

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften / Chemie / Mathematik / Physik

Fachgebiet: *Pflanzenphysiologie*

Betreuer: Prof. Dr. Inge Broer

Name: Katharina Unkel

(e-mail: k.unkel@live.de)

Three delivery methods of CRISPR/Cas9 to induce targeted mutations into centromeric histone H3 (CENH3) in carrots (*Daucus carota* L.)

Deutsche Zusammenfassung

Die Neue Genomische Technik (NGT) CRISPR/Cas9 induziert gezielte Mutationen zum Nutzen in der Pflanzenzucht. Hier wurde das Zentromer-spezifische Histone 3 (CENH3) in der Karotte (*Daucus carota*) mutiert. Dieses Histoneprotein spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung. Die elterlichen Chromosomen mit mutiertem CENH3 sollen bei Kreuzung eliminiert werden um (doppel-) haploide Elternlinien für die Hybridzüchtung zu gewinnen. Die Karotte wurde mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes* stabil transformiert um CRISPR/Cas9 *in vivo* zu exprimieren. Die transgenen Möhrenlinien zeigten mutiertes CENH3. Die transiente Transformation von Karottenprotoplasten mit CRISPR/Cas9-Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) führte zu transgen-freie, und mutierte Protoplasten. Die Mutationen führten zu einer Veränderung in der Akkumulation von CENH3 in manchen mutierten Linien. Die anhaltende Cas9-Aktivität in den transgenen Linien führte zu sekundären Mutationen, was die Vorhersagbarkeit des zu erwarteten CENH3-Phänotyps erschwerte. Die transgen-freie Methode wurde daher als bevorzugte Methode identifiziert.

Englische Zusammenfassung

The New Genomic Technique (NGT) CRISPR/Cas9 induces targeted mutations for use in plant breeding. Here, the centromere-specific histone 3 (CENH3) was mutated in carrot (*Daucus carota*). This histone protein plays an important role during cell division. The parental chromosomes with mutated CENH3 are planned to be eliminated during crossings to obtain (doubled) haploid parental lines for hybrid breeding. The carrot was stably transformed using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* to express CRISPR/Cas9 *in vivo*. The transgenic carrot lines showed mutated CENH3. Transient transformation of carrot protoplasts with CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein complexes (RNPs) resulted in transgene-free and mutated protoplasts. The mutations led to a change in the accumulation of CENH3 in some mutated lines. The persistent Cas9 activity in the transgenic lines led to secondary mutations, which made it difficult to predict the expected CENH3 phenotype. The transgene-free method was therefore identified as the preferred method.