

## **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. 2007<sup>1</sup>

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 M<sub>2</sub>-Pflanzen identifiziert. Aus dem Restsaatgut von ca. 200.000 M<sub>2</sub>-Samen, die auf ca. 2000 unterschiedliche M<sub>1</sub>-Pflanzen zurückgehen, werden M<sub>2</sub>-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 (%)
<b>0,5 % EMS:</b>					
	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)
<b>1 % EMS:</b>					
	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 <sup>a</sup>	877 (83,7)	91 (8,7)	53 (5,1)	27 (2,6)
	12 <sup>b</sup>	1858 (86,5)	112 (5,2)	85 (4,0)	94 (4,4)
	12 <sup>c</sup>	98 (87,5)	6 (5,4)	3 (2,7)	5 (4,5)
<b>Summe (%)</b>		<b>10033 (89,4)</b>	<b>658 (5,9)</b>	<b>298 (2,7)</b>	<b>230 (2,1)</b>
	Kontrolle	<b>104 (96,2)</b>	<b>1 (1,0)</b>	<b>1 (1,0)</b>	<b>1 (1,9)</b>

<sup>a</sup>: M1-Pflanzen mit guter Fertilität

<sup>b</sup>: M1-Pflanzen mit geringer Fertilität

<sup>c</sup>: 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

<b>Merkmal</b>	<b>M2-Familien (%)</b>	<b>M2-Pflanzen (%)</b>
Wuchshöhe	20,79	3,71
Wuchshabitus <sup>a</sup>	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
<b>Summe</b>	<b>35,92</b>	<b>6,7</b>

<sup>a</sup>: 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 Gefriertrocknung getrocknet. Nach weiteren 10-14 Tagen wurde von jeder Einzelpflanze eine zweite Blattprobe zur Sicherheit gezogen. Die Blattproben wurden bis zur DNA-Extraktion bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bzw. bei  $5^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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 / $\mu\text{l}$  durch entsprechende Verdünnung mit destilliertem Wasser. Je Probe 80  $\mu\text{l}$  verdünnter DNA wurden in eine neue MTP pipettiert und getrennt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Danach erfolgte die Erstellung von 2x DNA-pools, indem Aliquots von 20 $\mu\text{l}$  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.