

Schlussbericht

**Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Pflanzenbau und
Pflanzenzüchtung**

**GABI-TILL: Establishment of a central platform for testing lead gene
function in crops based on the TILLING technology, Teilprojekt: Kiel**

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Förderkennzeichen: 0313123B

Laufzeit des Vorhabens: 01.09. 2004 bis 31.08. 2007¹

Berichtszeitraum: 01.09. 2004 bis 31.08. 2007

1 Einleitung

Das GABI-TILL Projekt hatte die Aufgabe, auf der Basis der TILLING-Technologie eine zentrale Plattform zur Untersuchung von Genfunktionen für die Kulturpflanzen Zuckerrübe und Gerste und die Modellpflanze *Arabidopsis* aufzubauen. Über die gezielte Identifikation von Genmutationen soll die Möglichkeit zur effizienten Nutzung von Informationen aus pflanzlichen Modellsystemen für Kulturpflanzen geschaffen und GABI-Partnern zugänglich gemacht werden. Beim TILLING handelt es sich um eine relativ neue Technologie, die vor Projektbeginn erst an wenigen Pflanzen etabliert worden war. Der Stand der Forschung und die Patentlage sind im Antrag ausführlich dargestellt worden.

Das Ziel des Projektes GABI-TILL war die Etablierung von TILLING-Plattformen für die Kulturarten Zuckerrübe und Gerste. Das GABI Teilprojekt Kiel befasste sich dabei ausschließlich mit dem Aufbau einer TILLING Plattform für die Zuckerrübe mit folgenden Meilensteine:

- Vermehrung einer M2-Mutantenpopulation mit einer hohen Mutationsfrequenz
- Isolierung von DNAs aus einzelnen M2-Pflanzen der Mutantenpopulation im Hochdurchsatz und Erzeugung von DNA-pools für das TILLING
- Primer *design* für Kandidatengene (Vernalisationsbedürfnis, Schoss- und Blühinduktion, Restenzgenanaloge, Abwehrgene, Samenqualität)
- Etablierung der TILLING-Methode für Zuckerrübe (DNA-Poolgrößen, DNA-Mengen, Cell-Verdauung)
- Durchführung von TILLING-screens für selektierte Kandidatengene
- Identifizierung und Sequenzierung von Mutanten
- Selbstung der M2 und Vermehrung von M3
- Funktionelle Analyse der M2 und M3
- Erzeugung und Lagerung von M2- und M3-Saatgut

Das GABI-TILL-Teilprojekt Kiel begann am 1.10.2005 und endete am 31.8.2007. Die Wissenschaftlerstelle war mit Dr. Uwe Hohmann besetzt. Mit einem Teil der Vermehrungen im Feld konnte bereits vor dem Start der Förderung begonnen werden.

Ein Arbeitstreffen fand vom 10. bis 11.03.2005 beim Koordinator in Potsdam im Rahmen eines TILLING-workshops statt. Zusätzlich wurde ein Projekttreffen in Bielefeld am 24.11.2005 zum gegenseitigen Erfahrungsaustausch und Stand des Projektes veranstaltet. Im Jahr 2006 fanden zwei weitere Projekttreffen und ein Workshop in Gatersleben am 19.06.2007 statt. Das Abschlusstreffen war am 16.4.2007 in Kiel.

2 wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Das erste Ziel für die Etablierung einer TILLING-Plattform bei Zuckerrüben war der Aufbau einer Mutantenpopulation im Umfang von 6200 M2-Pflanzen. Eine EMS-Mutantenkollektion stand bereits zu Projektbeginn aus dem GABI-BOLT Projekt der ersten GABI-Förderungsphase als Ressource zur Verfügung. Es wurden Samen des annualen Genotyps 930190 (*BB*) mit EMS (*Ethyl-Methan-Sulfonsäure*) unter Verwendung unterschiedlicher Behandlungsweisen (Behandlungszeiten von 4, 6, 8 und 12 Stunden, EMS-Konzentrationen von 0,5% und 1%) mutagenisiert. Auf diese Weise wurde ein Optimum und ein breites Spektrum an Mutationsauslösungen ausgetestet. Es wurden 9 Nicht-Schosser (*loss of function, change of function*) Mutanten unter ca. 65.000 M₂-Pflanzen identifiziert. Aus dem Restsaatgut von ca. 200.000 M₂-Samen, die auf ca. 2000 unterschiedliche M₁-Pflanzen zurückgehen, werden M₂-Familien für die Erstellung des EMS-Mutantensortiments selektiert.

2.1 Vermehrung der M2 und Fertilitätsbestimmung

Der Aufbau der Mutantenpopulation wird auf Abbildung 1 verwiesen. In den Jahren 2004 und 2005 wurden insgesamt 11.219 M2 Pflanzen im Feld angebaut. Diese gehen auf 1520 M1 Pflanzen zurück, von denen nach Tütenisolierung Saatgut geerntet worden war. Somit handelt es sich um 1520 M2 Vollgeschwisternachkommenschaften (Familien). Von jeder M2 Familie wurden möglichst 8 Pflanzen im Feld in Reihen angebaut. Die 1520 Nachkommenschaften gehen auf 8 bzw. 9 verschiedenen EMS-Behandlungsstufen zurück.

Nachdem sie in Paletten angezogen worden waren wurden die Pflanzen in der zweiten Maihälfte ins Freiland gepflanzt und unter Isolierungstüten geselbstet. Das Saatgut wurde von Mitte September bis Ende Oktober geerntet und der Selbstungsansatz bestimmt. Aufgrund der Erfahrungen aus dem Jahr 2004 und dem hohen Befallsdruck von Blattläusen, wurde im Jahr 2005 bei 1110 Einzelpflanzen (18,3%) auf die Tütenisolierung verzichtet und Saatgut unter freier Abblüte erzeugt.

Im Jahr 2005 wurden 83 M2-Familien, die bereits im Jahr 2004 angezogen wurden, nachgebaut. Hierbei handelte es sich um Familien, von denen aufgrund von Sterilität nicht genügend M3-Saatgut erzeugt werden konnte. Mit Ausnahme von 10 M2-Familien liegt jetzt ausreichend Saatgut von mindestens 4 Geschwisterpflanzen pro M2-Familie vor.

Die Ernteergebnisse aller 11.219 Pflanzen aus 1520 verschiedenen Nachkommenschaften (M2-Familien) ist in Tabelle 1 zusammengefasst. 941 Samen (7,7%) waren nicht keimfähig. Von 1485 (97,7%) aller M2-Familien konnte ausreichend M3-Saatgut (von mindestens 4 Geschwisterpflanzen) erzeugt werden und stehen somit für die DNA-Extraktion und TILLING zur Verfügung. Die Abbildung 2 zeigt den prozentualen Anteil von 453 verschiedenen M2-Familien (29,8%) mit sterilen Pflanzen (12%), letalen Pflanzen (11%) sowie Pflanzen mit verminderter Fertilität (19%). Die Phänotypisierung erfolgte im Jahr 2004 und 2005 hinsichtlich der Schossneigung der M2-Pflanzen. Im Jahr 2004 wurde eine Nachkommenschaft (Saatgut Nr. 012270) mit zwei nicht-schossenden M2-Einzelpflanzen (012270/7 und 012270/8) beobachtet. Im Jahr 2005 wurden zwei sehr spätschossende M2-Pflanzen (Saatgut Nr. 001242/1 und 011039/1) selektiert, die derzeit im Gewächshaus zur Blüte gebracht wurden.

Tabelle 1: Ergebnisse der Ernte von Nachkommenschaften (M2-Familien im Freiland 2004 und 2005) aus unterschiedlichen EMS-Behandlungsstufen

EMS-Konzentration	EMS-Behandlungsdauer (hr)	Pflanzen mit > 50 M3-Samen (%)	Pflanzen mit < 50 M3-Samen (%)	Sterile Pflanzen (%)	Letale Pflanzen (%)
0,5 % EMS:					
	4	807 (91,7)	56 (6,4)	9 (1,0)	8 (0,9)
	6	1110(92,0)	67 (5,5)	19 (1,6)	11 (0,9)
	8	1222 (91,3)	82 (6,1)	21 (1,6)	14 (1,1)
1 % EMS:					
	4	1219 (91,6)	74 (5,6)	25 (1,9)	13 (1,0)
	6	1432 (92,1)	59 (3,8)	30 (1,9)	32 (2,1)
	8	1410 (88,1)	111 (6,9)	53 (3,3)	26 (1,6)
	12 ^a	877 (83,7)	91 (8,7)	53 (5,1)	27 (2,6)
	12 ^b	1858 (86,5)	112 (5,2)	85 (4,0)	94 (4,4)
	12 ^c	98 (87,5)	6 (5,4)	3 (2,7)	5 (4,5)
Summe (%)		10033 (89,4)	658 (5,9)	298 (2,7)	230 (2,1)
	Kontrolle	104 (96,2)	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (1,9)

^a: M1-Pflanzen mit guter Fertilität

^b: M1-Pflanzen mit geringer Fertilität

^c: M1-Pflanzen mit geringer Fertilität und geringer Keimfähigkeit

2.2 Keimfähigkeit des M3 Saatgutes

Neben der Bestimmung der Fertilität der M2-Pflanzen wurde auch die Keimfähigkeit des M3-Saatgutes in der Population des annualen Genotyps 930190 (BB) getestet. In der M2 spalten homozygote Mutationen heraus. Für das TILLING wurde DNA nur von den Pflanzen extrahiert, von denen ausreichend M3-Saatgut (>50 Samen) mit ausreichender Keimfähigkeit (>60%) erzeugt wurde. In einem Mikrokeimtest wurden für 5788 M3-Nachkommenschaften Keimtests durchgeführt. Es wurden 10 M3-Samen je M2-Pflanze ausgelegt und die Anzahl der aufgelaufenen Keimlinge nach 6 Wochen bonitiert. Hierbei wurde ebenfalls die Farbe des Hypokotyls erfasst. Da es sich um multigermes Saatgut handelt, wurden zum Teil Keimraten von mehr als 100% beobachtet. Die Keimraten (siehe Abbildung 3) wurden in fünf Klassen eingeteilt: 0%, 10-100% (geringe Keimfähigkeit), 110-200% (mittlere Keimfähigkeit), 210-300% (gute Keimfähigkeit) und >310% (sehr gute Keimfähigkeit).

Die Samen mit mittlerer Keimfähigkeiten traten in allen Behandlungsstufen am häufigsten auf (50 bis 60%). In den Behandlungsstufen 5-9 (mit 1% EMS) wurde im Vergleich zu Behandlungsstufen 1-4 (mit 0,5% EMS) ein höherer Anteil (15-25%) von M3-Nachkommenschaften mit geringer Keimfähigkeit beobachtet. Das M3-Saatgut des Mutantensortiments hat eine ausreichend gute Fertilität und gute Keimfähigkeitsraten.

2.3 Phänotypische Charakterisierung der M2-Pflanzen

Im Jahr 2005 wurden an 5823 M2-Pflanzen neben der Fertilität und der Keimfähigkeitsrate auch die Merkmale Wuchshöhe, Wuchshabitus, Hypokotylfarbe, Chlorophylldefekt, Blattfarbe, Blattform und Keimblattzahl erfasst. Die Häufigkeiten an modifizierten Phänotypen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Häufigkeiten (%) beobachteter phänotypischer Veränderungen in 760 M2-Familien

Merkmal	M2-Familien (%)	M2-Pflanzen (%)
Wuchshöhe	20,79	3,71
Wuchshabitus ^a	3,95	0,62
Hypokotylfarbe	1,18	0,84
Chlorophylldefekt	1,23	0,27
Blattfarbe	3,68	0,58
Blattform	0,39	0,05
Keimblattzahl	4,61	0,62
Summe	35,92	6,7

^a: spätschossend

Zusammenfassend wurden in ca. 36% aller 760 M2-Familien phänotypische Veränderungen beobachtet. Die häufigsten Veränderungen wurden in der Wuchshöhe innerhalb der M2-Familien festgestellt (20,79%). Bezogen auf die M2-Einzelpflanzen, lag der Prozentsatz an Individuen mit reduziertem Wuchs bei 3,71%.

2.4 DNA-Extraktion aus M2 Pflanzen

Die DNA Extraktion erfolgte nach folgenden Kriterien:

- DNA wurde nur aus Pflanzen extrahiert, von denen mindestens 50 Samen geerntet wurden, die also über eine ausreichende Fertilität verfügten.
- Von jeder M2 Familie wurden vier Pflanzen für die DNA-Extraktion ausgewählt, um zwei Pflanzen mit ausreichend hoher DNA-Ausbeute zu erhalten und so mit hoher Wahrscheinlichkeit jede Mutation finden zu können. Theoretisch haben 75% der

Nachkommen einer M1 Pflanze das mutierte Allel. Tatsächlich wird dieser Anteil jedoch geringer sein, da Mutationen in M1 Pflanzen häufig nur chimär auftreten und nur die Mutationen vererbt werden, die in dem Gewebe auftreten, aus dem sich die Samenanlage entwickelt.

Für die Extraktion wurde wie folgt vorgegangen. Nach drei Wochen wurden die Pflanzen von je 12 Nachkommenschaften mit je 8 Einzelpflanzen in 96-Loch-Kisten pikiert. Nach 2-3 Wochen wurden von allen Pflanzen einzeln Blattproben (0,5-1g) abgenommen und in Einzelgefäßen (Eppendorfgefäßen) in einer Gefrier Trocknung getrocknet. Nach weiteren 10-14 Tagen wurde von jeder Einzelpflanze eine zweite Blattprobe zur Sicherheit gezogen. Die Blattproben wurden bis zur DNA-Extraktion bei -70°C bzw. bei 5°C in der Saatgutkammer mit reduzierter Luftfeuchtigkeit zwischengelagert.

Der Gewebeaufschluss wurde mit einem neu angeschafften Gerät (Genogrinder) deutlich verbessert. Das Pflanzengewebe (0,5-1 g) wurde in einem 2ml Eppendorfgefäß gefriergetrocknet und anschließend mit zwei Metallkugeln (Durchmesser 4 mm) im Geno/Grinder 2000 bei einer Einstellung von 1000 ($1000 \text{ Hübe min}^{-1}$) für 2 x 1 Minute gemahlen. Hierfür wurden vier Halterungen (Kunststoffblöcke), die in der eigenen Werkstatt hergestellt wurden und jeweils 24 Eppendorfgefäße fassen, in den Geno/Grinder eingespannt. Diese Art der Probenname ermöglicht eine flexible Zusammenstellung der Einzelproben. Nach Zermahlen des Gewebes zu einem feinen Pulver wurden die Proben mit 300 μl C1-Puffer versetzt und im Geno/Grinder für 30 Sekunden bei einer Einstellung von 1000 ($1000 \text{ Hübe min}^{-1}$) homogenisiert. Durch systematische Optimierungen (kombinierter Trocken- und Nassaufschluss im Eppendorfgefäß, größeres Volumen des Lysepuffers, Temperatur und Inkubationszeit der Elutionspuffers) wurden einheitlichere Ergebnisse erzielt. Es wurden Protokolle zur manuellen und robotergestützten DNA-Extraktion im 96-Mikrotiterplatten-Format entwickelt.

Insgesamt wurde aus 4358 M2 Pflanzen DNA isoliert (Abb. 1). Die DNA-Ausbeute bewegte sich zwischen 0 und 150 ng/Pflanze. Aus ca. 98% der Pflanzen wurden zwischen 100-1500 ng DNA extrahiert. Von 2 % der Pflanzen wurden weniger als 100ng DNA erhalten.

2.4.1 Erstellung von DNA-pools

Es erfolgte eine Normalisierung der DNA von 1344 (14x96) DNA-Proben auf eine Endkonzentration von 10 ng / μl durch entsprechende Verdünnung mit destilliertem Wasser. Je Probe 80 μl verdünnter DNA wurden in eine neue MTP pipettiert und getrennt bei -20°C gelagert. Danach erfolgte die Erstellung von 2x DNA-pools, indem Aliquots von 20 μl DNA zweier verschiedener Mikrotiterplatten miteinander vermischt wurden und die für die ersten TILLING-Reaktionen zur Verfügung stehen. Zum Projektende liegen 2x DNA-pools von 2672 M2-Pflanzen vor. Diese Pflanzen gehen auf 1366 M1-Einzelpflanzen zurück, die mit EMS-Konzentrationen von 0,5 und 1 % behandelt worden waren. Damit liegt eine ausreichend große TILLING Population vor, in der mit hoher Wahrscheinlichkeit Mutationen gefunden werden sollten.

Weiterhin wurden im Laufe des Projektes auch 4x DNA-pools hergestellt. Dazu wurden DNA von 2672 M2 Pflanzen gepoolt, die aus 1366 verschiedenen M2-Familien stammen.

2.5 Identifizierung von Kandidatengen für TILLING in *B. vulgaris*

Im Rahmen von GABI-TILL sollten Kandidatengene für Vernalisationsbedürfnis, Schoss- und Blühinduktion sowie Resistenzgenanaloga, Abwehrgene und Gene, die zu Samenqualität beitragen, auf Punktmutationen analysiert werden.

Wichtige Kriterien für die Auswahl von Sequenzen für das TILLING sind zum einen die Identifizierung von Sequenzinformation in Form von EST- oder genomischer Sequenz sowie deren Expression. Mit mehr als 120 Kandidatengen, die in *Arabidopsis* im Zusammenhang mit der Blütenbildung bekannt sind, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. Müller (Universität Kiel) und Dr. D. Holtgräwe (Universität Bielefeld) die über NCBI zugänglichen Sequenzdatenbanken, die Zuckerrüben-EST-Datenbank BvGI 1.0 sowie BAC-Endsequenzen aus dem GABI-Physmap-Projekt auf Sequenzhomologien durchsucht. Von ausgewählten Kandidatensequenzen ($e < 10^{-15}$) wurden Primer abgeleitet und genomische Zuckerrübenfragmente amplifiziert. Anschließend erfolgte die Sichtung einer BAC-Bank zur Identifizierung von Kandidaten-BACs mit den entsprechenden Blühgenhomologen aus der Zuckerrübe. Des Weiteren sind insbesondere *single copy*-Sequenzen für das TILLING geeignet. Hierzu wurde über Southern-Analyse die Kopienzahl von Kandidatengen bestimmt. Tabelle 3 gibt eine Übersicht der in Bearbeitung befindlichen Blühgen-Kandidaten.

Aus dem GABI-BEET-Projekt standen außerdem Sequenzinformationen aus Zuckerrüben-ESTs mit Homologie zu RGAs und Abwehrgenen zur Verfügung. Diese wurden vom MIPS funktionell annotiert und in Form der Datenbank „SPUTNIK“ katalogisiert. Aus dieser Datenbank wurden Sequenzen mit Homologien zu Genen der pflanzlichen Pathogenabwehr selektiert.

BvSWP1

In Zusammenarbeit mit Dr. A. Müller wurde ein Zuckerrüben-EST (BQ592158) mit Homologie zu *AtFLD* identifiziert. Ein mit Hilfe dieser Sequenzinformation amplifiziertes genomisches Fragment wurde im genomischen Southern getestet und als *single copy* eingestuft. Das Fragment wurde auch zur Sichtung einer BAC-Bank verwendet. Für drei BACs (DS813, DS816, DS819) konnte bestätigt werden, dass sie dem EST entsprechende Sequenzabschnitte enthalten, und das entsprechende Gen wurde über anschließendes Primer *walking* weitgehend sequenziert. Da eine vollständige Sequenzierung des Gens aufgrund von 'Low complexity'-Sequenzabschnitten über Primer *walking* nicht möglich war, wurde der gesamte BAC mit Hilfe der GS20-Technologie sequenziert. Die Analyse der Homologie und Exon-Intron-Struktur mit Hilfe der genomischen und EST-Sequenzinformation ergab, dass das untersuchte Zuckerrüben-Gen größere Ähnlichkeit zu dem *AtFLD*-Homolog *AtSWP1*, ebenfalls ein Blühzeitgen, besitzt und möglicherweise ein Ortholog dieses Gens ist. Die putative vollständige genomische Sequenz des *AtSWP1*-Homologs vom Start bis zum Stop-Codon (wie auf der Basis von Sequenzhomologie zu *Arabidopsis* und ORF vorhergesagt) beträgt 2487 bp. Das so identifizierte Zuckerrüben-Gen '*BvSWP1*' scheint kein Intron zu besitzen und stellt eine mögliche Zielsequenz für das TILLING dar. Die Sequenzierung eines PCR-Produkts des TILLING-Genotyps 930190 ergab eine lesbare Sequenz für einen grossen Bereich des Exons.

BvLD1

In Zusammenarbeit mit Dr. A. Müller wurden für das *LD*-Homologe der Zuckerrübe zwei ESTs (BQ594506 und BQ589018) identifiziert. Ein mit Hilfe dieser Sequenzinformation amplifiziertes genomisches Fragment wurde im genomischen Southern getestet und als *low copy* eingestuft. Das Fragment wurde zur Sichtung der BAC-Bank verwendet und 3 Kandidaten-BACs identifiziert, von denen zwei BACs (DS806, DS807) mittels PCR verifiziert werden konnten. Beide EST-Sequenzen konnten über Verwendung der beiden BACs DS806 und DS807 und Primer *walking* auf insgesamt 6128 Bp bzw. 4280 Bp verlängert werden. Demnach liegen die entsprechenden genomischen Sequenzen für die beiden ESTs auf diesen BACs. BAC DS807 wurde für die BAC-Sequenzierung mit der GS20-Technologie selektiert. Putative Start- und Stop-Codons wurden identifiziert. Hiernach beträgt die Länge der genomischen Sequenz von ATG bis Stop 9175 bp. Insgesamt wurden

10 Introns vorhergesagt. Damit ist diese Sequenz nur bedingt für das TILLING geeignet. Lediglich die relativ langen Exons 11 und 12 mit 624 Bp und 740 bp könnten mögliche Zielsequenzen für das TILLING darstellen.

BvFPA

In Zusammenarbeit mit Dr. D. Holtgräwe wurde für *AtBRM* ein Zuckerrüben-BAC-Ende (106051300) mit einer homologen Sequenz identifiziert. Mit Hilfe der Primerkombination BRMF1R1 wurde ein 424 Bp großes genomisches Fragment amplifiziert und direkt sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine homomorphe Sequenz; damit ließe sich dieses Fragment für das TILLING einsetzen. Das Fragment wurde im genomischen Southern als *single copy* bewertet. Gleichzeitig wurde es zur Sichtung der BAC-Bank verwendet, um die vollständige Gensequenz zu ermitteln und mit entsprechenden Primern ein singuläres Amplikon zu erzeugen. Es wurden zwei BACs (DS1008, DS1016) identifiziert und für Primer *walking* verwendet. Es wurden 3043 Bp sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigt, dass die BAC-Sequenz eine höhere Homologie zu *AtFPA* besitzt und möglicherweise das Ortholog in Zuckerrübe ist ('*BvFPA*'). Die 5'-Region des Gens wurde ermittelt, jedoch wurde der 3'-Bereich noch nicht identifiziert.

BvGII

In Zusammenarbeit mit Dr. A. Müller wurde für das *GI*-Homologe der Zuckerrübe ein EST (BQ489296) identifiziert und das entsprechende genomische Fragment amplifiziert. Die Sequenzierung ergab eine homomorphe Sequenz, womit sich dieses Fragment für das TILLING einsetzen ließe. Die Klonierung und Sequenzierung der Fragmente (4 Klone pro Amplikon) ergab ebenfalls keine Sequenzvariation, so dass *BvGII* für das TILLING verwendet wurde. Das Fragment lieferte im genomischen Southern 2 RFLP-Banden. Die Sichtung der BAC-Bank identifizierte drei BACs (DS1005, DS1015, DS1017). Die BAC-Sequenzierung lieferte eine 3020 bp-Sequenz und ein putatives Stop-Codon. Über weiteres Primer Walking wurde die genomische Sequenz auf 7248 Basenpaare mit insgesamt 6 putativen Introns erweitert, das 5'-Ende ist jedoch nicht vollständig sequenziert.

BvRGA

In Zusammenarbeit mit Dr. D. Holtgräwe wurde für das *RGA*-Homologe der Zuckerrübe ein BAC-Ende (106740800) identifiziert. Ein entsprechendes Fragment wurde amplifiziert und im genomischen Southern als *single copy* eingestuft. Die Sequenzierung ergab eine homomorphe Sequenz; damit wurde dieses Fragment auch für das TILLING eingesetzt. Die Sichtung der BAC-Bank führte zu 3 positiven BACs, wovon einer (DS1026) über PCR verifiziert werden konnte. Über Primer *walking* wurde das putative Start-Codon bestimmt. Die weitere Sequenzierung des 3'-Bereiches ergab Sequenzidentität zur Vektor-Sequenz. Das 3'-Ende des Gens ist also auf dem BAC DS1026 nicht vorhanden. Eine Sichtung der BAC-Bank mit dem 3'-Bereich der bisher ermittelten Sequenz ist erforderlich, um BACs mit dem vollständigen *BvRGA*-Gen zu identifizieren.

Zuckerrüben-Homologe für das *A. thaliana* Gen *AtCHR4*

In Zusammenarbeit mit Dr. D. Holtgräwe wurde ein Zuckerrüben-BAC-Ende (104515900) mit Homologie zu *AtPIE* identifiziert. Die Amplifizierung und Sequenzierung eines entsprechenden genomischen Fragments ergab eine heteromorphe Sequenz, womit dieses Fragment für TILLING ungeeignet erscheint. Das Fragment ergab im genomischen Southern multiple Banden. Die Sichtung der BAC-Bank lieferte sechs BACs, von denen drei (DS1019, DS1025, DS1027) über PCR verifiziert werden konnten. Die Sequenzierung über Primer *walking* lieferte eine Sequenzlänge von 4613 bp. Die Sequenzanalyse zeigt, dass die

Zuckerrüben-Sequenz eine hohe Homologie zu *AtCHR4* besitzt, ein Gen, das bisher nicht in Blühzeitkontrolle impliziert wurde.

Klonierung und Sequenzierung von genomischen Sequenzen bereits klonierter cDNAs von Zuckerrübe: *BvCO1*, *Ga3ox1* und *Ga20ox1*

Sequenzinformationen zu cDNA Klonen von Zuckerrüben-Homologen zu *AtCO* (*BvCO1*) sowie 5 Gibberellinoxidasen (*BvGA2ox1*, *BvGA3ox1*, *BvGa20ox1*, *BvGa20ox1* und *BvGa20ox3*) wurden freundlicherweise von Dr. Mutasa-Göttgens und Dr. T. Chia (*BvCO1*) bzw. Dr. S. Thomas (*BvGaox*-Gene) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde ein genomischer Klon für *BvCO1* (KI3132) von Dr. Mutasa-Göttgens erhalten.

Für *BvCO1* wurde ein BAC-Klon identifiziert und die genomische Sequenz für den in GABI-TILL eingesetzten Genotyp 930190 ermittelt und für TILLING verwendet (s.u.).

Für die Klonierung von *BvGa3ox* wurden Primer von der cDNA-Sequenz abgeleitet, um das Intron zu sequenzieren. Die Fragmente wurden in einem genomischen Southern eingesetzt und auch zur Sichtung der BAC-Bank benutzt. Es wurde ein BAC (DS1003) identifiziert und für die Sequenzierung verwendet. Die Intron-Exon-Struktur ist mit der vom *Arabidopsis*-Gen vergleichbar. Die Länge der genomischen Sequenz von ATG bis Stop-Codon beträgt 2019 bp. Für die Klonierung von *BvGa20ox* wurden ebenfalls genomische Fragmente amplifiziert, in einem genomischen Southern eingesetzt und zur Sichtung der BAC-Bank benutzt. Bei dem Fragment Ga20ox1F1R2 handelt es sich um eine *single copy*-Sonde. Es wurden 5 BAC identifiziert, von denen einer (DS828) über PCR-Analysen verifiziert wurde. Die *BvGa20ox*-Sequenz dieses BACs wurde über Primer *walking* weiter sequenziert. Die Intron-Exon-Struktur ist mit der des *Arabidopsis*-Gens vergleichbar. Das vollständige genomische Fragment ist 3351 Bp, wovon 2759 Bp das Gen von ATG bis Stop-Codon abdecken.

Bv-Homologe zu *AtVRN1* und *AtVRN2*

Zur Identifizierung von Zuckerrüben-Homologen der Vernalisationsgene *AtVRN1* und *AtVRN2* wurde eine PCR-Strategie mit Consensus-degenerierten Primerkombinationen eingesetzt. Es konnten jedoch keine Fragmente mit signifikanter Homologie identifiziert werden.

Tabelle 3: Identifizierung von Kandidatengen in Zuckerrübe.

<i>A. thaliana</i> -Gen	<i>B. vulgaris</i> EST bzw. cDNA/ BAC-Ende (Read ID)	<i>B. vulgaris</i> Kopien-zahl (lt. Southern-Analyse)	Verifizierte BACs	BAC-Subcontig-Sequenz-länge [bp]	Gen-Sequenz (ATG-Stop incl. Introns) [bp]	Homomorphe Sequenz nach PCR-Amplifikation in 930190
<i>SWP1</i> ¹	CV301493	1	DS813, DS816, DS819	7636	2487	ja
<i>LD</i> ¹	BQ594506, BQ589018	<i>low copy</i>	DS806, DS807	21994	9175	n.b.
<i>FPA</i> ¹	-/106051300	1	DS1008, DS1016	3043	n.b.	ja
<i>GI</i> ¹	BQ489296	2	DS1005, DS1015, DS1017	7248	n.b.	ja
<i>RGA</i>	TC1302/106740800	1	DS1026	1045	n.b.	ja
<i>CHR4</i>	-/104515900	<i>multi copy</i>	DS1019, DS1025, DS1027	4613	n.b.	nein
<i>CO</i> ²	cDNA	<i>low copy</i>	DS830	4018	1779	s. 2.8.3
<i>Ga3ox1</i> ³	cDNA	<i>low copy</i>	DS1003	2019	2019	s. 2.8.8
<i>Ga20ox</i> ³	cDNA	1	DS828	3351	2759	s. 2.8.4
<i>VRN1</i>	-	n.b.	n.b.	-	-	-
<i>VRN2</i>	-	n.b.	n.b.	-	-	-

¹ In Zusammenarbeit mit B. Büttner und A. Müller (Universität Kiel)

² In Zusammenarbeit mit T. Chia und E. Mutasa-Göttgens (Broom's Barn Research Centre, Bury St. Edmunds, UK)

³ In Zusammenarbeit mit S. Thomas (Rothamsted Research, Harpenden, UK)

2.6 TILLING

Zur Etablierung eines TILLING Protokolls wurde eine neue isolierte Sequenz mit Homologie zu dem *A. thaliana* Gen *CONSTANS* (*BvCo*) verwendet (Abbildung 4).

2.6.1 Nuklease-Verdauungsexperimente

Die Verdauung der Heteroduplexe kann mit verschiedenen Endonukleasen durchgeführt werden, wie Mung Bean-Nuklease oder Cel1. Das Cel1 hat den Vorteil über einen größeren pH-Bereich und wesentlich spezifischer zu spalten, was zu einem relativ geringen Hintergrundsignal führt. Andererseits ist dieses Enzym teurer als Mung Bean-Nuklease. Mung Bean Nuklease hat den Vorteil preisgünstiger zu sein, besitzt aber bei pH5 und 30°C eine Exonuklease-Aktivität, was zum Abbau der endmarkierten Farbstoffe führen kann. Die gewünschte Endonukleaseaktivität wird durch Inkubation bei 60°C und einem pH zwischen 6-7 erreicht. Momentan liegt der Preis für eine Reaktion mit Cel1 (0,1 µl/Reaktion) bei 0,27€, die Reaktion mit Mung Bean Nuklease (1U/Reaktion) bei 0,04€. Würde man das Cel1-Enzym unverdünnt einsetzen, entstünden Kosten von 2,70€/Reaktion.

Es wurden Mung Bean Nukleasen von zwei verschiedenen Herstellern getestet (Promega und NEB). Die 1,8 kb-Fragmente von *BvCO* sowie die beiden Subfragmente von 881 Bp und 842-Bp Länge (und zwar mit markierten und unmarkierten Primern) wurden eingesetzt. Der Nachweis der Spaltprodukte erfolgte im Agarosegel. Auch wurde Metaphor als Trennmatrix

ausprobiert. Neben den unterschiedlichen Mung Bean Nukleasen von NEB und Promega wurden unterschiedliche Enzymeinheiten, Puffer (NEB-Puffer, pH5; Promega-Puffer pH5; Bis-Tris-Puffer, pH6-7, 10 mM MgSO₄, 0,2 mM ZnSO₄, 20 mM Bis-Tris pH6,5, 0,002% Triton X100, 0,0002 mg/ml BSA), Temperatur (45°C, 60°C), Inkubationszeiten (10 Min., 20 Min., 30 Min.) verglichen.

Für die NEB-Endonuklease wurden 0,5-1U /Reaktion als Optimum für eine Spaltung ermittelt. Im Agarosegel waren nach Auftrennung nur ein DNA-Schmier sowie neben dem klar sichtbaren ungespaltenen 1,8 bp-Fragment das größte (1349 bp) und kleinste (495 bp) erwartete Verdauungsprodukt als leichte Bande erkennbar (Abbildung 4.) In keinem Fall konnten im Agarosegel alle zu erwartenden Fragmente deutlich nachgewiesen werden. Wurde zu wenig PCR-Produkt für die Spaltung eingesetzt, wurden keine Spaltprodukte beobachtet (vollständiger Abbau). Die markierten Amplikons waren in der Regel schlechter zu spalten als die unmarkierten. Wurden markierte und unmarkierte Produkte vor der Heteroduplexbildung und Endonuklease-Verdauung gemischt, traten keine deutlichen Banden auf.

Ein Vergleich der Mung Bean Nuklease von NEB und Promega (jeweils mit dem eigenen Puffersystem) und Spaltung der 842 (805)-Bp-BvCO-Fragmente zeigte, dass beide Endonukleasen nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 60°C die besten Produkte (Banden, wenig DNA-Schmier) lieferten (Abbildung 5). Für Promega wurden das ungespaltene 842Bp-Fragment und zwei Spaltprodukte (ca. 480 und 360 Basen) beobachtet; mit dem NEB-System trat ein zusätzliches Spaltprodukt bei 700 Basen auf. Ein Indel an der Position 482/486 wird demnach von der Endonuklease besser erkannt als einzelne SNPs und führt zu den beiden deutlichen Spaltprodukten von 482 und 360 Basenpaaren. Markierte Amplikons wurden von beiden Endonukleasen gespalten ohne eindeutige Banden zu liefern.

2.6.1.1 Optimierung der Cell Verdauungen

Das Cell1-Enzym wurde im Vergleich mit der MungBean Nuklease von NEB getestet. Es wurde das markierte und das unmarkierte 881-Bp-BvCO-Fragment gespalten. Mit der NEB-Endonuklease (1U) wurde für 20 Min. bei 60°C inkubiert. Mit der NEB-Endonuklease konnte nur das unmarkierte Spaltprodukt im Mischungsverhältnis 1:1 nachgewiesen werden. Die Cell1-Spaltung (mit 0,1 µl/Reaktion) wurde bei 45°C für 10 Minuten durchgeführt und lieferte nur geringe Mengen an Spaltprodukten. Die Cell1-Endonuklease lieferte aber Spaltprodukte für markierte und unmarkierte Amplikons in Mischungsverhältnissen von 1:1 und 1:8. Damit ist Cell1 das Enzym der Wahl (Abbildung 6).

In einem Parallelansatz wurden unterschiedliche Inkubationszeiten mit Cell1 getestet. Eine Verdauung von 10 Minuten führte zu geringen Mengen an Spaltprodukten und 16 Minuten führen zu nahezu vollständigem Abbau (Abbildung 7). Inkubationszeiten zwischen 10-16 Minuten müssen getestet werden. Einige der Proben wurden im LICOR aufgetrennt. Neben den ungespaltenen Fragmenten lassen sich im IRD700-Kanal keine eindeutigen Spaltprodukte nachweisen (nur Primerbanden bzw. Endonuklease-Hintergrund). Im IRD800-Kanal wurden für das 842 (805)-Bp-BvCO-Fragment Produkte der Größen von ca. 842, 698, 486, 482 Basen beobachtet. Dieses entspricht in etwa den zu erwarteten größeren Spaltprodukten. Für das 881-Bp-BvCO-Fragment wurde für den IRD800-Kanal ein Produkt der Größe von 392 Basen erwartet; beobachtet wurde ein ca. 470 Basen-Fragment. Nach optimierter Verdauung für 13 Minuten wurden größere Mengen an reproduzierbaren Spaltprodukten erhalten (Abbildung 8).

2.6.2 TILLING Mit BvCo

Zur Bestimmung der Mutationsrate in der Mutantenpopulation wurden zuerst 384 4x-pools, die 768 verschiedene M2-Pflanzen repräsentieren, mit zwei Primerkombinationen (BvCOF3/R3 und BvCO3F2R) für eine BvCO-ähnliche Sequenz mittels TILLING analysiert.

Hierzu wurde zunächst das Primäramplikon von 1,8 kb mit der Primerkombination BvCO1F/2R erzeugt (Abbildung 9). In einer zweiten PCR (*nested*-PCR) wurde ein kleines Fragment aus dem 5'-Bereich des Gens (863 Bp) und in einer weiteren PCR ein größeres Fragment (1070 Bp) aus dem 3'-Bereich des Gens amplifiziert. Hierzu wurden IRD-markierte Primer verwendet, die mit unmarkierten Primern in einem Mischungsverhältnis von 1:1 verwendet wurden.

Insgesamt wurde ein 1783 Bp großer Abschnitt in 1520 M2-Pflanzen gesichtet (insgesamt 2,7 Mb). Dazu kamen 1783 Bp in 192 M3-Pflanzen (342 kb). In 12 M2-DNA-*pools* wurden zusätzliche Banden gefunden. Zur Bestimmung der Nukleotidvariation in den Einzelpflanzen eines jeden positiven *pools* wurden die BvCO Genabschnitte der Einzelpflanzen mit der Primerkombination BvCO1F/2R amplifiziert und doppelsträngig sequenziert (Sequenzierprimer: BvCO1F, BvCO 2R, BvCO3F, BvCO4R, BvCOF3 und BvCOR3). Die Sequenzanalyse der 24 Einzelpflanzen für das 863 Bp-Fragment ergab eine Pflanze mit einer potentiellen Sequenzvariation (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sequenzierung von BvCO-Fragmenten von M2-Einzelpflanzen aus 4x-pools mit zusätzliche Banden.

Primer-kombination	Spur	Einzel-pflanzen-Nr. ZRT-	IRD 700-Fragment (Bp)	IRD800-Fragment (Bp)	Erwartete Größe (Bp)	Ergebnis der Sequenzierung
BvCOF3/R3	30	1874, 1878, 2741, 2744	600	80	863	Kein Polymorphismus bei 600+680
BvCOF3/R3	86	2394, 2396, 3226, 3229	370+480	470+500	863	Kein Polymorphismus bei 370+480
BvCOF3/R3	50	3721, 3724, 4705, 4708	720	Schwache Signale	863	Kein Polymorphismus bei 720
BvCOF3/R3	56	3770, 3775, 4761, 4763	720	Schwache Signale	863	Kein Polymorphismus bei 720
BvCOF3/R3	95	4113, 4116, 5089,5091	420+430	450, Schwache Signale	863	G461A + C471T
BvCOF3/R3	42	5467, 5468, 3996, 3999	810+820	60+70	863	C835T + A843T
BvCOF3/R3	44	6611	200	670	863	Kein Polymorphismus bei 200+670
BvCOF3/R3	62	6611	200	670	863	Kein Polymorphismus bei 200+670.
BvCO3F/2R	86	2394, 2396, 3226, 3229	330	510	1070	Kein Polymorphismus bei 330+510
BvCO3F/2R	50	3721, 3724, 4705, 4708	350	500	1070	Kein Polymorphismus bei 350+500
BvCO3F/2R	95	4113, 4116, 5089,5091	300+500	Schwache Signale	1070	Kein Polymorphismus bei 300+500
BvCO3F/2R	14	5211, 5213, 106, 108	530	400	1070	Kein Polymorphismus bei 530+400
BvCO3F/2R	30	5350, 5351, 2324, 2328	550+330	400+650	1070	n.b.
BvCO3F/2R	43	5477, 5478, 4138, 4139	550+330	400+650	1070	n.b.
BvCO3F/2R	15	6433, 6434, 6435, 6436	520	540	1070	n.b.
BvCO3F/2R	34	6706, 6722, 6610, 6698	520	540	1070	n.b.

n.b.: nicht bestimmt.

Die Sequenzierung des BvCO-Fragmentes für die ersten 24 Einzelpflanzen ergab nur 4 Nukleotidvariationen an den zu erwartenden Positionen. Es wurden in der BvCO-Sequenz der Pflanze ZRT-5091 zwei Transitionen (G461A und C471T) und in der BvCO-Sequenz der Pflanze ZRT-5467 je eine Transition (C835T) und eine Transversion (A843T) identifiziert. Die Abbildung 10 zeigt die zusätzlichen Banden für den Pool mit den vier Einzelpflanzen ZRT-5467, 5468, 3996 und 3999. Die Sequenzvariation entspricht den Fragmentgrößen der Heteroduplicates, da die Position der markierten Amplifikationsprimer 40 Bp vom 3'-Ende entfernt liegt. Damit konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen Banden auf einer Sequenzvariation beruhen. Eine Transversion lässt sich nicht durch die EMS-Einwirkung erklären. Die vollständige Sequenzierung der BvCO-Fragmente für die Einzelpflanzen ZRT-5091 und ZRT-5467 hat gezeigt, dass diese Pflanzen ein anderes Allel (Sequenzvariante)

besitzen. Die vollständige Sequenz dieser Haplotypen muss noch ermittelt werden. Die Sequenz für die Einzelpflanze ZRT6611 ist mit der des EMS-Genotyps identisch. Einige Bereiche der Amplikons sind nicht direkt sequenzierbar. Dieses beruht auf der Anwesenheit von Indels.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die zusätzlichen Fragmente nicht in allen Fällen auf Sequenzvariationen an einem Locus beruhten. Vielmehr trat bei der gewählten Primerkombination das Problem auf, dass mehrere Kopien der BvCo-ähnlichen Sequenz amplifiziert wurden. Inzwischen ist nämlich bekannt, dass es mindestens 10 Kopien dieser Sequenz im Rüben-Genom gibt. Daher lassen die Fragmentmuster keinen eindeutigen Rückschluss auf Mutationen zu.

2.7 Datenarchivierung

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Dr. S. Baumgart vom Institut für Informatik der CAU wurde begonnen, die Daten der Microsoft *Access* Saatgutdatenbank des Instituts für Pflanzenzüchtung in die kostenlose Quelltext offene Datenbank *MySQL* zu übertragen. Fehlende Datensätze wurden durch die Erstellung geeigneter Softwaretools ergänzt. Die Saatgut-Datenbank wurde im Zuge der Migration durch Versionsrevision und Multiuserfähigkeiten erweitert. Unter Benutzung der ODBC-Schnittstelle (*Open DataBase Connectivity*), welche *Access* bietet, wurde eine universelle Anbindung an die *MySQL*-Datenbank realisiert. *Access* dient somit als Benutzerschnittstelle mit Zugriff auf die *MySQL*-Datenbank. Hierdurch wird für Benutzer eine Möglichkeit geschaffen die neue Saatgutdatenbank zu nutzen ohne ihren gewohnten Arbeitspfad (*Access*) zu verlassen und ohne auf die Versionsrevision und Multiuserfähigkeiten einer echten *SQL*-Datenbank zu verzichten. Ein *interface-design* wurde für die Schritte *labtool database*, *TILLING* and primer *database*, PCR setup and User and Administration entwickelt. Die Phänotypdaten aus dem *TILLING*-Projekt wurden in die *SQL* Datenbank überführt. Eine Abfrage nach bestimmten Parametern ist möglich.

Des Weiteren wurde eine erste Version eines internetbasierten Ernte-Datenerfassungstools geschrieben, welches die Erfassung von Ernte-Daten mittels des Browsers in ein hinterlegtes Datenbanksystem ermöglicht. Die erfassten Daten werden mit der Saatgutdatenbank abgeglichen. Hierdurch kann eine Aktualität der Saatgut-Datenbank sichergestellt werden. Da die bisherige Datenerfassung und Auswertung im *GABI-TILL*-Projekt unter Verwendung von Microsoft-Excel erfolgte, wurden geeignete Import-/ Exportfilter erstellt, die es ermöglichen sollen, den bisherigen Weg der Auswertung unter Benutzung von Excel weiter zu verfolgen. Ergänzend sind mehrere kleinere Softwaretools entstanden, zum Beispiel zum Umbenennen großer Dateisätze sowie zahlreichen Filter- und Ergänzungsroutinen die den Datenbestand automatisiert ergänzen und konsistent halten.

2.8 Firmenausgründung

Ein weiteres Ziel des *GABI-TILL*-Projektes war die Ausgründung einer Biotech-Firma. Herr Dr. Hohmann hat zusammen mit Mitarbeitern des Koordinators Prof. Altmann in Potsdam, Herrn Dr. G. Strompen und Frau H. Wituka-Wall, erste Schritte hinsichtlich einer Existenzgründung unternommen. In Potsdam wurde in Zusammenarbeit mit der UP-Transfer im Rahmen des *INNOWATT*-Programms ein F&E-Projekt hinsichtlich der Entwicklung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Mutanten-Identifizierung beantragt und für den Zeitraum 9/2007 bis 9/2009 bewilligt. Kundenaufträge aus dem *GABI-FUTURE*-Projekt, aber auch von weiteren Interessenten aus Wissenschaft und Industrie werden hier für andere Nutzpflanzen erwartet. Ein erstes Geschäftskonzept wurde im Rahmen des Businessplanwettbewerbs Berlin-Brandenburg 2007 entwickelt und eine sehr gute 5. Platzierung im wissenschaftlich/

technischen Bereich erzielt. Eine weitere Verbesserung des Businessplanes wird durch Gespräche mit dem wissenschaftlichen Beirat, mit dem GO:INcubator und einem Coaching erfolgen. Es ist geplant, einen Antrag im Rahmen des EXIST-Gründerstipendium sowie im Rahmen des EXIST-GoBio-Förderprogramms zu stellen.

3 Vergleich des Vorhabens mit der ursprünglichen Planung

Im Teilprojekt an der Christian-Albrechts-Universität wurde erfolgreich eine TILLING Plattform der Zuckerrübe erstellt. Es liegt DNA von einer ausreichenden Zahl von M2-Pflanzen vor, mit der eine Suche nach Mutationen in beliebigen Sequenzen durchgeführt werden kann. Allerdings handelt es sich um eine offen abgeblühte Population, wie sie für den Fremdbefruchter Zuckerrübe typisch ist. Derartige Populationen verfügen über eine gewisse Heterogenität und Heterozygotie, welche das Auffinden von Mutationen nach der TILLING Methode erschweren. Daher soll in einem Nachfolgeprojekt eine zweite Population auf der Basis einer mutagen behandelten DH-Linie erstellt werden. Nach wie vor handelt sich bei der hier erstellten Population um die erste und einzige TILLING Plattform für Zuckerrübe.

Das Ziel, eine Reihe von Mutationen für Blühgene der Zuckerrübe zu identifizieren, konnte noch nicht erreicht werden. Es wurde eine Sichtung der EMS-Mutantenpopulation mit 6 verschiedenen Kandidatengen und 11 verschiedenen Amplikons durchgeführt, aber es konnte nur ein Mutant identifiziert werden. Dies liegt an der Komplexität der Heteroduplexanalyse in einem fremdbefruchtenden Organismus, wofür abgewandelte Protokolle erarbeitet werden müssen sowie an den gewählten Primerkombinationen, die in den meisten Fällen zur Amplifikation multipler Sequenzen führten. Vor allem ist dies aber dadurch begründet, dass wir uns zunächst auf die Erstellung der Population sowie die Erzeugung der DNA-pools konzentriert haben. Weiterhin wurden eine Reihe von Genkandidaten erstmals im Zuckerrüben genom beschrieben, die nun für das TILLING zur Verfügung stehen (z. B. BvLD, BvFLK, BvFVE, BvFLC, BvTON1).

4 Anhang

4.1 Abbildungen

Abbildung 1: Erzeugung von Nachkommenschaften EMS-behandelter Pflanzen der Population 930190.

Abbildung 2: M2-Familien mit verminderter Fertilität, Sterilität und Letalität.

Abbildung 3: Keimfähigkeit (%) von M3-Samen.

Abbildung 4: TILLING mit CO-Amplikons und M13-Primern.

Abbildung 5: TILLING mit CO-Amplikons und M13-IRD Primern.

Abbildung 6: TILLING mit CO-Amplikons und M13-IRD Primern.

Abbildung 7: Einfluss von Cel1-Inkubationszeiten.

Abbildung 8: Optimierung der Cel1-Behandlung.

Abbildung 9: TILLING von 4xpools für Bv CONSTANS.

Abbildung 10: TILLING von BvCO.

Kurzfassung

In dem Projektteil Kiel des GABI TILL Verbundes wurden 3238 EMS-behandelte Zuckerrüben vermehrt und M2 Saatgut geerntet. Insgesamt 12.400 M2 Pflanzen wurden im Feld angebaut und von 4358 Pflanzen wurde DNA isoliert und M3-Saatgut gewonnen. Die DNA wurde in 4x-pools aufgeteilt und steht für das routinemäßige TILLING zur Verfügung. Die Pflanzen wurden hinsichtlich Fertilität und Wüchsigkeit untersucht und ein Protokoll für die optimale EMS Behandlung von Zuckerrüben wurde erstellt. Von 11 Blühgenen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden Sequenzhomologe im Zuckerrübenengenom identifiziert. Damit wurde eine wichtige Ressource für die Züchtung von Winterrüben mit kontrollierten Blüh- und Schosseigenschaften geschaffen. Mit zwei dieser Blühgenkandidaten wurden erste TILLING Versuche durchgeführt und es konnte eine Mutante für ein BvCo-ähnliches Gen identifiziert werden. Durch die Nutzung einer offen abblühenden Population für das TILLING erwachsen jedoch technische Schwierigkeiten, die durch angepasste Nuklease-Verdauungsprotokolle und optimierte Primerkombinationen überwunden werden müssen. Daher konnte noch keine routinemäßige Sichtung der TILLING Ressource nach neuen Sequenzvarianten durchgeführt werden. Alle Daten wurden in einer Datenbank gespeichert und stehen für zukünftige Arbeiten zur Verfügung.

Population 930190

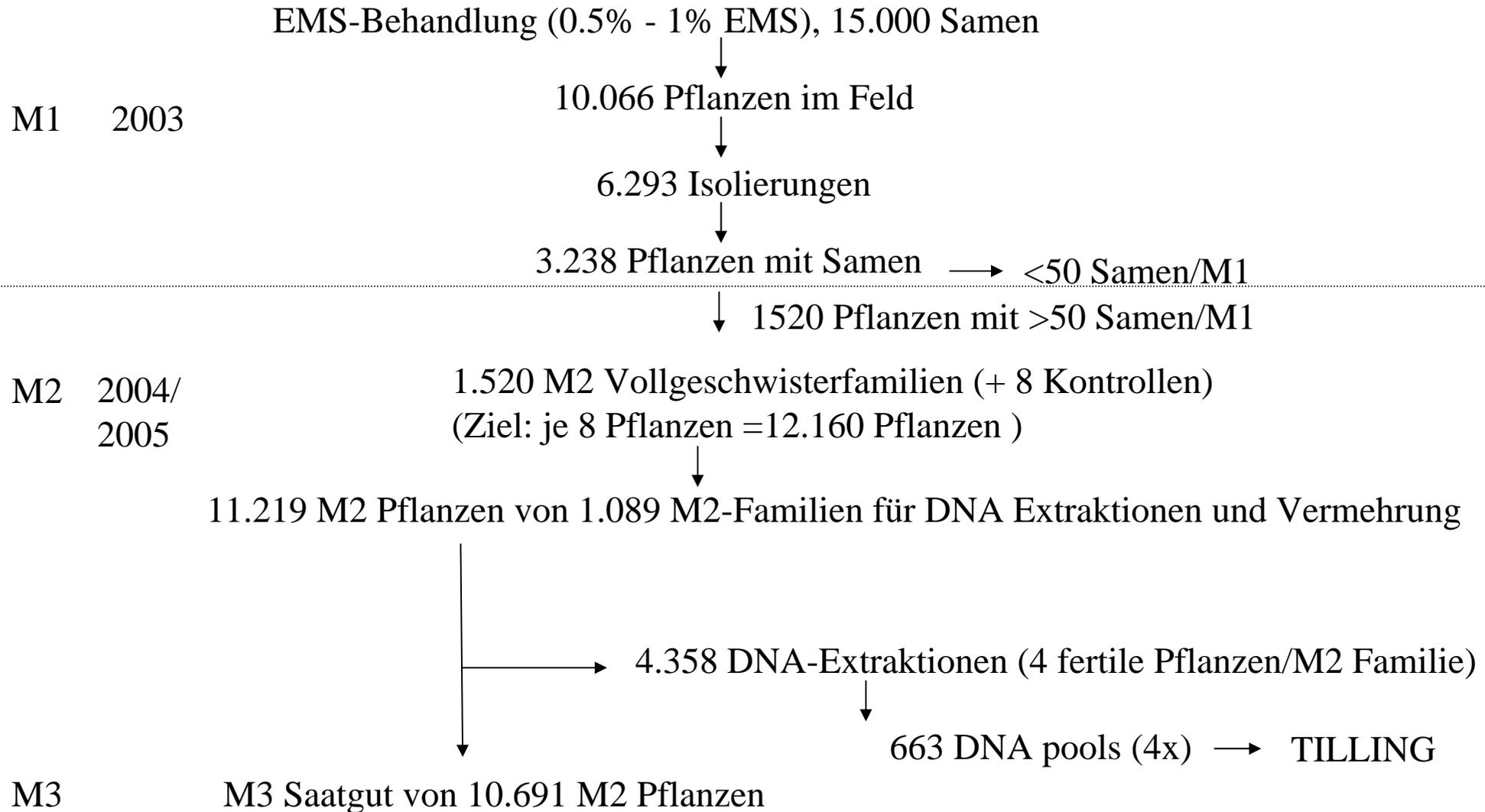


Abbildung 1: Erzeugung von Nachkommenschaften EMS-behandelter Pflanzen der Population 930190.

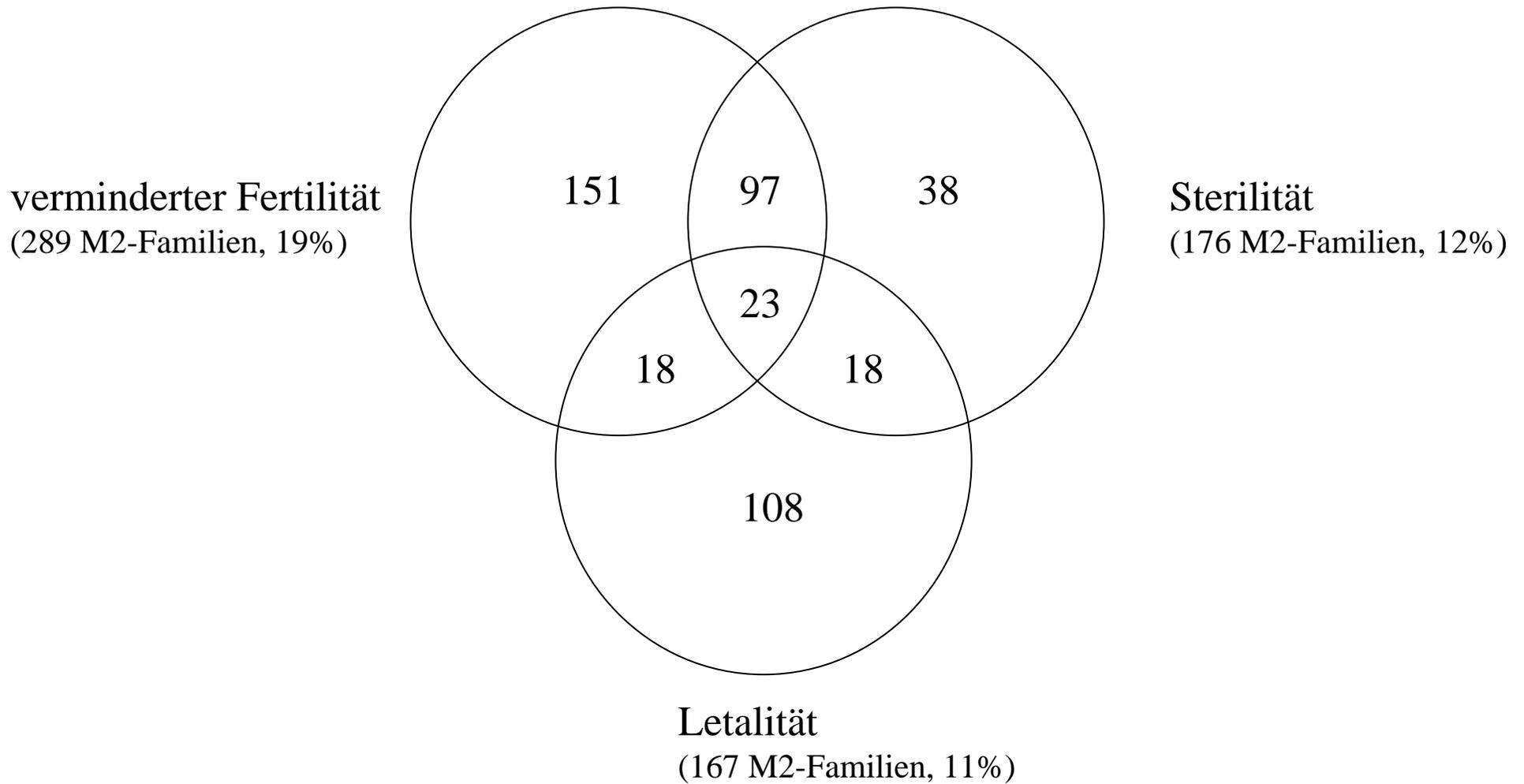


Abbildung 2: M2-Familien mit verminderter Fertilität, Sterilität und Letalität

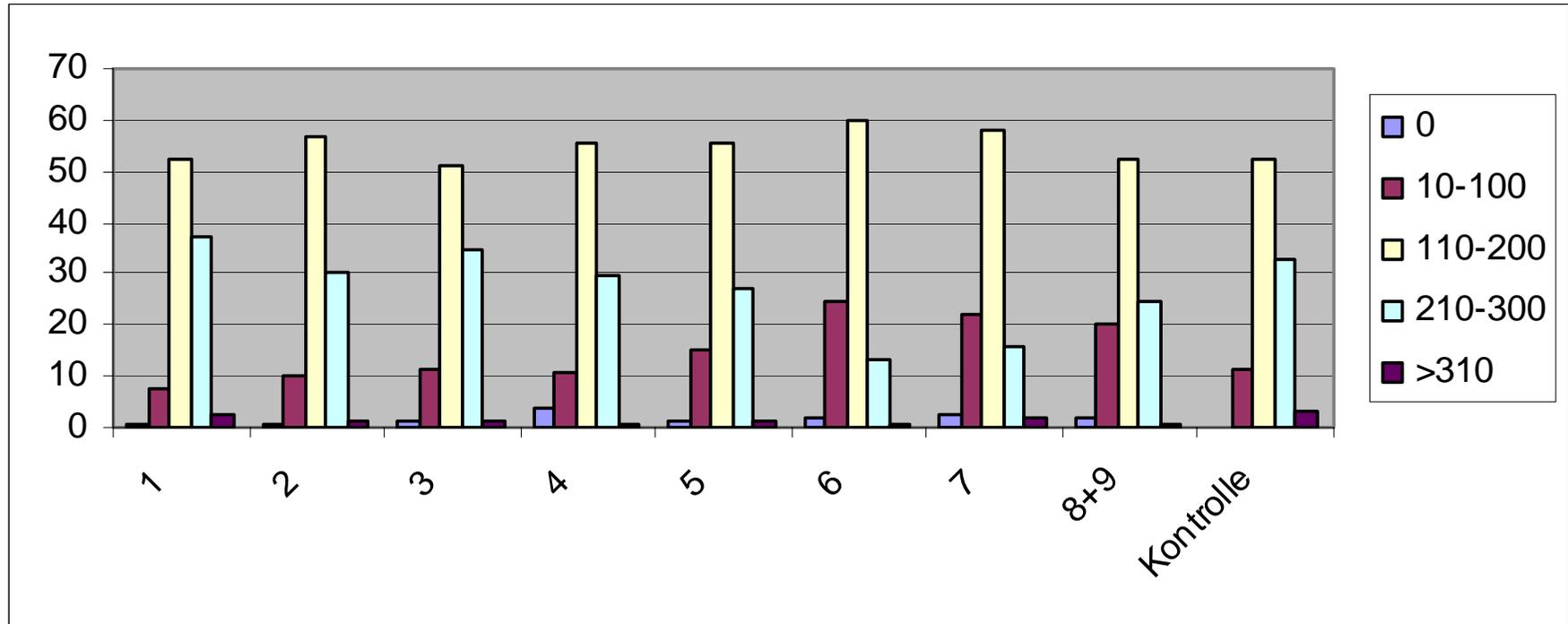
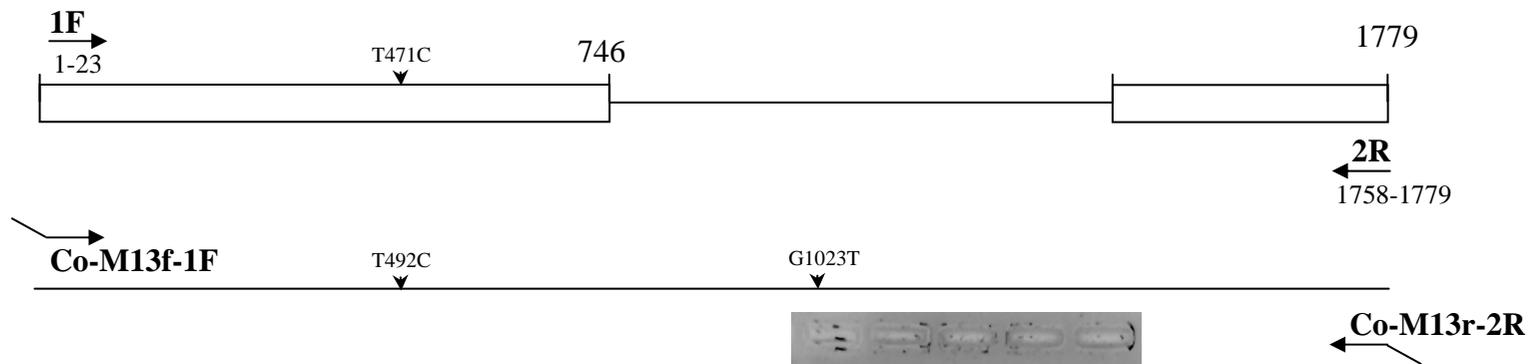


Abbildung 3: Keimfähigkeit (%) von M3-Samen. Die M2-Pflanzen wurden nach den unterschiedlichen Behandlungsstufen (1-9) gruppiert.

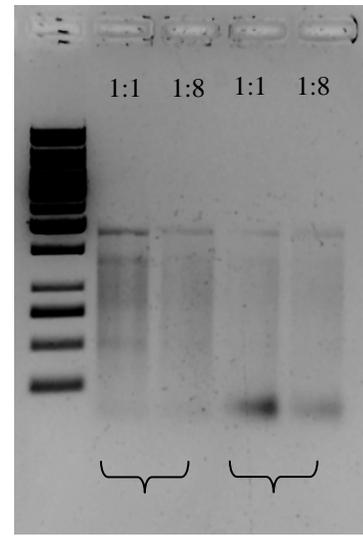
BvCO genomisch
(1779 bp)



PCR und
Heteroduplex

Endonuklease-
Behandlung

Mung Bean (NEB)
0.5 U / rxn
20', 60°C



Erwartete
Fragment-
größen (Bp)

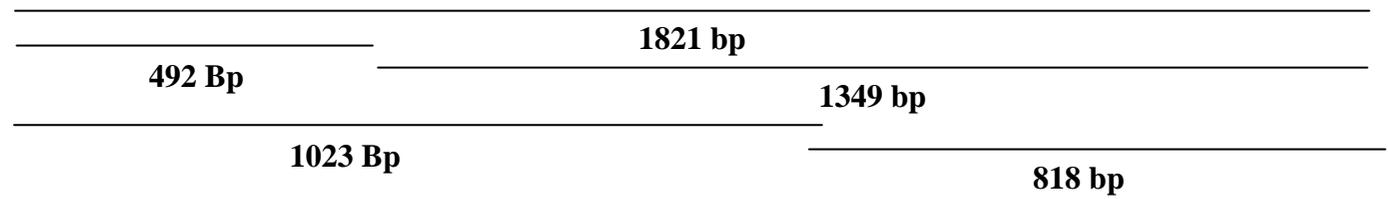
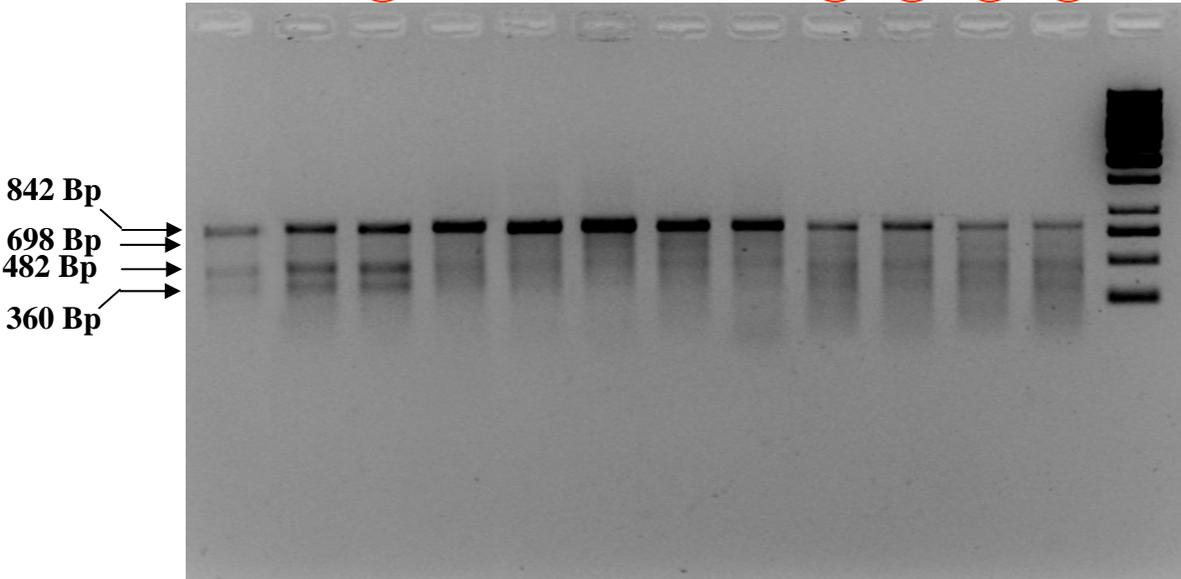
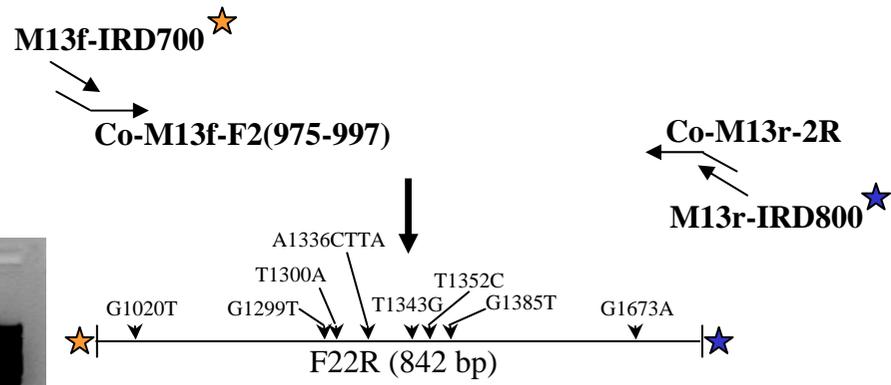
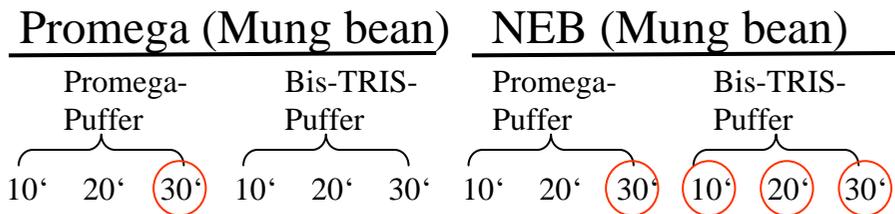
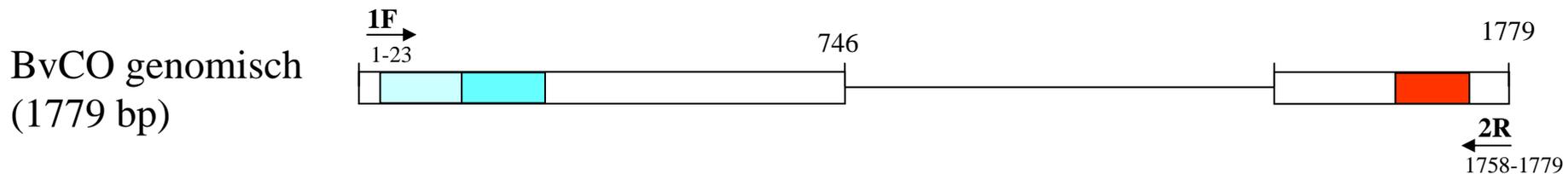


Abbildung 4: TILLING mit CO-Amplikons und M13-Primern



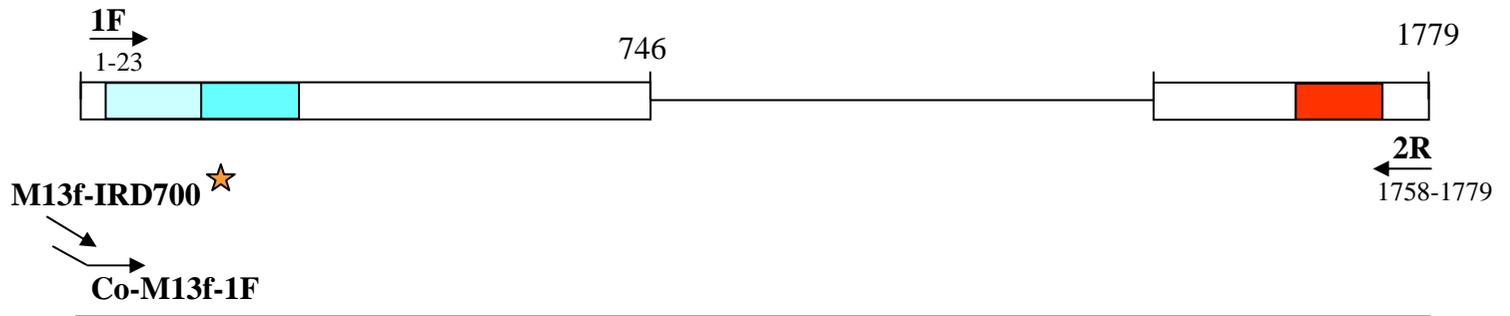
842 (806) Bp-BvCO-Fragment	
IRD700	IRD 800
46 (28)	796 (777)
325 (308)	517 (500)
326 (309)	516 (499)
360 (342)	482 (463)
409 (391)	433 (414)
416 (398)	426 (407)
425 (407)	417 (398)
698 (680)	144 (125)
842 (805)	842 (805)

Indel

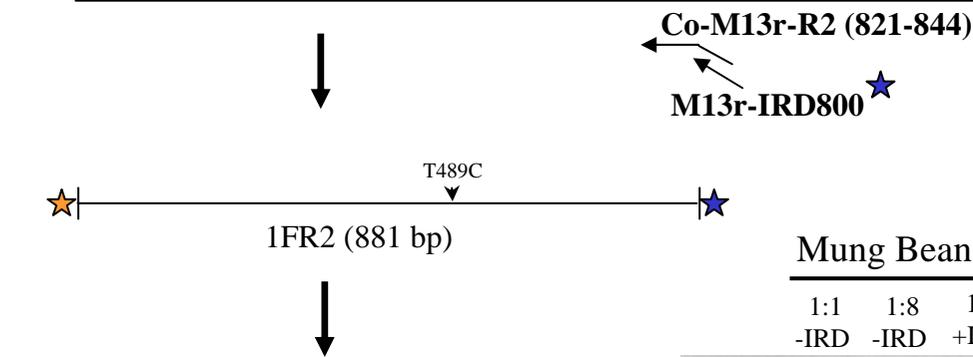
- Zn-Finger (B-BoxI)
- Zn-Finger (B-BoxI)
- CCT-Domäne
- Bevorzugte Endonuklease-Behandlung
- Beobachtete Endonuklease-Fragment

Abbildung 5: TILLING mit CO-Amplikons und M13-Primern

BvCO genomisch
(1779 bp)



TILLING



Fragment
sizes (bp)

- ★ IRD700: 489, 881 (mit M13)
- ★ IRD800: 392, 881 (mit M13)

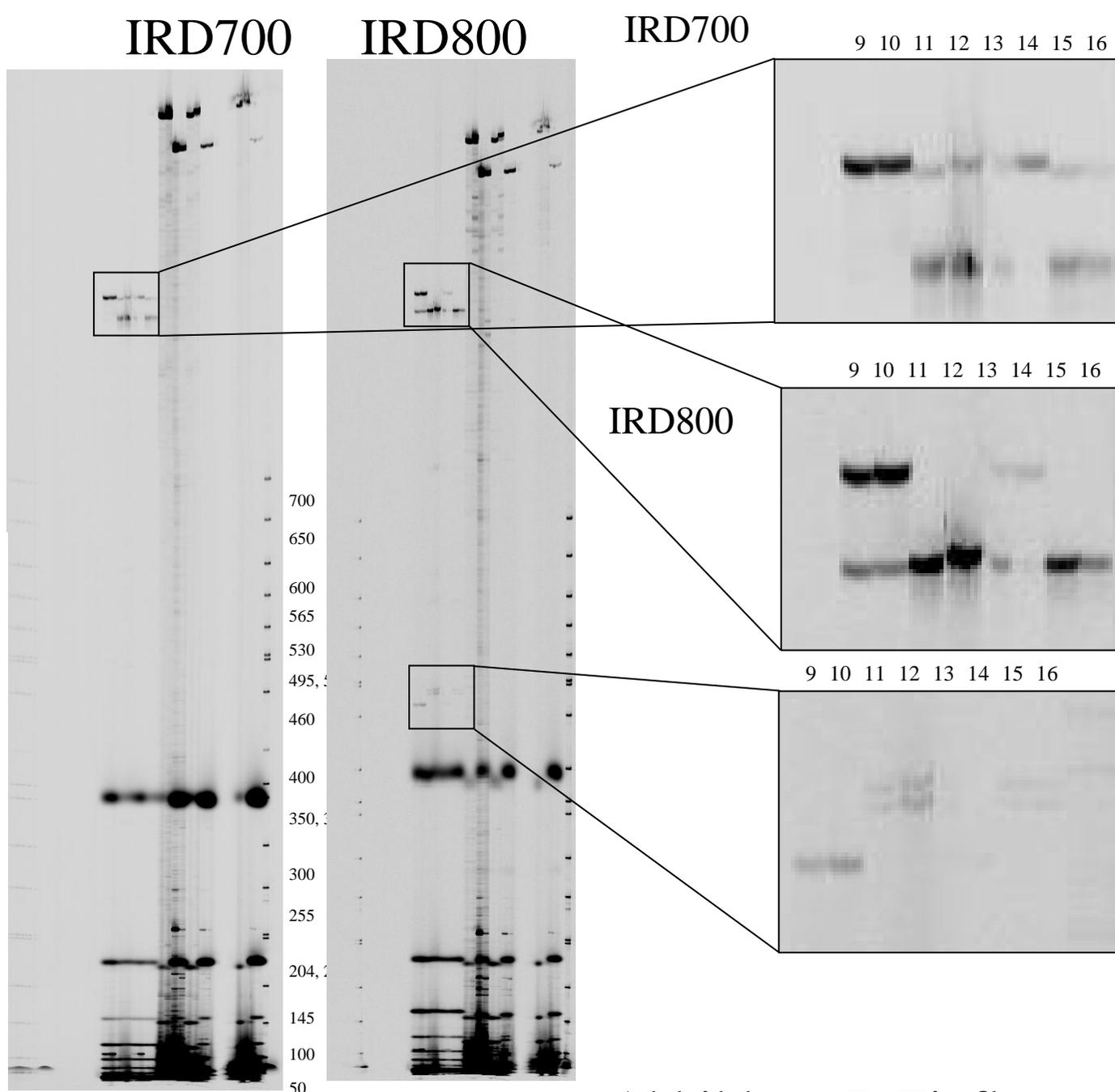
Mung Bean (NEB): 1U, 20', 60°C
Cell (Surveyor): 0,1ul, 10', 45°C

- Zn-Finger (B-BoxI)
- Zn-Finger (B-BoxI)
- CCT-Domäne

Mung Bean (NEB)				Cell (Surveyor)			
1:1	1:8	1:1	1:8	1:1	1:8	1:1	1:8
-IRD	-IRD	+IRD	+IRD	-IRD	-IRD	+IRD	+IRD



Abbildung 6: TILLING mit CO-Amplikons und M13-Primern

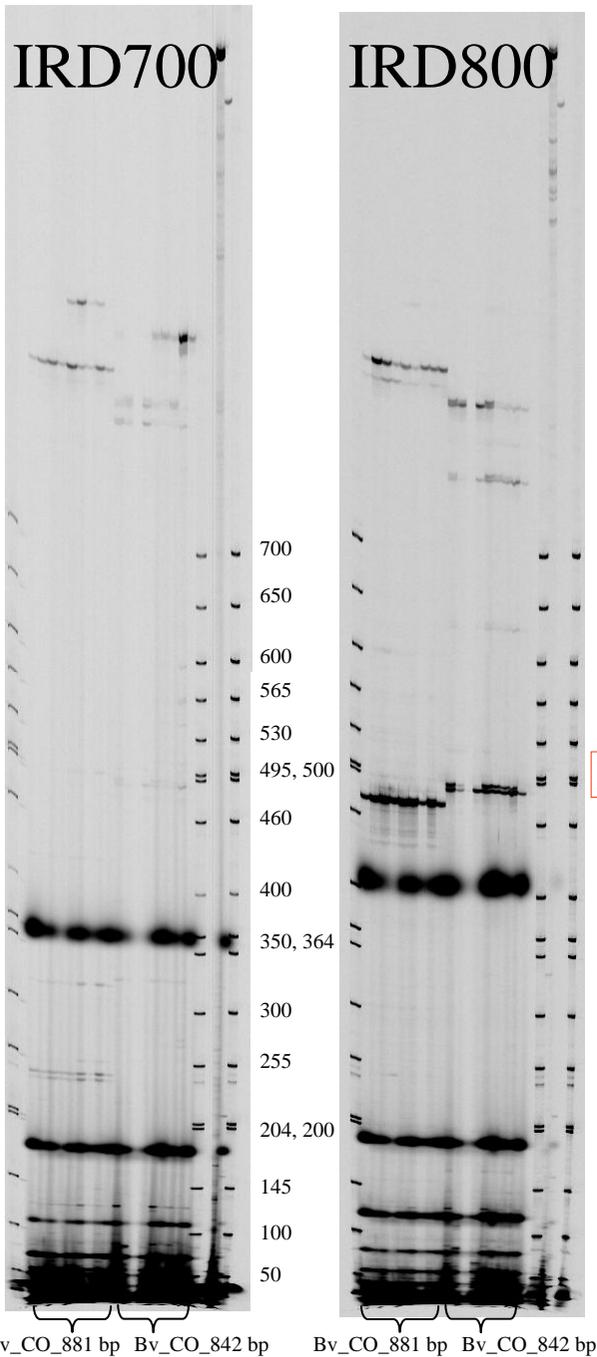


Spur	Fragment Bv_CO	Cell	Pool-tiefe
9	881 Bp	10'	1:1
10	881 Bp	10'	1:2
11	842 Bp	10'	1:1
12	842 Bp	10'	1:2
13	881 Bp	16'	1:1
14	881 Bp	16'	1:2
15	842 Bp	16'	1:1
16	842 Bp	16'	1:2

- Nur 482/486-Fragmente (Indel) im IRD800-Kanal sind nachweisbar,
- im IRD700-Kanal: Cell1-Signal bei 360bp
- Cell1-Behandlung:
 0,1 ul, 10', 45°C: zu kurze Verdauung
 0,1 ul, 16', 45°C: zu lange Verdauung

Lanes 9-16

Abbildung 7: Einfluss von Cell1-Inkubationszeiten



Spur	Fragment Bv_CO	Pool	Pool-tiefe
1	881 Bp	Gen.	1:1
2	881 Bp	Gen.	1:2
3	881 Bp	Gen.	1:8
4	881 Bp	Gen.	1:16
5	881 Bp	Plas.	1:1
6	881 Bp	Plas.	1:2
7	881 Bp	Plas.	1:8
8	881 Bp	Plas.	1:16
9	842 Bp	Gen.	1:1
10	842 Bp	Gen.	1:2
11	842 Bp	Gen.	1:8
12	842 Bp	Gen.	1:16
13	842 Bp	Plas.	1:1
14	842 Bp	Plas.	1:2
15	842 Bp	Plas.	1:8
16	842 Bp	Plas.	1:16

881 (844) Bp-BvCO-Fragment	
IRD700	IRD 800
489 (471)	392 (373)
881 (844)	881 (844)

842 (806) Bp-BvCO-Fragment	
IRD700	IRD 800
46 (28)	796 (777)
325 (308)	517 (500)
326 (309)	516 (499)
360 (342)	482 (463)
409 (391)	433 (414)
416 (398)	426 (407)
425 (407)	417 (398)
698 (680)	144 (125)
842 (805)	842 (805)

Indel

- Nur 482/486-Fragmente (Indel) im IRD800-Kanal sind nachweisbar, im IRD700-Kanal: Cell-Signal bei 360bp
- Fragment-Muster mit Plasmid- und genomischen pools (1:1 – 1:16) sind identisch
- Cell1-Behandlung: 0,1 ul, 13', 45°C: optimierte Verdauung

Abbildung 8: Optimierung der Cell1-Behandlung

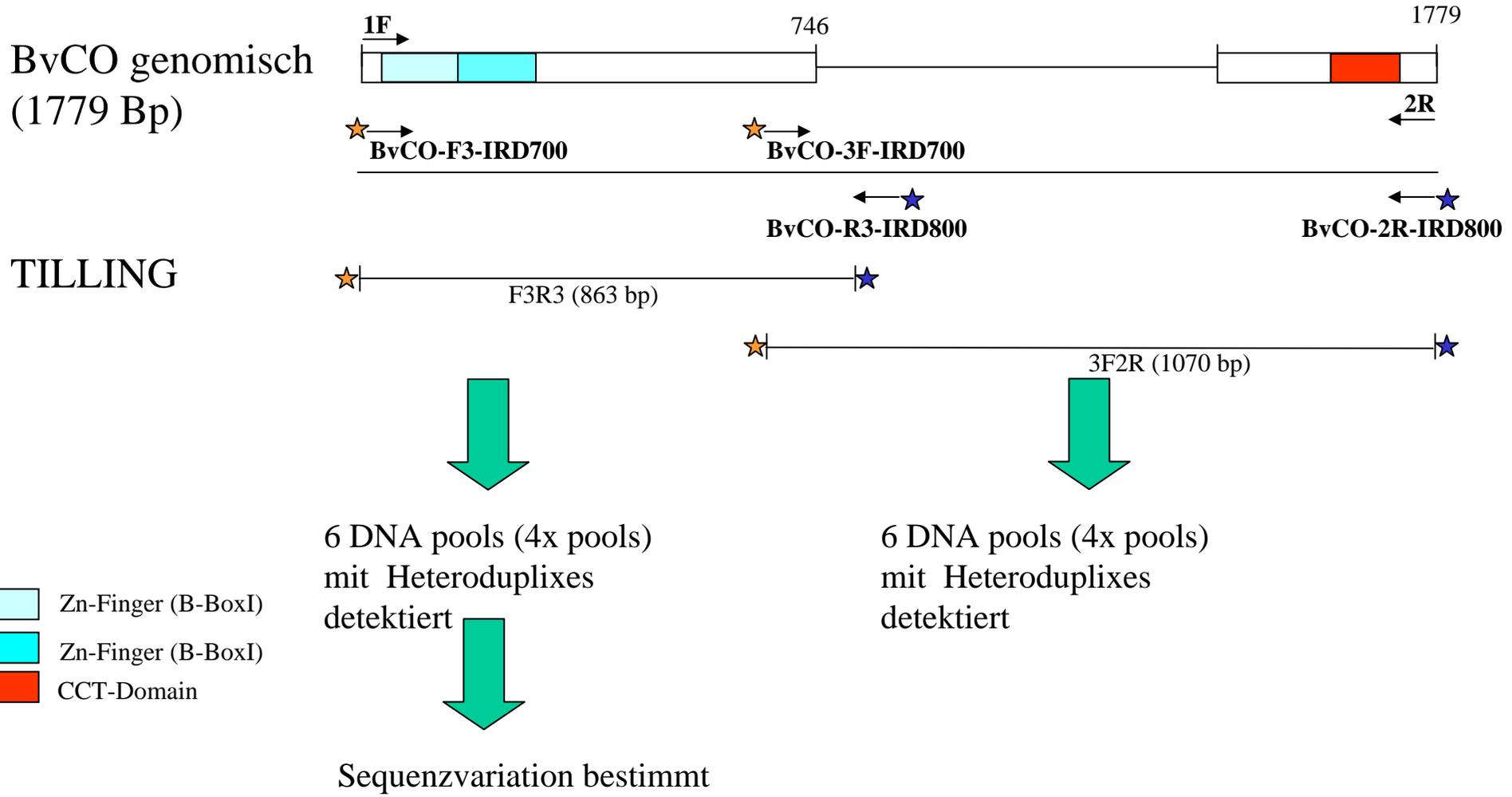
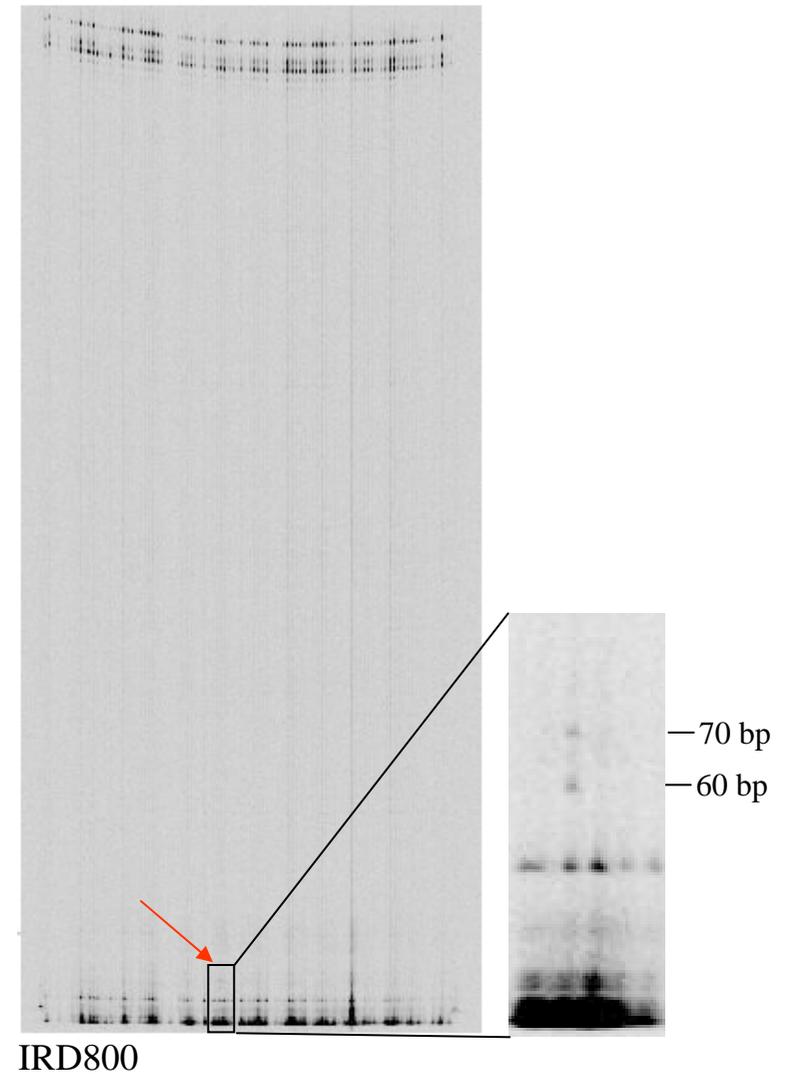
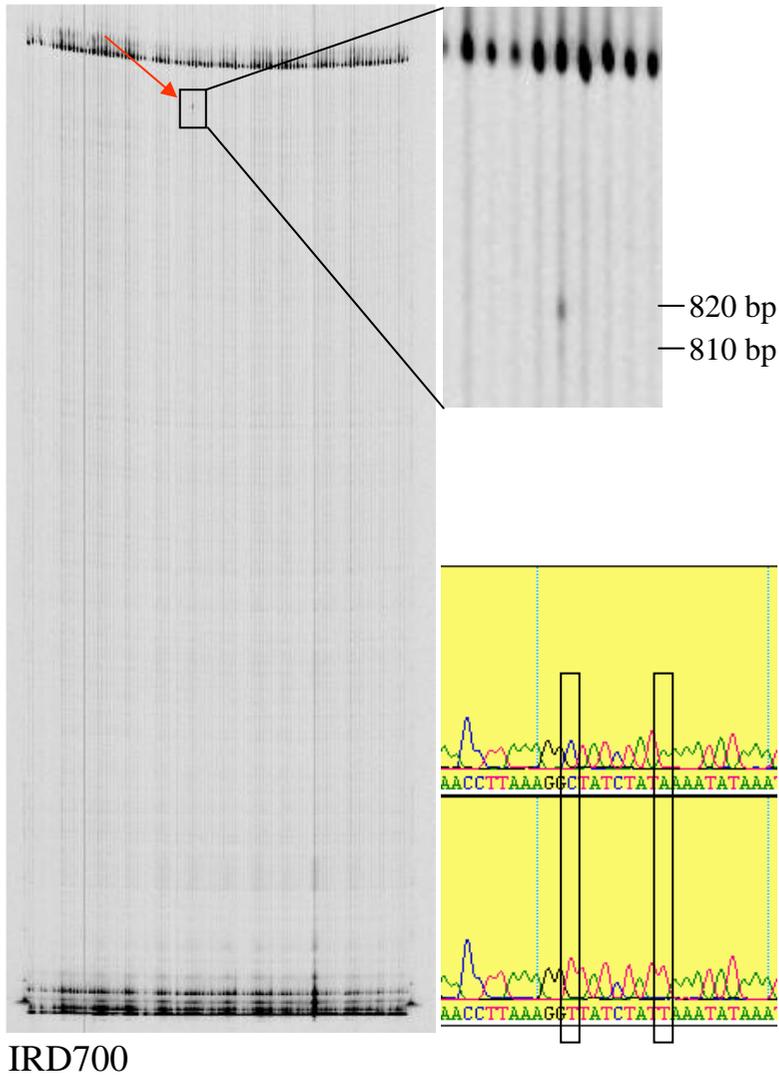


Abbildung 9: TILLING von 4xpools für Bv CONSTANS

Primerkombination:
BvCOF3R3

DNA pool:
4xP_004_42

Sequenz
Polymorphismus:
ZRT_5467



Gellauf: ZRT_MTP_4xP_004_BvCOF3R3_170706

Abbildung 10: TILLING von BvCO