

Gentechnik

Gerichtete Veränderung der Chromosomenzahl bei Pflanzen

MICHELLE RÖNSPIES, NIKLAS CAPDEVILLE, HOLGER PUCHTA
JOSEPH GOTTLIEB KÖLREUTER INSTITUT FÜR PFLANZENWISSENSCHAFTEN, KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)

CRISPR/Cas-mediated plant genome engineering is a powerful tool for restructuring chromosomes. Recently, entire chromosome arms of the model plant *Arabidopsis thaliana* could be transferred, resulting in chromosome fusions. Thus, the chromosome number has been reduced in a plant for the first time by decreasing the karyotype of *Arabidopsis* from 10 to 8 chromosomes. The resulting plants were fertile and phenotypically normal, demonstrating the robustness of plants to changes in chromosome number.

DOI: 10.1007/s12268-026-2654-6
© The Author(s) 2026

■ Die stetige Weiterentwicklung von Anwendungsmöglichkeiten des CRISPR/Cas-Systems hat dazu geführt, dass bis vor Kur-

zem unerreichbare genomische Veränderungen mithilfe der *Chromosome Engineering*-Technik in Pflanzen induziert werden konn-

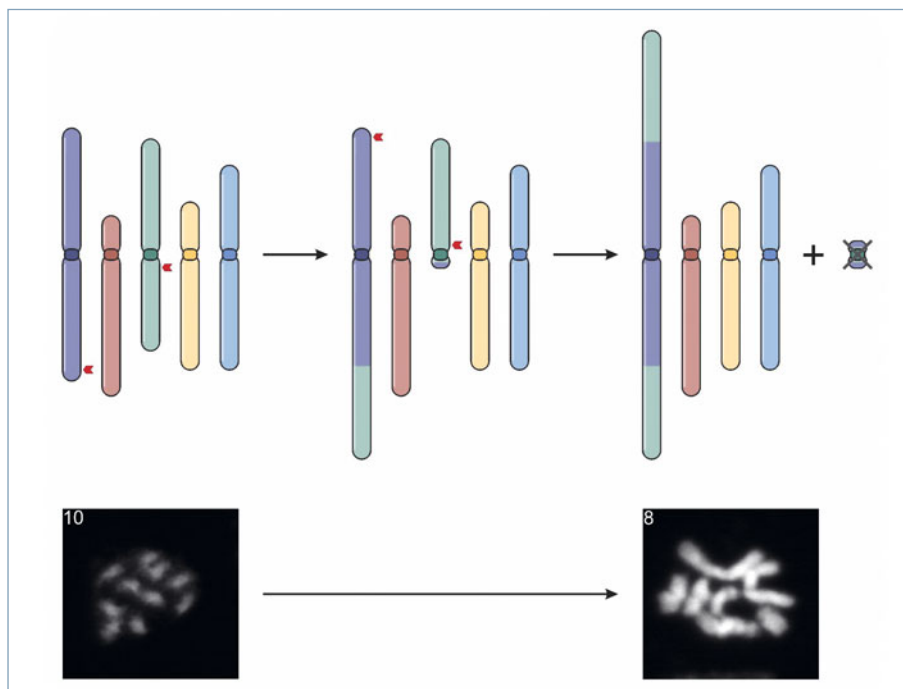
ten. Werden zwei Doppelstrangbrüche (DSBs) gleichzeitig auf demselben oder auf verschiedenen Chromosomen erzeugt, können so durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen chromosomale Umstrukturierungen entstehen, wie Inversionen oder Translokationen. So war es schon möglich, chromosomale Umstrukturierungen in Megabasen-Größe nicht nur in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, sondern auch in Nutzpflanzen, wie Mais und Reis, gezielt einzuführen [1–5]. Diese Technik ermöglicht die Manipulation von Genkopplungen sowie die Beeinflussung der meiotischen Rekombination, welche Grundlage für den genetischen Austausch ist [1, 5, 6].

Natürliche chromosomale Umstrukturierungen

Chromosomale Umstrukturierungen spielen eine entscheidende Rolle in der Evolution von Pflanzen und gehen oft mit einer Reduktion der Fertilität bei Kreuzung mit der Ausgangsart einher. Dies liegt daran, dass die Anlagerung zwischen Wildtyp- und umstrukturierten Chromosomen während der Meiose gestört ist. Durch massive Auswirkungen auf die Fertilität zwischen Pflanzen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen können sie sogar zur Bildung neuer Arten beitragen. Zum Beispiel ist in der diploiden Modellpflanze *A. thaliana* die gesamte genetische Information auf fünf Chromosomenpaare (10 Chromosomen) aufgeteilt. Die naheverwandte Art *A. lyrata* besitzt hingegen wie die mutmaßliche gemeinsame Vorläuferart acht Chromosomenpaare (16 Chromosomen). Die evolutionäre Reduktion der Chromosomenzahl bei *A. thaliana* kam durch eine Reihe von Chromosomenfusionen zustande, bei denen Teile verschiedener Chromosomen miteinander verschmolzen [7].

Die Chromosome Engineering-Technik

Mithilfe von CRISPR/Cas-basiertem *Chromosome Engineering* können große Umstrukturierungen gezielt an der gewünschten Stelle ins Genom eingebracht werden [6]. Um eine

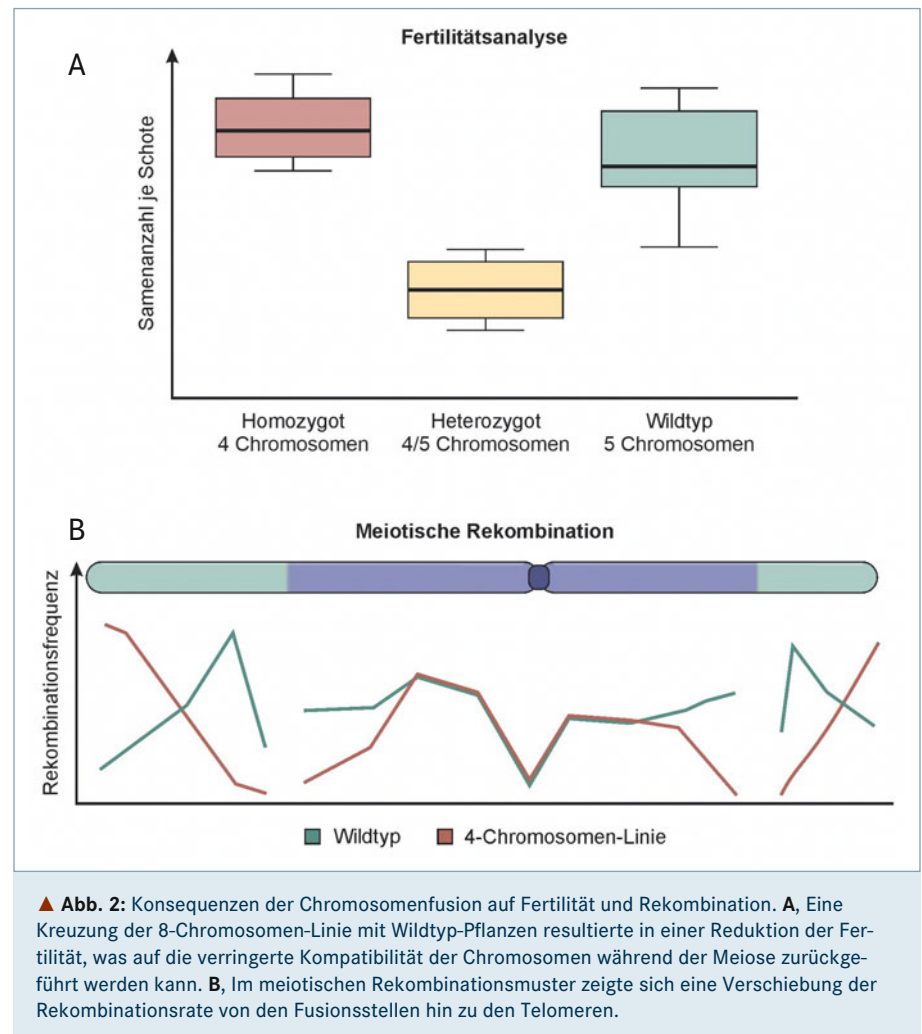


▲ **Abb. 1:** Durch die simultane CRISPR/Cas-vermittelte Induktion zweier DNA-Doppelstrangbrüche auf den Chromosomen 1 und 3 konnten reziproke Translokationen erzeugt werden, wodurch sukzessiv die beiden Arme von Chromosom 3 auf Chromosom 1 übertragen wurden. Hierdurch entstanden ein verlängertes Fusionschromosom sowie ein Minichromosom, welches während der meiotischen Segregation verloren ging. Die resultierende Reduktion der Chromosomenzahl konnte auch mikroskopisch bestätigt werden.

bessere Vererbbarkeit der Genomveränderung zu erreichen, wird die Cas-Nuklease mit einem in der frühen Embryoentwicklung aktivem Promotor, wie einem Eizellpromotor, kombiniert. Außerdem sollten die ausgewählten Zielsequenzen vor Beginn des Experiments bezüglich der Schnitteffizienz der Nuklease untersucht werden [6]. Mithilfe dieser Werkzeuge konnten 2020 zum ersten Mal auch Megabasen-große Inversionen und Translokationen in ein Pflanzengenom eingebracht werden [1, 2].

Chromosomenzahl verändern mit CRISPR/Cas

Die Veränderung der Chromosomenzahl in *A. thaliana* wurde nun durch Anwendung des bereits etablierten Protokolls [6] durch zwei aufeinanderfolgende End-zu-End-Translokationen erreicht. Diese Strategie erforderte die konsekutive Einführung zweier Chromosomenarm-Fusionen in Form reziproker Translokationen zwischen beiden Armen von Chromosom 3 und den Enden eines bzw. zweier Empfängerchromosomen. So konnten jeweils zwei DSBs gleichzeitig an den Grenzen des Kerncentromers von Chromosom 3 sowie nahe der Telomerenden des jeweiligen Empfängerchromosoms induziert werden. Die Reduktion der Chromosomenzahl wurde auf zwei unterschiedliche Arten erreicht. In einer der beiden produzierten Linien wurden Chromosom 1 und 3 fusioniert. Dazu wurde zunächst der kurze Arm von Chromosom 3 auf den langen Arm von Chromosom 1 übertragen, wodurch ein telozentrisches und verlängertes Chromosom entstanden. Im zweiten Schritt wurde der verbliebene Arm des telozentrischen Chromosoms auf den kurzen Arm von Chromosom 1 übertragen, was zur Generierung eines sehr großen Fusionschromosoms (~ 55 Mb) führte (**Abb. 1**). Andererseits konnte auch eine 8-Chromosomen-Linie durch Übertragung des kurzen Arms von Chromosom 3 auf den langen Arm von Chromosom 5 und anschließend des verbliebenen langen Arms von Chromosom 3 auf Chromosom 1 erreicht werden [8]. Als Nebenprodukt beider Ansätze sollte ein Minichromosom gebildet werden, das aus dem funktionellen Centromer von Chromosom 3 und zwei kurzen Telomer-Enden der Translokationspartner bestehen sollte. Aufgrund seiner geringen Größe und des Fehlens essenzieller genetischer Information wurde jedoch erwartet, dass es in der Folgegeneration verloren gehen würde, was in PCR-Untersuchungen bestätigt wurde. Interessanterweise ergaben



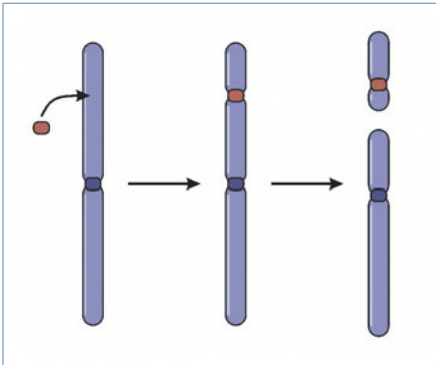
▲ **Abb. 2:** Konsequenzen der Chromosomenfusion auf Fertilität und Rekombination. **A,** Eine Kreuzung der 8-Chromosomen-Linie mit Wildtyp-Pflanzen resultierte in einer Reduktion der Fertilität, was auf die verringerte Kompatibilität der Chromosomen während der Meiose zurückgeführt werden kann. **B,** Im meiotischen Rekombinationsmuster zeigte sich eine Verschiebung der Rekombinationsrate von den Fusionsstellen hin zu den Telomeren.

phänotypische und transkriptionelle Analysen der beiden Linien keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass Pflanzen gegenüber induzierten Karyotypänderungen äußerst robust sind. Die Auswirkung der Chromosomenfusionen auf die Fertilität der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen wurde untersucht, indem die Anzahl der Samen pro Schote bestimmt wurde. In beiden 8-Chromosomen-Linien unterschied sich die Gesamtzahl der Samen nicht signifikant von Wildtyp-Pflanzen; sie waren also vollständig fertil. Nach einer Kreuzung der homozygoten Mutanten mit dem Wildtyp wiesen die Nachkommen allerdings eine um mehr als 60 % verringerte Fertilität auf, was auf die verringerte Kompatibilität von Fusions- und Wildtyp-Chromosomen während der Meiose zurückgeführt werden kann (**Abb. 2A**). Zusätzlich waren die Rekombinationsmuster in und um die fusionierten Chromosomenarme stark verändert (**Abb. 2B**). In beiden analysierten Linien wiesen die Fusionsstellen im

Vergleich zu den entsprechenden Chromosomenbereichen der Kontrolle eine verringerte Rekombinationsrate auf, was auf eine Beeinträchtigung der Chromosomenpaarung in den veränderten Bereichen hinweist. Der beobachtete Anstieg der Rekombinationshäufigkeit in Richtung der Chromosomenenden könnte durch einen Kompensationsmechanismus verursacht worden sein, um sicherzustellen, dass wenigstens ein für die korrekte Segregation der Chromatiden erforderlicher genetischer Austausch stattfindet. Die induzierte Veränderung des Rekombinationsmusters eröffnet neue Möglichkeiten in der Manipulation des genetischen Austausches in der Pflanzenzüchtung.

Ausblick

Mithilfe der vorgestellten *Chromosome Engineering*-Methode konnte erstmals die Chromosomenzahl bei einer Modellpflanze auf vorher definierte Weise verändert werden. Dies sollte nun auch bei Nutzpflanzen möglich sein, da große chromosomale Umstruk-



▲ **Abb. 3:** Durch die Integration eines synthetischen Centromers konnte in Mais ein dizentrisches Chromosom erzeugt werden. Durch zufällige Brüche während der Segregation konnte so eine Erhöhung der Chromosomenzahl erzielt werden.

turierungen bereits in Reis und Mais erzielt werden konnten [1–5].

Eine künstlich induzierte Chromosomenzahlerhöhung wurde in Pflanzen kürzlich bereits durch eine andere, nicht CRISPR/Cas-basierte Methode erreicht [9]. Dafür wurde ein zusätzliches synthetisches Centromer auf Chromosom 4 von Mais integriert. Durch zufällige Chromosomenbrüche während der Segregation entstand eine Mais-Linie mit 22 statt 20 Chromosomen (**Abb. 3**). Eine Untersuchung der Pflanzen ergab keine phänotypischen Abweichungen oder Wachstumsdefekte. Durch die Kombination dieses Ansatzes mit CRISPR/Cas-vermitteltem *Chromosome Engineering* sollte es nun auch möglich sein, Chromosomen gerichtet zu teilen. Gezielte Änderungen der Chromosomenzahl könnten neue Strategien in der Pflanzenzüchtung ermöglichen, um genetische Kopplungsgruppen völlig neu zu definieren oder sogar genetische Barrieren aufzubauen. So könnte man langfristig das Auskreuzen von Kulturpflanzen mit nahe verwandten Wildarten verhindern. Aber auch andere hochinteressante Fragen könnten nun beantwortet werden: So sollte es jetzt möglich sein,

Umstrukturierungsereignisse aus der Evolution von Genomen nachzuahmen, Karyotypen von Vorläuferarten zu rekonstruieren oder die Minimal- und Maximallänge von Chromosomen zu erforschen. ■

Literatur

- [1] Schmidt C, Franz P, Rönspies M et al. (2020) Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nat Commun* 11: 4418
- [2] Beying N, Schmidt C, Pacher M et al. (2020) CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in Arabidopsis. *Nat Plants* 6: 638–645
- [3] Schwartz C, Lenderts B, Feigenbutz L et al. (2020) CRISPR-Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. *Nat Plants* 6: 1427–1431
- [4] Lu Y, Wang J, Chen B et al. (2021) A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice. *Nat Plants* 7: 1445–1452
- [5] Rönspies M, Schmidt C, Schindele P et al. (2022) Massive crossover suppression by CRISPR-Cas-mediated plant chromosome engineering. *Nat Plants* 8: 1153–1159
- [6] Rönspies M, Schindele P, Wetzel R, Puchta H (2022) CRISPR-Cas9-mediated chromosome engineering in Arabidopsis thaliana. *Nat Protoc* 17: 1332–1358
- [7] Lysak MA, Berr A, Pecinka A et al. (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in Arabidopsis thaliana and

related Brassicaceae species. *Proc Natl Acad Sci* 103: 5224–5229

[8] Rönspies M, Khosravi S, Helia O et al. (2025) CRISPR-Cas-mediated heritable chromosome fusions in Arabidopsis. *Science* 390: 843–848

[9] Zeng Y, Wang M, Gent JJ, Dawe RK (2025) Increased maize chromosome number by engineered chromosome fission. *Sci Adv* 11: eadw3433

Funding: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Holger Puchta
J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP)
Abteilung Molekularbiologie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4
D-76131 Karlsruhe
holger.puchta@kit.edu

AUTORINNEN UND AUTOREN



Michelle Rönspies

2014–2019 Studium der Biologie an der FU Berlin und der Molekularen Lebenswissenschaften an der HU Berlin. 2019–2023 Promotion am J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Seit 2023 PostDoc am JKIP des KIT.



Niklas Capdeville

2014–2019 Studium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2023 Promotion am J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. Seit 2023 PostDoc am JKIP des KIT.



Holger Puchta

Biochemiestudium an den Universitäten Tübingen und München. Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1989–1995 PostDoc am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, Schweiz. 1995–2002 Gruppenleiter am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben. Seit 2002 Professor für Molekularbiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).