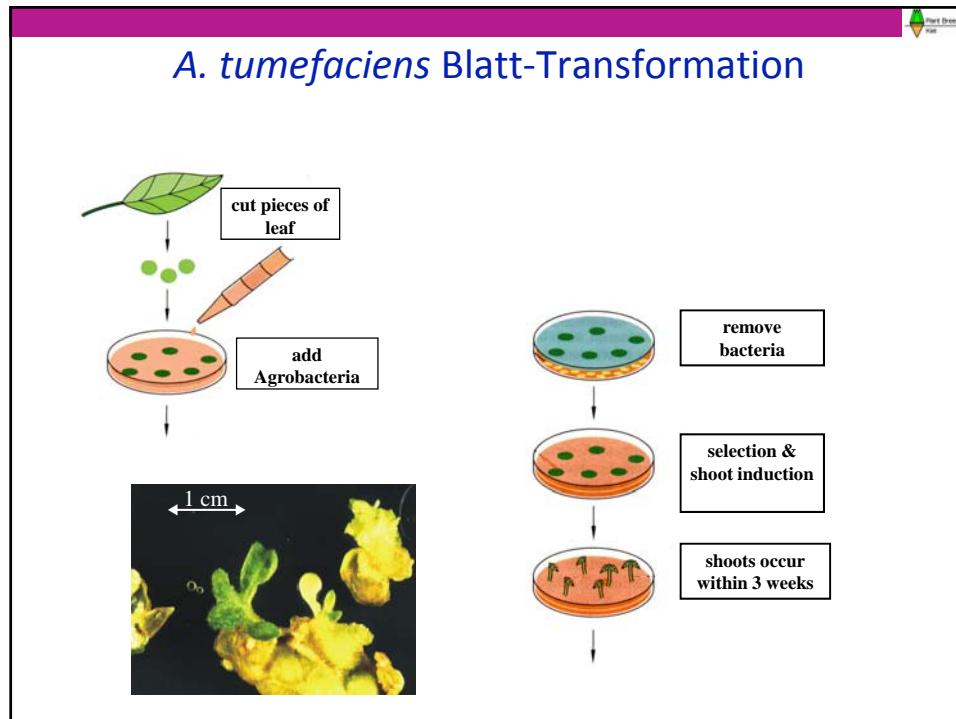
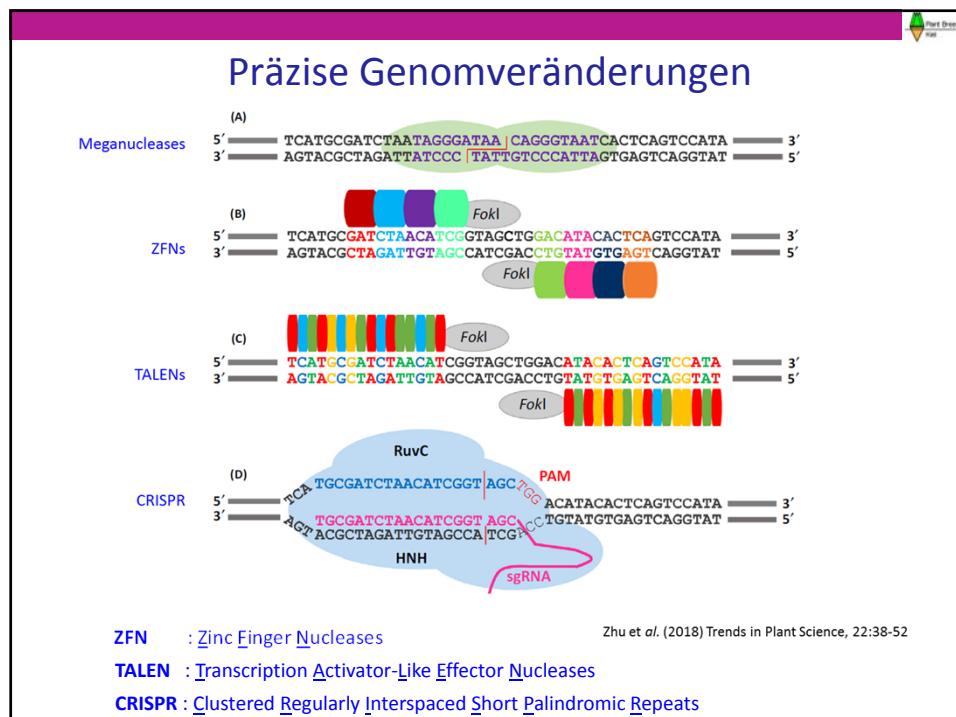
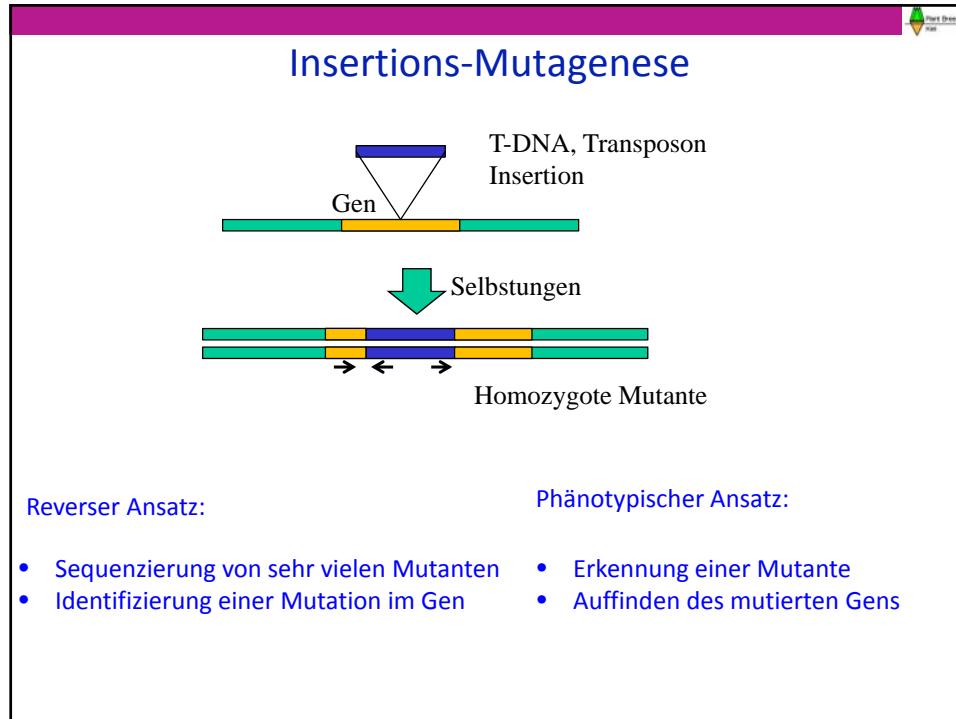
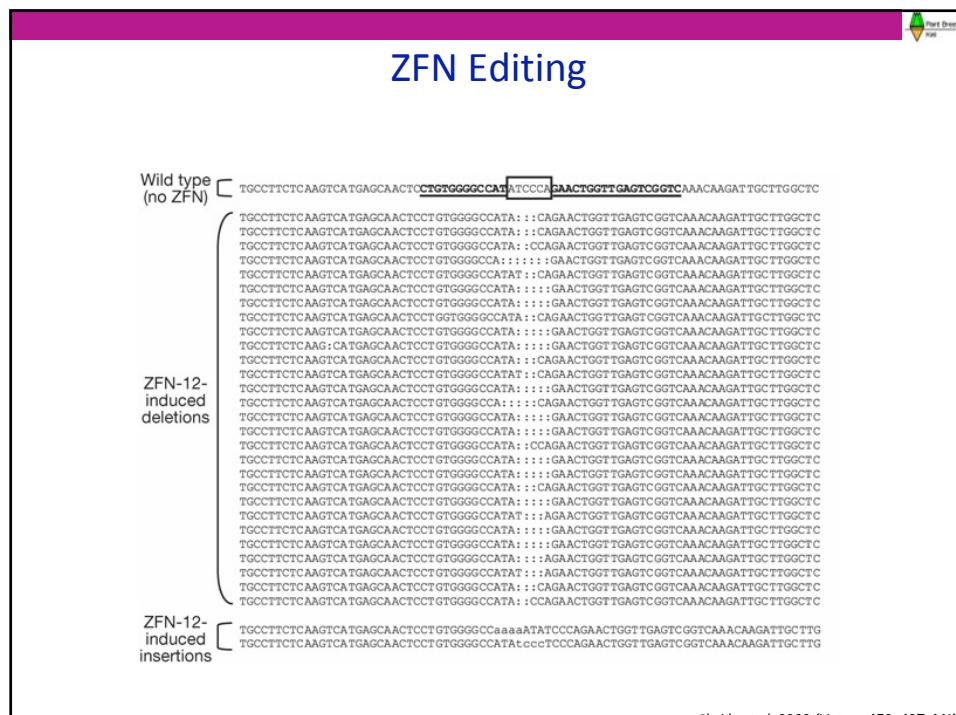
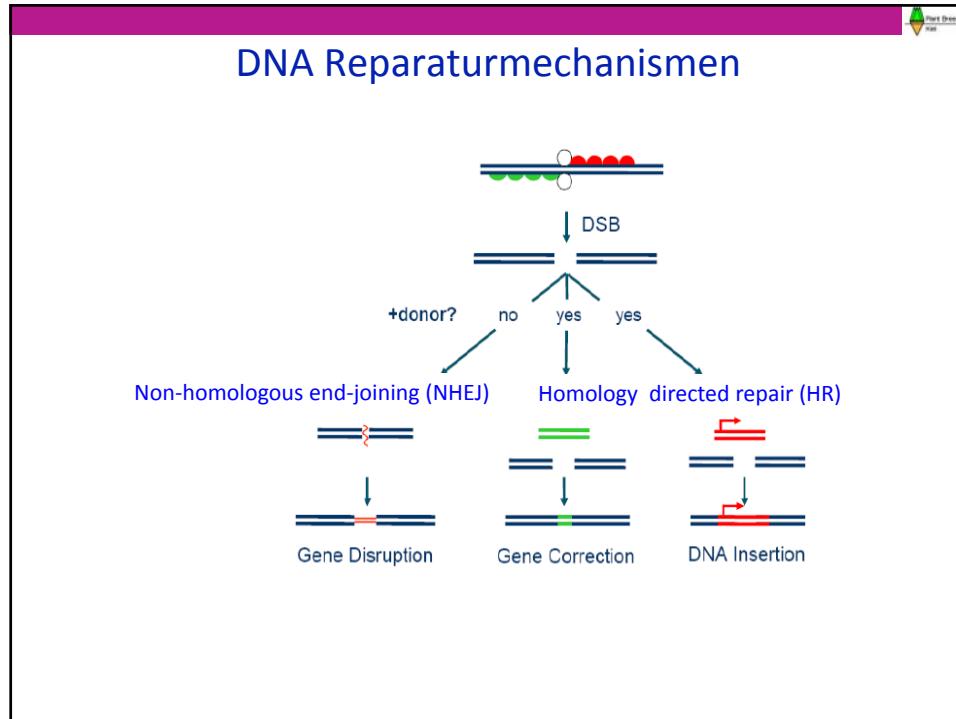
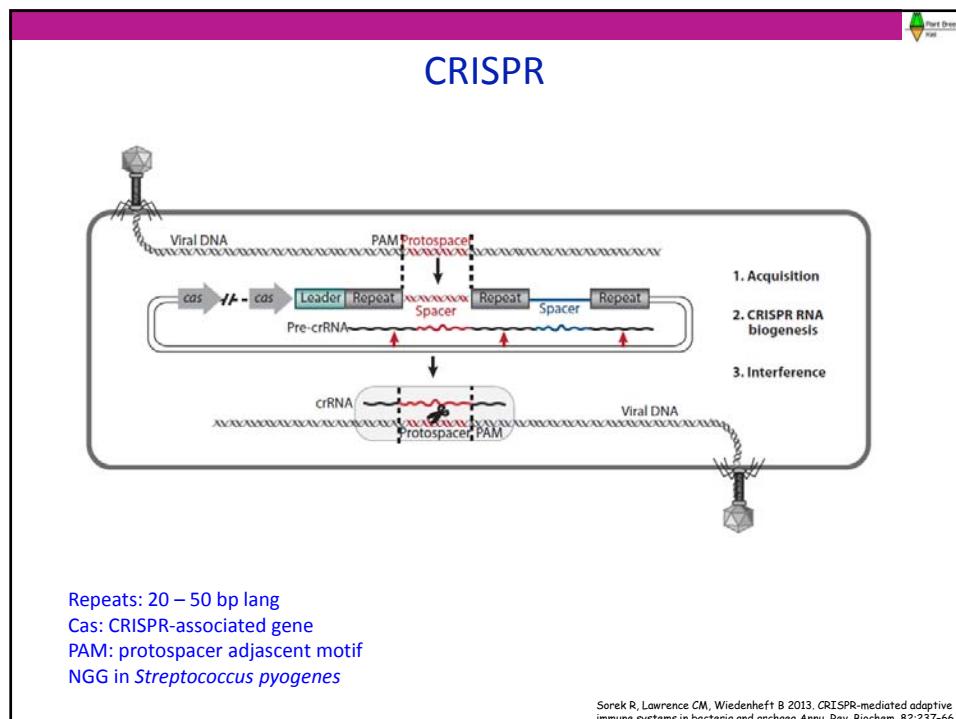
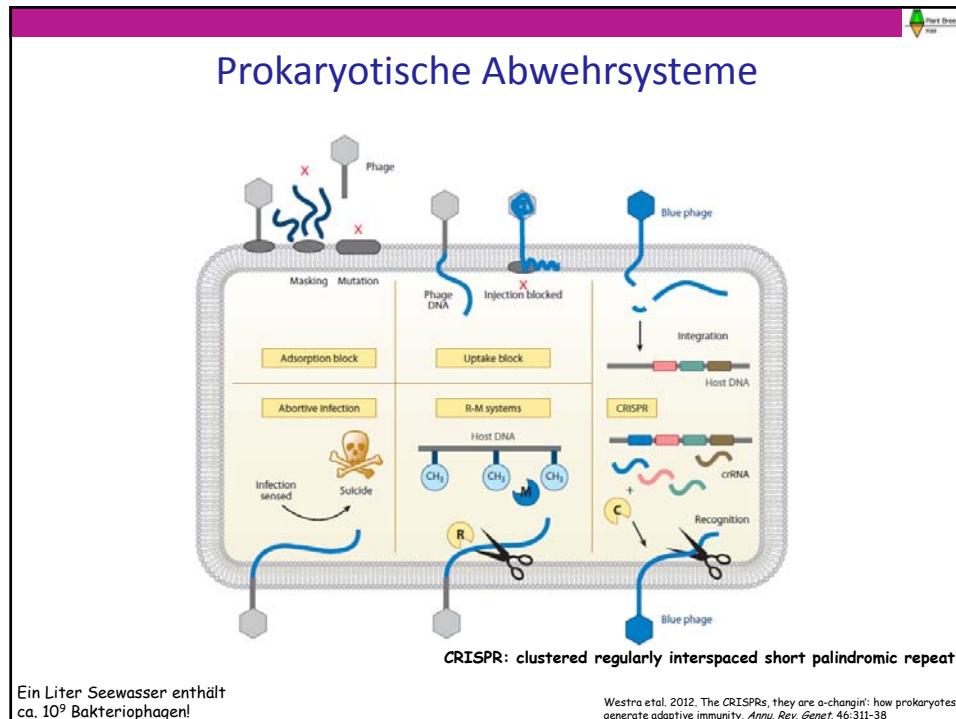


Abb. aus Tzfira und Citovsky, Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17:147-154

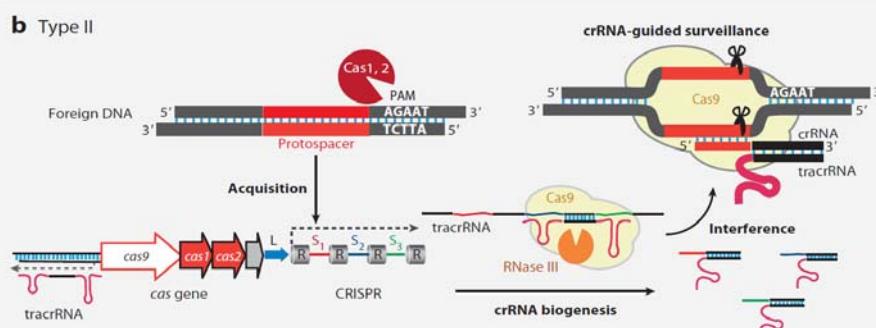








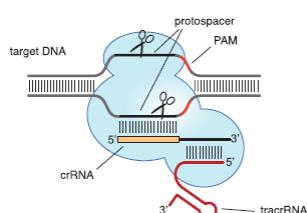
CRISPR Type II



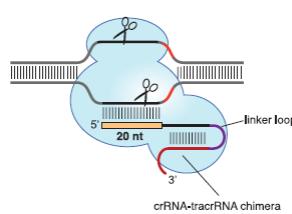
L: Leader Sequenz (Promotor)

Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B 2013. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Biochem.* 82:237-66

Fusion von crRNA und tracrRNA

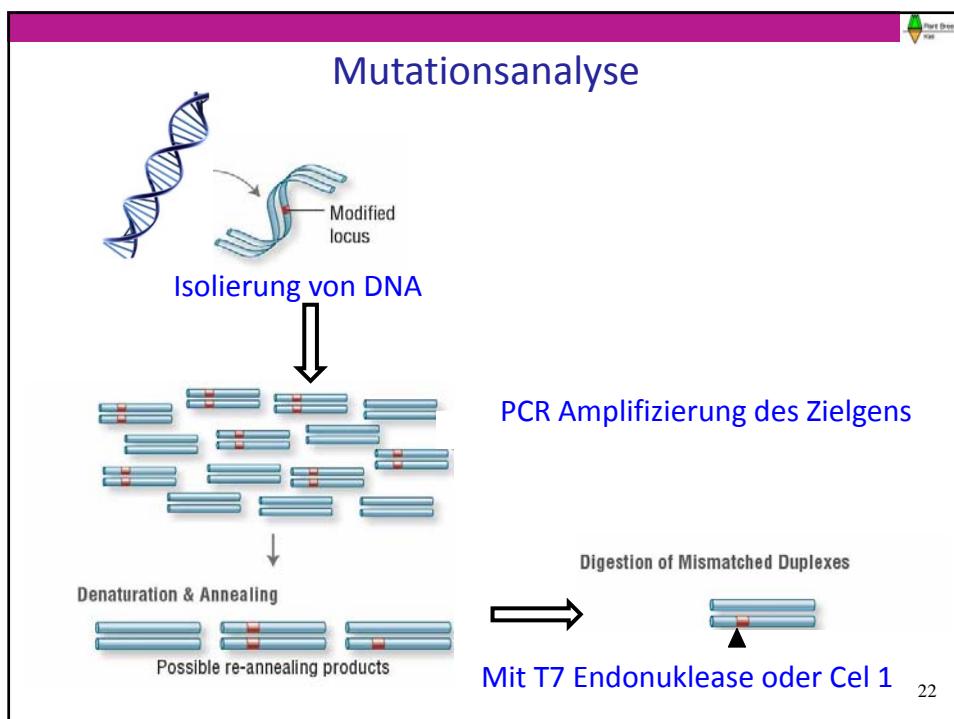
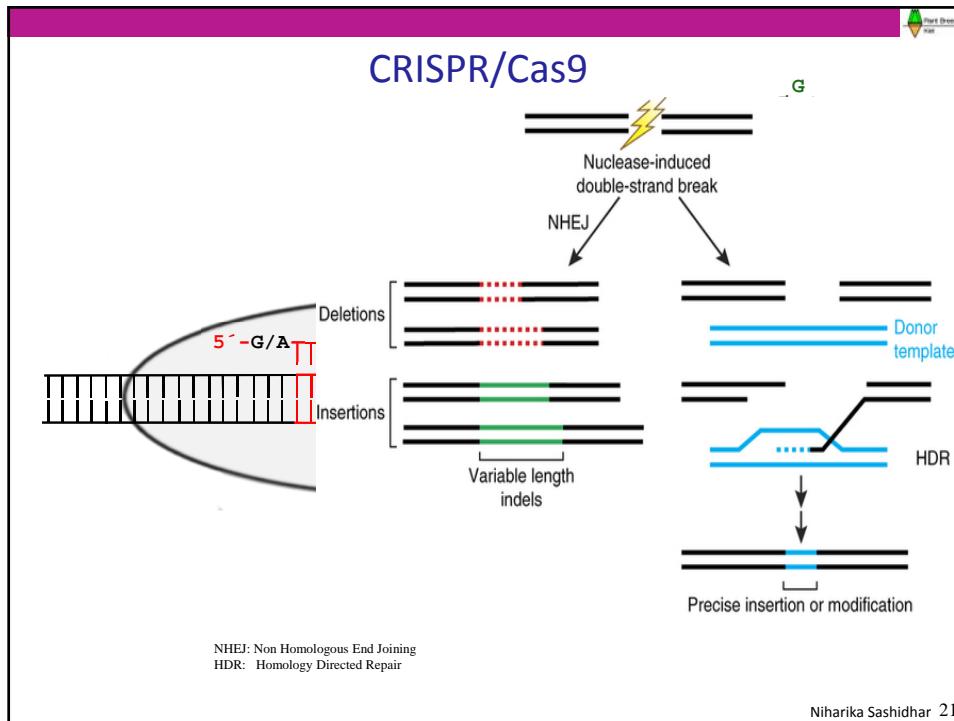


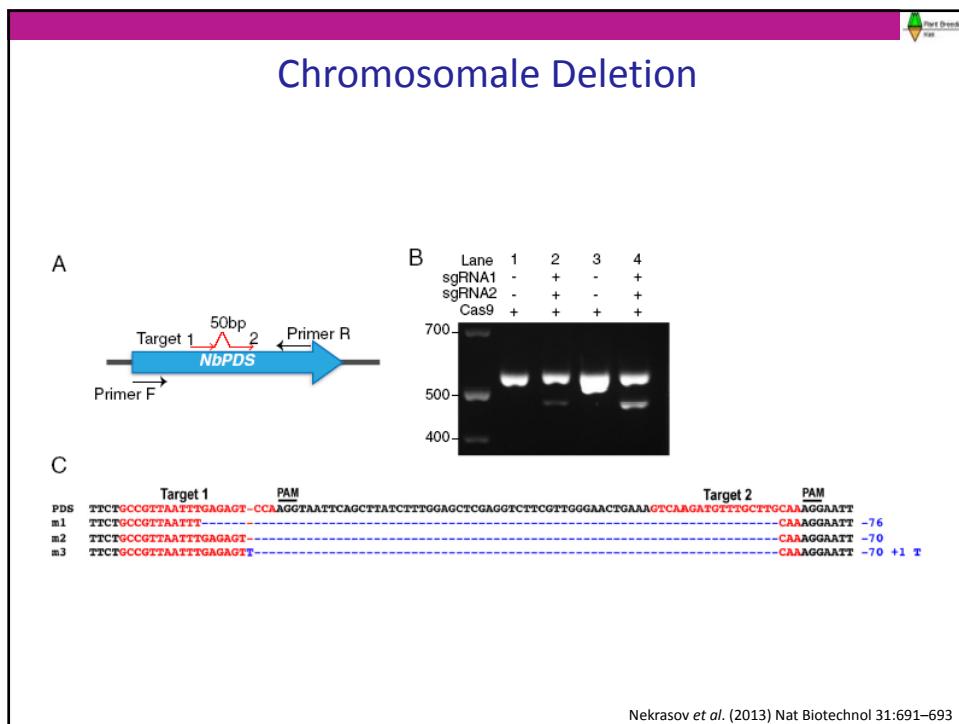
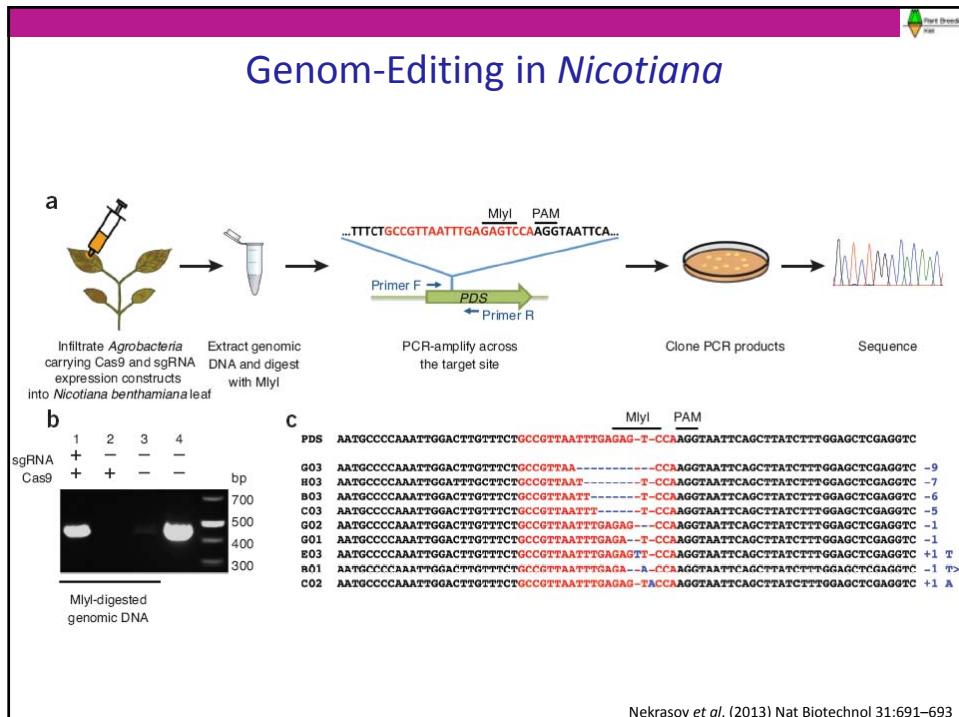
Cas9 programmed by single chimeric RNA



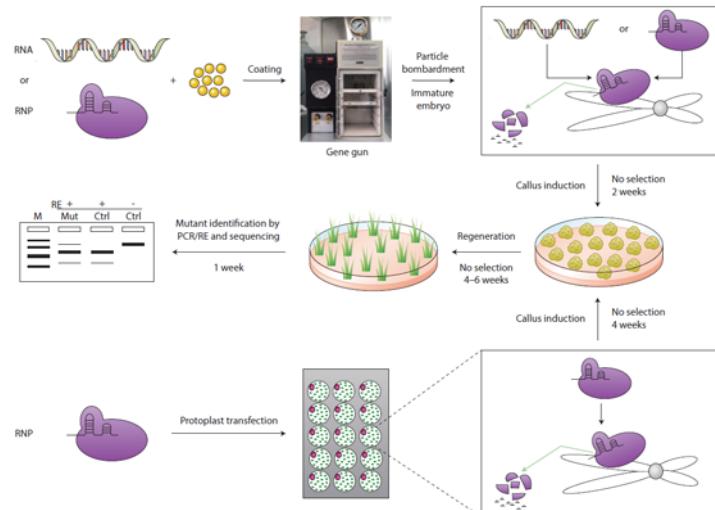
single guided RNA (sgRNA)

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821.



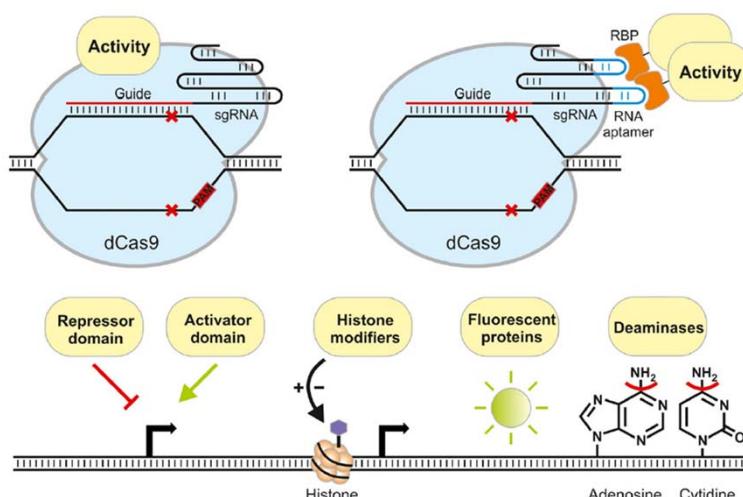


Ribonukleinpartikel (RNP) aus sgRNA und Cas9 können ohne stabile Transformation editieren



Yin et al. Nature Plants 3, 2017

Andere Anwendungen mit Cas9



Durch die Inaktivierung der katalytischen Domänen bleibt nur noch die DNA-Bindungsaktivität, die für die Rekrutierung anderer enzymatischer Funktionen benutzt werden kann.

Veröffentlichungen

Search results 2016
Items: 1 to 20 of 199

[View](#)

[Painting a specific chromosome with CRISPR/Cas9 for live-cell imaging.](#)
Zhou Y, Wang P, Tian F, Gao G, Huang L, Wei W, Xie XS.
Cat Res. 2017 Jan 13. doi: 10.1038/cz.2017.9. [Epub ahead of print] No abstract available.
PMID: 28084328
[Similar articles](#)

[Genome Editing of Crops: A Renewed Opportunity for Food Security.](#)
Georges F, Ray H.
GM Crops Food. 2017 Jan 11:0. doi: 10.1080/2145998.2016.1270489. [Epub ahead of print]
PMID: 26075688
[Similar articles](#)

[Precise Genome Modification via Sequence-Specific Nucleases-Mediated Gene Targeting for Crop Improvement.](#)
Sun Y, Li J, Xie L.
Front Plant Sci. 2016 Dec 20:7.1928. doi: 10.3389/fpls.2016.01928. Review.
PMID: 28056481
[Free PMC Article](#)
[Similar articles](#)

[DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins.](#)
Malinoy M, Vidal R, Jung MH, Koo CJ, Kim S, Kim JS, Velasco R, Nagamangala Kanchiswamy C.
Front Plant Sci. 2016 Dec 20:7.1904. doi: 10.3389/fpls.2016.01904.
PMID: 28056464
[Free PMC Article](#)
[Similar articles](#)

[Targeting the ABCW119 Gene to Explore the Role of Invertases in Sucrose Transport in Roots and during *Bohemica* Infection.](#)
Vellier F, Gaillard C, Coutos-Thévenot P, La Camera S.
Front Plant Sci. 2016 Dec 20:7.1892. doi: 10.3389/fpls.2016.01892.
PMID: 28056461
[Free PMC Article](#)
[Similar articles](#)

[Validating Genome-Wide Association candidates through quantitative variation in nodulation.](#)
Curtis SJ, Tiffin P, Guhlén J, Trujillo DL, Burghardt LT, Atkins P, Balles NJ, Denny R, Voytas DF, Stupar RM, Young ND.
Plant Physiol. 2017 Jan 5; pii: pp.01923.2016. doi: 10.1104/pp.16.01923. [Epub ahead of print]
PMID: 28057894
[Free Article](#)
[Similar articles](#)

[Depletion of juvenile hormone esterase extends larval growth in *Bombyx mori*.](#)
Zhang Z, Liu X, Shitsukawa T, Wang Z, Xu X, Huang Y, Li M, Li K, Tan A.
Insect Biochem Mol Biol. 2017 Jan 18;72-79. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.01.001. [Epub ahead of print]

Search results 2017
Items: 1 to 20 of 403

[View](#)

[Verification of DNA motifs in *Arabidopsis* using CRISPR/Cas9 Mediated Mutagenesis.](#)
Li J, Chen C, Chen H, Wang S, Chen X, Cui Y.
Plant Biotechnol J. 2018 Jan 13. doi: 10.1111/pbi.12886. [Epub ahead of print]
PMID: 29331055
[Free Article](#)
[Similar articles](#)

[Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in *Arabidopsis*.](#)
Wang Z, Wang S, Li D, Zhang Q, Li L, Zhong C, Liu Y, Huang H.
Plant Biotechnol J. 2018 Jan 13. doi: 10.1111/pbi.12884. [Epub ahead of print]
PMID: 29331077
[Free Article](#)
[Similar articles](#)

[Development of an Efficient Genome Editing Tool in *Bacillus licheniformis* Using CRISPR-Cas9 Nickase.](#)
Li K, Cai D, Wang Z, He Z, Chen S.
Appl Environ Microbiol. 2018 Jan 12; pii: AEM.02699-17. doi: 10.1128/AEM.02699-17. [Epub ahead of print]
PMID: 29330178
[Similar articles](#)

[Developing a flexible, High-efficiency Agrobacterium-mediated Sorghum Transformation System with Broad Application.](#)
Che P, Anand A, Wu E, Sander JD, Simon MK, Zhu W, Sigmund AL, Zastrow-Hayes G, Miller M, Liu D, Lawrie SJ, Zhao ZY, Albertsen MC, Jones TJ.
Plant Biotechnol J. 2018 Jan 11. doi: 10.1111/pbi.12879. [Epub ahead of print]
PMID: 29327444
[Free Article](#)
[Similar articles](#)

[Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system.](#)
Zhang T, Zheng Q, Yi X, An H, Zhao Y, Ma S, Zhou G.
Plant Biotechnol J. 2018 Jan 11. doi: 10.1111/pbi.12881. [Epub ahead of print]
PMID: 29327430
[Free Article](#)
[Similar articles](#)

[FRUCTOKINASE-LIKE PROTEIN 1 interacts with TRX \$\alpha\$ to regulate chloroplast development in rice.](#)
He L, Zhang S, Qiu Z, Zhao J, Nie W, Lin H, Zhu Z, Zeng D, Qian Q, Zhu L.
J Integr Plant Biol. 2018 Jan 10. doi: 10.1111/jipb.12631. [Epub ahead of print]
PMID: 29319227
[Similar articles](#)

[CRISPR disruption of *TCTP* gene impaired normal development in the silkworm *Bombyx mori*.](#)
Liu ZL, Xu J, Ling L, Zhang R, Shang P, Huang YP.

Ausblick

- Das CRISPR/Cas9 System erlaubt ein zielgerichtetes Schneiden von DNA mithilfe von einer kleinen nichtkodierenden RNA und einer Nuklease. Das führt zu einer Genmodifizierung durch Reparaturmechanismen.
- Die CRISPR/Cas9 Technologie hat enormes Potential als Genom-Editing Werkzeug für die angewandte und die Grundlagenforschung.
- ZFN und TALEN wären auch möglich, aber beide Methoden sind sehr arbeitsaufwändig und schwer zu etablieren!
- Nutzpflanzen verändert durch CRISPR/Cas9 waren bis letzten Sommer nicht als GMO zu bewerten, wenn keine stabile Transformation durchgeführt wurde.
Durch das Urteil des EuGH müssen Pflanzen mit durch Genom-Editing induzierte Mutationen als GMO bewertet werden.

Praktikum VCI 2019

DNA Isolierung

Pipetten und Spitzen



Gewebeernte



Metallkugeln sollten in jedem Tube vorhanden sein

Gewebehomogenisierung

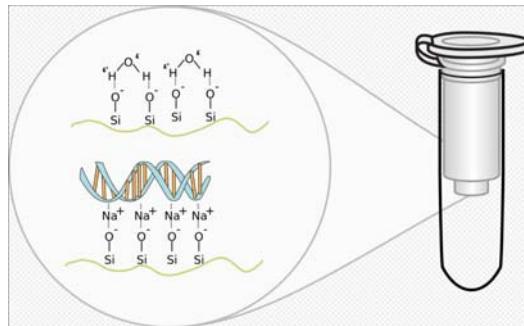
Zugabe von Puffer



Homogenisierung
im Bead Ruptor



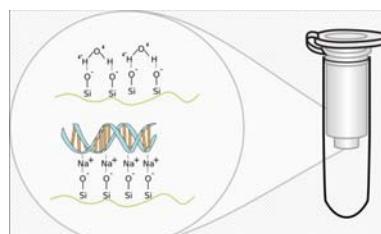
Spin Säulen basierte DNA-Isolierung



A solid phase extraction method to quickly purify nucleic acids. This method relies on the fact that nucleic acid will bind to the solid phase of silica under certain conditions.

http://en.wikipedia.org/wiki/Spin_column-based_nucleic_acid_purification

Spin Säulen basierte DNA-Isolierung



- **Lyse** - The cells of a sample crushed with a lysis procedure.
- **Filtrate** – The lysate is filtrated through a column, which binds also DNA
- **Bind** - A buffer solution together with ethanol is added that force the binding of nucleic acids to the spin column. A centrifuge is used to spin the solution through the silica gel membrane of the spin column. With the right buffer composition the nucleic acids will bind to the membrane.
- **Wash** - The flow-through is removed and a wash buffer is added to the column. After centrifugation only the nucleic acid should be left on the silica gel.
- **Elute** - The elution buffer removes the nucleic acid from the membrane and it is collected from the bottom of the column.

http://en.wikipedia.org/wiki/Spin_column-based_nucleic_acid_purification