Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbundvorhaben: Züchterische Optimierung von Spezialstärken; Teilvorhaben 1: Züchtung

Teilvorhaben 2: Erbgut-Analytik

Teilvorhaben 3: Stärkeanalytik

Zuwendungsempfänger:

BIOPLANT-Biotechnologisches Forschungslabor GmbH

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte OEkologie IME

Emsland-Stärke GmbH

Förderkennzeichen:

22006608 / 08NR066

22006708 / 08NR067

22006808 / 08NR068

Laufzeit:

01.10.2010 bis **30.09.2013**

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMELV für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Ziele (Kurze Darstellung)
I.1. Aufgabenstellung 3
I.2.Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde 3
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens 4
I.3.1. Definition gewünschter Amylopektinqualitäten 4
I.3.2. Suche nach vorhandenen ssII/ssIII-Allelen für die Züchtung von Sorten mit gewünschten Amylopektinqualitäten und Entwicklung Molekularer Marker 4
I.3.3. Erzeugung von neuen sII/ssIII-Allelen für die Züchtung von Sorten mit gewünschten Amylopektinqualitäten mittels EMS-Mutagenese 4
I.4. wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde 5
I.4.1. Stärke-Eigenschaften 5
1.4.2. ssII- und ssIII-Gene 6
I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 6

II. Ergebnisse (Eingehende Darstellung)
II.1. erzielte Ergebnisse (wissenschaftlich-technische Ergebnisse, erreichte Neben-Ergebnisse, wesentliche Erfahrungen) 7
AP1.1) Knollenproduktion mit den HAP-Klonen 7
AP1.2) Stärkeisolierung und Analysen 10
AP2.1) Analytik der ssII- und ssIII-Allele in den *cases* und *controls* 12
AP2.2) Ermittlung von single nuclotide polymorphisms 14
AP2.3) Entwicklung einer Marker-gestützen Selektion 14
AP3.1) Identifizierung kompatibler Kreuzungspartner 15
AP3.2) Kreuzung & Samenproduktion 19
AP3.3) EMS-Mutagenese & Knollenpassage 20
AP3.4) Pflanzenanzucht, Blatternte 21
AP3.5) HTS-Analytik der ssII- und ssIII-Gene 22
AP3.6) In-Kulturnahme von Mutationsklonen 25
AP3.7) Einführung in das HAP-Züchtungsprogramm 25
II.2. Verwertung (der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschrittenen Verwertungsplanes) 27
II.3. Erkenntnisse von Dritten (während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen) 28
II.4. Veröffentlichungen (die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses) 28

Literatur 29

I. Kurze Darstellung

I.1. Aufgabenstellung

Zur Gewinnung von Stärke kommen in Deutschland Mais, Weizen und Kartoffeln zum Einsatz, wobei die Kartoffelstärke aufgrund ihrer leichten Gewinnbarkeit und geringerer Verunreinigungen mit Nebenbestandteilen wie Fett und Eiweiß, Vorteile gegenüber den anderen Stärkearten besitzt. Zudem haben die Stärkekörner der Kartoffel einen relativ hohen Phosphatgehalt, der bei verschiedenen Anwendungen von Vorteil ist. Die Kartoffelstärke besteht zu 80% aus dem hochverzweigten Amylopektin. Dieses Molekül eignet sich hervorragend für unterschiedliche, technische Anwendungen, so dass die Erstellung von Amylopektinsorten ein wichtiges Züchtungsziel ist. Amylopektinklone wurden im Rahmen des FNR-geförderten Verbund-projektes „Züchtung von Kartoffeln mit Spezialstärken“ erfolgreich gezüchtet.

Amylopektin ist ein hochverzweigtes Glucose-Polymer aus alpha-1,4-Ketten und alpha-1,6-Verzweigungen. Das Molekül hat eine polymodale Verteilung der Seitenkettenlängen mit etwa 12-16 (A-Ketten), 20-24 (B1-Ketten), 69-75 (B3-Ketten) und 101-119 (B4-Ketten) Glucoseeinheiten. Lösliche Stärkesynthasen (*soluble starch synthases*) katalysieren die Verlängerung der alpha-1,4-Ketten im Amylopektin-Molekül. Unterschiedliche Stärkesynthasen sind verantwortlich für die Bildung spezifischer Längen der Seitenketten. Kommt es zum Beispiel zur Inaktivierung der Stärkesynthase III, so ist im Amylopektinmolekül die Anzahl an Seitenketten im Bereich von 15-30 Glucoseeinheiten reduziert (**sh. Abb.1**).

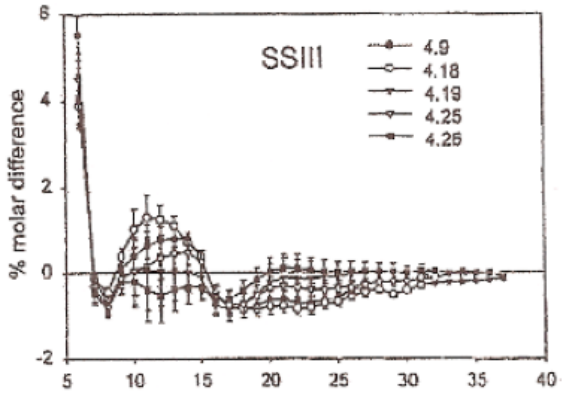


Abb.1.: Inaktivierung des ssIII-Gens
Edwards et al. (1999) inaktivierten das ssIII-Gen mittels gentechnischer Methodik in Amylopektin-Kartoffeln. Die isolierte Stärke wurde entzweigt und die Länge der Seitenketten untersucht. Hier ist der molare Unterschied von verschiedenen transgenen Linien mit inaktiviertem ssIII-Gen im Vergleich zu Amylopektinstärke aus Kartoffeln mit ssIII-Genaktivität gezeigt.

Dies hat einen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften von Amylopektinlösungen und somit auf deren technische Verwendungsmöglichkeiten. Eine zusätzliche Inaktivierung der Stärkesynthase II führt zur Bildung von Amylopektinstärken, die resistent sind gegenüber Gefrier-Tau-Zyklen. Wie oben beschrieben, liegen Zuchtklone vor, die Amylopektinstärke bilden. Ziel dieses Projektes war es, diesen Wert- und Werkstoff züchterisch so zu optimieren, dass für die verschiedenen technischen Anwendungen optimierte Qualitäten zur Verfügung gestellt werden können.

I.2.Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Kartoffelzüchtung und insbesondere auch der nachgelagerte Bereich der Stärkeindustrie befindet sich in einem starken internationalen Wettbewerb. Somit sind neue Züchtungstechniken zur Erstellung von Kartoffeln mit neuen und/oder optimierten Inhaltsstoffen gefragt. Neue Rohstoffqualitäten und Anwendungsbereiche sind essentielle Instrumente zur Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit der deutschen Landwirtschaft und der nachgelagerten Bereiche. So erhielten die Landwirte bis 2005 von den Stärkefabriken

den von der EU festgelegten Mindestpreis für die angelieferten Kartoffeln (EG 2236/2003). Zusätzlich wurde eine an den Stärkegehalt gebundene Beihilfe der europäischen Gemeinschaft über die Fabrik gezahlt (EG 2237/2003 und EG 1782/2003). Danach wurde die produktbezogene Beihilfezahlung jedoch zugunsten einer 10%igen Betriebsprämie und einer 30%igen regionalen Einheitsprämie grundsätzlich auf 60% gekürzt. Die Betriebsprämie blieb bis zum Jahr 2007/2008 konstant und ging dann degressiv bis zum Jahr 2012 in die regionale Einheitsprämie über. Um auch unter den sich ändernden Rahmenbedingungen im internationalen Wettbewerb kompetitiv zu arbeiten, ist die Entwicklung neuer Rohstoffqualitäten eine wichtige Voraussetzung. Die Voraussetzung für dieses Projekt war somit die Nachfrage des Marktes nach Stärken mit neuen Produkteigenschaften.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

I.3.1. Definition gewünschter Amylopektinqualitäten

In dem Verbundprojekt „Züchtung von Kartoffeln mit Spezialstärken“ waren mittels klassischer Züchtung **H**och**A**mylo**P**ektin-Klone (**HAP**-Klone) erstellt worden. Wie unter 1.1 erläutert, sollte diese HAP-Stärke für die verschiedenen Anwendungen weiter optimiert werden.

Es wurde eine Analyse-Methodik entwickelt, um neue Amylopektinqualitäten prüfen zu können. Durch die Analyse von Stärken aus Pflanzen mit inaktivierten Stärkesynthase-Genen konnte gezeigt werden, dass diejenigen HAP-Stärken gewünschte Eigenschaften aufzeigen, in denen die langen Seitenketten fehlen (inaktiviertes ssIII-Gen).

Somit erscheint es nach diesen Ergebnissen sinnvoll, die ssII- und ssIII-Gene auch einzeln in Kombination mit dem Merkmal HAP-Stärke zu inaktivieren.

I.3.2. Suche nach vorhandenen ssII/ssIII-Allelen für die Züchtung von Sorten mit gewünschten Amylopektinqualitäten und Entwicklung Molekularer Marker

Im untersuchten Material konnten keine inaktiven ssII- und/oder ssIII-Allele gefunden werden. Die Ziele 2 (Suche nach vorhandenen, inaktiven Allelen) und Ziel 3 (Erzeugung neuer, inaktiver Allele) waren komplementär zueinander. Die Bearbeitung der beiden Zielsetzungen sollte die Wahrscheinlichkeit auf einen Projekterfolg erhöhen. Tatsächlich konnten unter Zielsetzung 3 die gewünschten Allele gefunden werden (sh. unten), so dass auch dieser Projektteil als erfolgreich angesehen werden kann.

I.3.3. Erzeugung von neuen sII/ssIII-Allelen für die Züchtung von Sorten mit gewünschten Amylopektinqualitäten mittels EMS-Mutagenese

In diesem Projektteil kam die TILLING-Methodik zum Einsatz. In dem FNR-geförderten Projekt „Neue Wege zur Erstellung und Nutzung von Spezialstärken“ war die TILLING-Methode für die Kartoffel entwickelt worden, um neue und speziell inaktive Allele von Zielgenen zu erzeugen. Mit dieser Methodik konnten im vorliegenden Projekt für das ssII-Gen erfolgreich 33 diploide Klone mit *missense*- und 3 Klone mit *nonsense*-Mutation identifiziert werden. Für das ssIII-Gen wurden 54 diploide Klone mit *missense*- und ebenfalls 5 Klone mit *nonsense*-Mutation identifiziert.

Die Klone mit *stop codons* im ssII- bzw. ssIII-Gen wurden im Projekt als erstes Material in die Gewebekultur aufgenommen. Durch Induktion einer kurzen Kallusphase erfolgte die Aufdopplung des Chromosomensatzes der diploiden EMS-Klone. Die resultierenden Klone wurden auf eine erfolgreiche Aufdopplung des Genoms, zudem aber auch auf das Vorhandensein der Mutation hin überprüft. Bei der ursprünglichen EMS-Mutagenese von Samen diploider Kartoffeln erfolgten die Mutationen in einem bereits

mehrzelligen Embryo. Die resultierenden Pflanzen waren also genetische Chimären aus mutiertem und nicht mutiertem Gewebe. Zwar erfolgten einige „Aufreinigungsschritte“, indem die jeweilige vegetative Folgegeneration aus dem eng umgrenzten meristematischen Bereich des „Auges“ der Knolle erwächst. Genetisch homogene Pflanzen liegen jedoch erst nach dem ersten Kreuzungsschritt vor, wenn eine Passage über ein Einzell-Stadium (Oocyte, Spermatocyte) erfolgt ist.

I.4. wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

I.4.1 Stärke-Eigenschaften

Wichtig für die Eigenschaften der Stärke sind Quellung, Verkleisterung, Viskosität und Retrogradation. Vor allem die beiden Stärkekomponenten Amylose und Amylopektin mit ihren verschiedenen Eigenschaften spielen eine wichtige Rolle. Der in **Abbildung 2** dargestellte Kurvenverlauf der Viskosität eines Stärkekleisters ist typisch für eine Kartoffelstärke: dem steilen Anstieg der Viskosität beim Erhitzen der Stärkesuspension folgt ein hoher Viskositätspeak bedingt durch das Aufquellen der Stärkekörner und die Freisetzung der Stärke. Durch die ansteigende Temperatur ist die Stärke schließlich gelöst und die Viskosität ist gering. Beim Abkühlen des Stärkekleisters steigt die Viskosität wieder an. Durch den Amyloseanteil und die Art des Amylopektins in der Kartoffelstärke ergibt sich dieses Viskositätsprofil. Die Korrelation zwischen strukturellen Aspekten (Länge der Seitenketten) und den physikalischen Eigenschaften wird in der Literatur für Amylopektinstärke aus klassisch gezüchteten Reis- und Erbsenpflanzen beschrieben. Für Amylopektinstärke aus klassisch gezüchteten Maispflanzen, in denen das Gen für die lösliche Stärkesynthase IIa inaktiv ist, wurde die Länge der Seitenketten mittels *high-performance size exclusion chromatography* (HPSEC) untersucht. Im Amylopektinmolekül dieser Pflanzen liegen weniger B1-Ketten (20-24 Glucosemoleküle), jedoch mehr A-Ketten (12-16 Glucosemoleküle) vor. Eine Erhöhung des Anteils an kurzen Ketten führt zu einer Erniedrigung der Gelatinisierungstemperatur. Für Reis wurde dieser Temperaturunterschied mit 8°C angegeben.

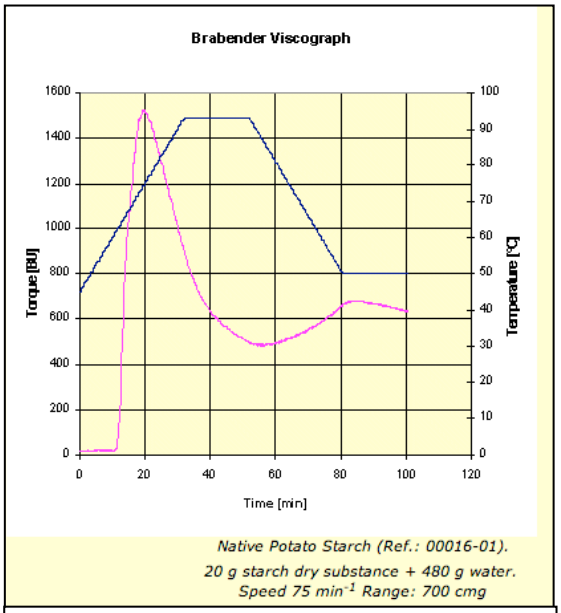


Abb. 2 Brabender Viskogramm
Dargestellt ist die Viskosität eines Stärkekleisters (rosa) bei einem Vorgangs des Erhitzens und anschließenden Abkühlens (blau). Lösungen verschiedener Stärken unterscheiden sich in dem Temperaturbereich, in dem die Stärkekörner aufbrechen und im Ausmaß der dann zunehmenden Viskosität. Beim Abkühlen nimmt, je nach Stärkequalität, die Viskosität wieder zu.

Für die Kartoffel wurden bisher nur Ergebnisse aus Arbeiten mit gentechnisch erstellten Pflanzen beschrieben. Wird das ssIII-Gen allein inaktiviert und ist Amylose noch vorhanden, so bilden die Kartoffeln tief eingerissene Stärkekörner. Ist neben dem ssIII-Gen zusätzlich das gbssI-Gen inaktiviert, so entstehen normale Stärkekörner. Durch die Inaktivierung des ssIII-Gens kommt es zu einer Anreicherung kürzerer Seitenketten im Amylopektinmolekül. Dies resultiert in der Ausbildung Gefrier-Tau-stabiler Gele. Wird zusätzlich das ssII-Gen inaktivert, so verstärkt sich dieser Effekt noch. Klassisch gezüchtete Kartoffeln mit diesen Eigenschaften gibt es derzeit nicht.

I.4.2 ssII- und ssIII-Gene

Da die zweite Stärkesynthase der Kartoffel teilweise in löslichen Fraktionen aber auch Stärkekorn-gebunden vorkommt, wird sie in der Literatur sowohl als SSII (*soluble starch synthase* II) als auch als GBSSII (*granule bound starch synthase* II) bezeichnet. Zur Verwendung einer durchgängigen Nomenklatur soll das Enzym im Folgenden nur als SSII (*starch synthase* II) und das entsprechende Gen als ssII bezeichnet werden. Die cDNA-Sequenz (X87988) und die Proteinsequenz (Q43847) waren bekannt. Die genomische Sequenz mit der Exon/Intron-Struktur musste in diesem Projekt noch erarbeitet werden. Das Protein wird durch einen singulären Genlocus auf dem Chromosom 2 des Kartoffelgenoms kodiert.

Die dritte lösliche Stärkesynthase (SSIII) wird ebenfalls durch einen singulären Genlocus auf dem Chromosom 2 des Kartoffelgenoms kodiert. Die cDNA-Sequenz (X94400) und die Proteinsequenz (Q43846) waren bekannt und wurden 1996 publiziert. Die genomische Sequenz mit der Exon/Intron-Struktur war nicht bekannt und musste somit in diesem Projekt erarbeitet werden.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Verbundprojekt wurde von folgenden Verbundpartnern bearbeitet:

- BIOPLANT, Biotechnologisches Forschungslabor (**BP**)
- Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Oekologie (**IME**), Aachen
- Emslandstärke GmbH, Emlichheim (**ES**)

Die Partner Bioplant und Fraunhofer IME befassten sich mit der Erstellung von Zuchtklonen mit inaktiven ssII- bzw. ssIII-Allelen. Der Verbundpartner Emslandstärke untersuchte Qualitäten der HAP-Stärken und etablierte Parameter, mittels derer optimierte HAP-Qualitäten definiert wurden.

Bei den im Folgenden dargestellten Arbeiten ist durch Angabe der oben in **blau** dargestellten Kürzel gekennzeichnet, wer die einzelnen Arbeiten durchgeführt hat.

II. Eingehende Darstellung

Das Verbundprojekt bestand aus den Projektteilen „TILLING“ (Bioplant, Fraunhofer IME) und „Stärkeanalytik“ (Emslandstärke GmbH). Die Partner haben eng zusammengearbeitet und gemeinsam Teilziele angestrebt. Zum besseren Verständnis des Gesamtzusammenhanges sind deshalb die Ergebnisse aller Verbundpartner aufgeführt. Die Beteiligung an den jeweiligen Arbeitspaketen ist durch die Kürzel **BP**, **IME** und **ES** dargestellt.

II.1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

***AP1.1**) Knollenproduktion mit den HAP-Klonen (**BP**)*

In den Vegetationsperioden 2011 und 2012 wurden 5 verschiedene HochAmyloPektin (HAP)-Zuchtklone im Rahmen einer Leistungsprüfung angebaut. Um Praxisbedingungen zu verwenden, wurde feldgewachsenes, vorgekeimtes Pflanzgut einer mittleren Sortierung benutzt. Der Anbau erfolgte in einer Blockanlage mit zwei Wiederholungen à 12 Pflanzstellen. Zudem wurde Pflanzgut für das Folgejahr durch eine Gesundvermehrung im Feld erzeugt. Diese Pflanzen wurden unter erhöhten phyto-hygienischen Ansprüchen angebaut. Die Parzellen zur Knollenvermehrung wurden getrennt von dem Material zur Ausreife geerntet. Zur Ermittlung des Gesundheitsstatus der Vermehrungen wurden über Winter Knollenstichproben zur Virusuntersuchung im Gewächshaus angezogen (Augenstecklingsprüfung) und auf Befall durch die Kartoffelviren PVY, PLRV, PVS, PVM und PVX hin überprüft.

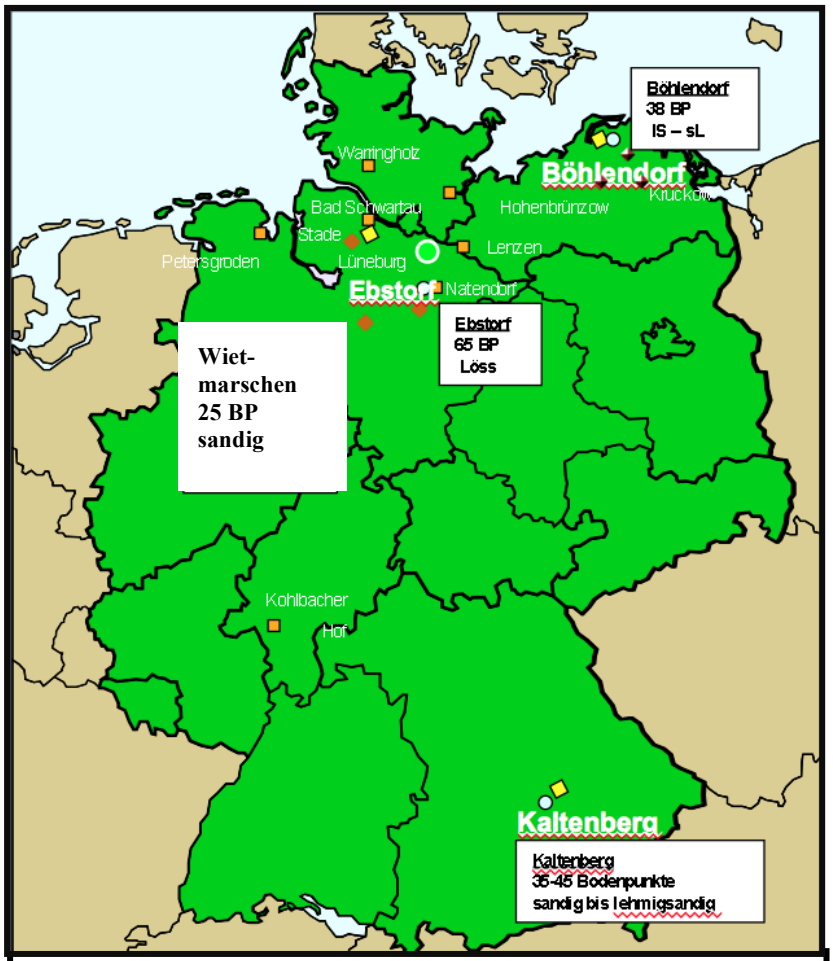


Abb.3: geographische Lage der Versuchsstandorte
Die HAP-Klone wurden im Rahmen von Leistungsprüfungen angebaut an vier verschiedenen Versuchsstandorten, die sich in den klimatischen Bedingungen und den Bodenpunkten unterschieden.

Der Anbau der Leistungsprüfung erfolgte an vier verschiedenen Standorten, die sich in den Bodenarten und –qualitäten unterscheiden (sh. **Abb.3**). Durch einen Vergleich der

Stärkequalitäten soll die Stabilität der HAP-Stärkequalität ermittelt werden.

Das Jahr 2011 war durch eine extreme Witterung gekennzeichnet. Auf ein sehr trockenes Frühjahr folgte ein sehr feuchter Sommer mit Stark- und Dauerregen.

Es wurden u.a. die Merkmale Knollenertrag/relativ, Stärkegehalt und Stärkeertrag/relativ bonitiert. Der Projektpartner Bioplant GmbH ermittelte zusätzlich die Parameter Amylosegehalt und Phosphorylierungsgrad der Stärke. Hierfür wurden je drei Knollen zur Stärkeisolierung abgenommen. Das restliche Erntegut wurde zum Projektpartner Emslandstärke transportiert. Das Merkmal „HochAmyloPektin(HAP)-Stärke“ erwies sich als stabil über die verschiedenen Standorte (Ergebnisse nicht gezeigt).

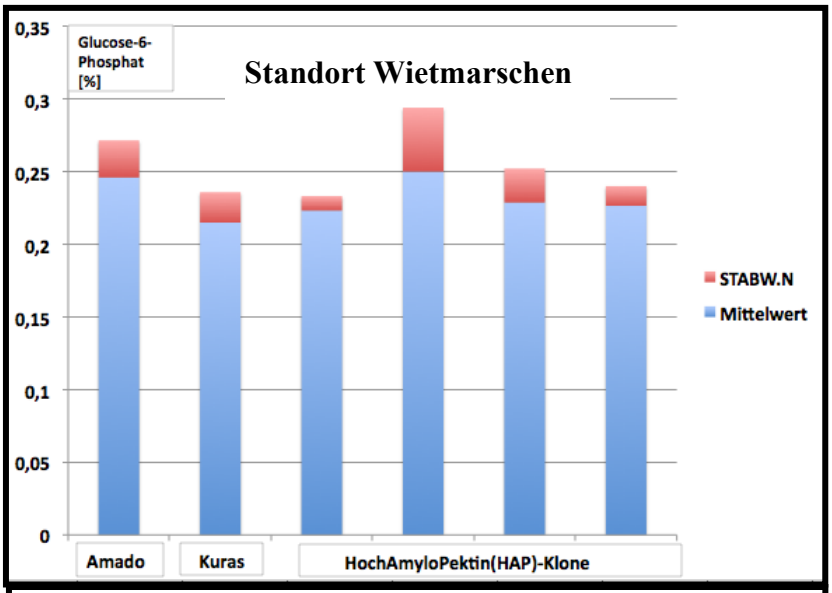


Abb.4: Vergleich der Stärken vom Standort Wietmarschen
Nach Isolierung der Stärken wurde der prozentuale Gehalt an Glucose-6-Phosphat bestimmt. Es sind die Mittelwerte aus drei Bestimmungen und die jeweiligen Standard-abweichungen dargestellt.

Außerdem wurde der relative Phosphatgehalt der Stärke bestimmt. Hierfür wurde die Stärke isoliert, hydrolysiert und dann enzymatisch mittels Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und einer Reduktion von NADP der Phosphatgehalt an der C6-Position bestimmt mittels der Komponenten des D-Glucose-Testes der Firma *r-biopharm*. Durch Vergleich von Reaktionsansätzen +/- Hexokinase konnte der %-Gehalt an Glucose-6-Phosphat ermittelt werden (**sh. Abb.4**).

Nach Literaturangaben ist Kartoffelstärke zu etwa 0,3% an den C3- und C6-Positionen phosphoryliert (Karlsson, 2005), wobei 70-80% der Phosphatgruppen Monoester mit den C6-Positionen bilden (Haebel *et al*., 2008). Die hier gefundenen Werte bewegen sich somit im erwarteten Rahmen. Der überwiegende Anteil der Phosphatgruppen ist an Amylopektin gebunden, während die Phosphorylierung der Amylose nicht signifikant ist (Hizukuri *et al*, 1970). Somit war zu erwarten, dass HAP-Klone im Vergleich zu den Sorten Kuras und Amado erhöhte Gehalte an Glucose-6-phosphat aufweisen. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden, wie am Beispiel des Standortes Wietmarschen dargestellt ist (sh. **Abb.4**). Auffallend sind jedoch Standort-spezifische Unterschiede (sh. **Abb.5**). So zeigen Stärken aus Sorten/Klonen des Anbauortes Ebstorf im Vergleich zum Standort Kaltenberg einen um 63-150% erhöhten Phosphatgehalt.

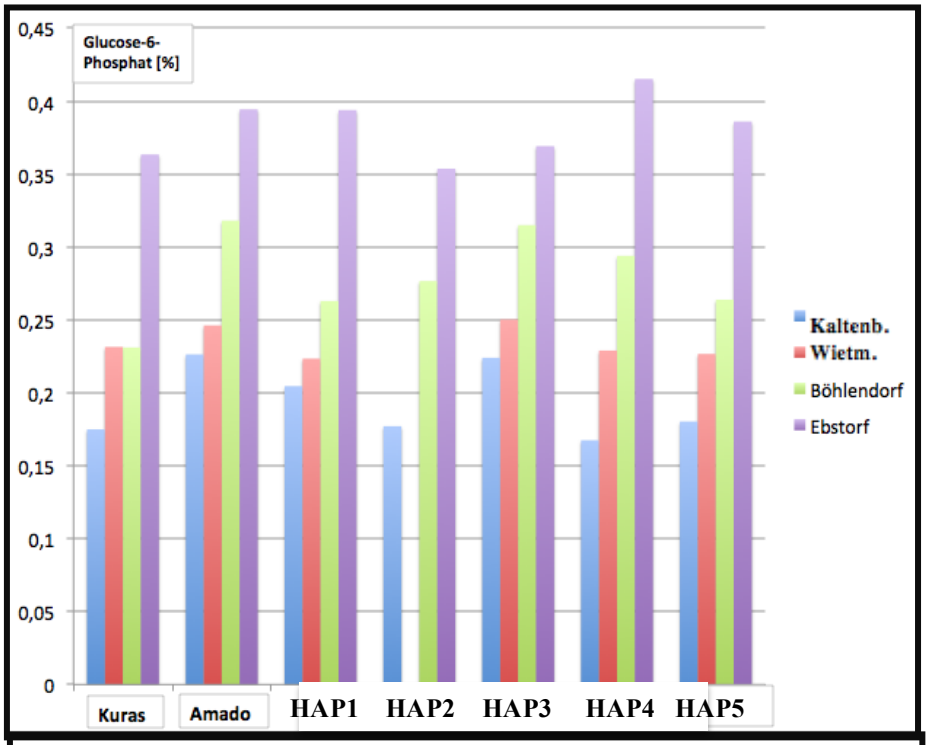


Abb.5: Vergleich der %-Gehalte an Glucose-6-Phosphat
Dargestellt sind die %-Gehalte der Vergleichssorten Kuras und Amado und der 5 angebauten HAP-Klone. Es wurden die isolierten Stärken verglichen von Erntegut, das von vier verschiedenen Anbauorten stammte. Es handelt sich um Durchschnittswerte aus 3 Versuchen.

Der Phosphatgehalt hat Einfluss auf die Peakviskosität mit einem Bestimmtheitsmaß von B=0,49 (Lindhauer und Haase, 2003).

AP 1.2) *Stärkeisolierung und Analysen* ***(ES)***

Die verschiedenen HAP-Klone A – E wurden im Technikum der Emsland Group gewaschen, mit Hilfe einer Reibe zerkleinert und anschließend mit einem Strahlauswascher das Fruchtwasser und die Pülpe abgetrennt.
Die gewonnene Stärke wurde mehrfach ausgewaschen und dann getrocknet. Die HAP-Klone wurden sortenrein verarbeitet und jeder Klon wurde analysiert und bewertet.
Der Proteingehalt der Reibselmuster wurde bestimmt, sowie Brabender-Viskositäten, Proteingehalte und Amylopektingehalte der HAP-Stärken.
Ziel dieser Kontrollen war es, zum einen die Qualität der HAP-Stämme mit denen herkömmlichen Sorten zu vergleichen und zum anderen zusätzlich die Standortabhängigkeit der Stämme zu beurteilen.

Klon	Protein vom getrock-netem Reibsel [% atro]	Stärke vom getrock-netem Reibsel [% atro]	TGA vom getrock-netem Reibsel [ppm atro]
A	10,3	79,8	124,4
B	11,4	72,7	189,9
C	9,7	80,1	107,8
D	10,5	79,2	220,2
E	9,6	80,2	115,5
Kontrolle 1	8,9	78,8	164,7
Amado	10	80,7	150,1

Tabelle 1: Analysendaten HAP-Stämme 2012 Standort Wietmarschen

Die Werte beziehen sich auf die Trockenmasse [atro].

Klon	Protein vom getrock-netem Reibsel [% atro]	Stärke vom getrock-netem Reibsel [% atro]	TGA vom getrock-netem Reibsel [ppm atro]
A	6,4	82,4	45,9
B	7,6	80,8	137,4
C	6,8	82	65,1
D	5,6	84,2	114,4
E	6,3	82,6	109,7
Kontrolle 1	6,7	82,1	126,2
Amado	5,6	83,6	199,7

Tabelle 2: Analysendaten HAP-Stämme 2012 Standort Böhlendorf

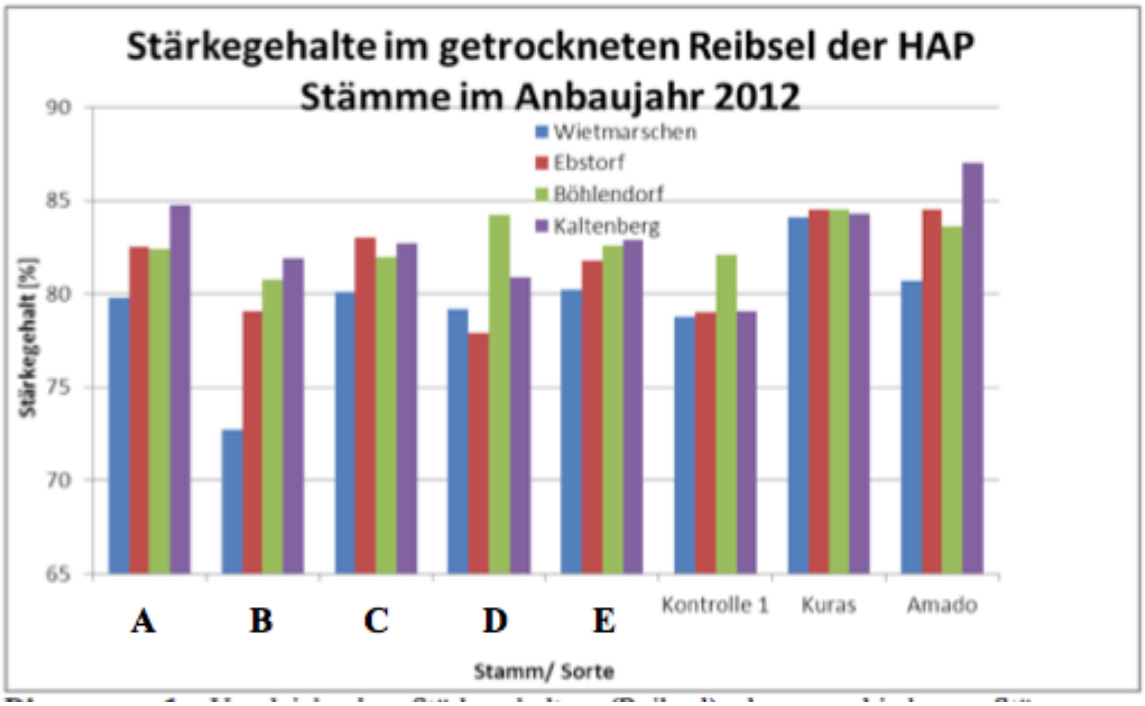


Abbildung 6: Vergleich des Stärkegehaltes (Reibsel) der verschiedenen Stämme an unterschiedlichen Standorten

Beim Vergleich der Stärkegehalte der verschiedenen Stämme an unterschiedlichen Standorten zeigen sich die hohen und stabilen Stärkegehalte der meisten HAP-Stämme.

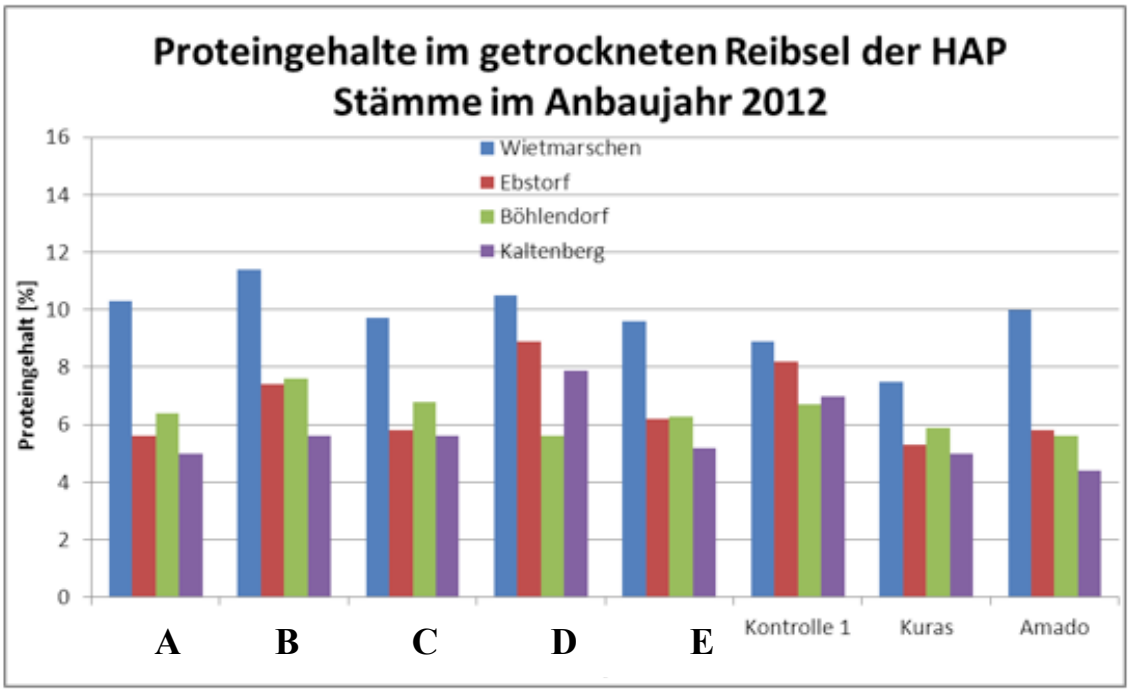


Abbildung 7: Vergleich des Proteingehaltes der verschiedenen Stämme an unterschiedlichen Standorten

Beim Vergleich der Proteingehalte der verschiedenen Stämme an unterschiedlichen Standorten fällt auf, dass sich im Vergleich zu den Stärkesorten keine offensichtlichen unterschiedlichen Proteingehalte zeigen.
Anhand der obigen Diagramme wird sehr gut ersichtlich, dass sowohl der Standort, als auch das Anbaujahr großen Einfluss auf die Stärkequalität hat. Darüber hinaus werden die Qualitätsunterschiede der einzelnen Klone deutlich.
Wichtig ist vor allem bei der langjährigen Analytik die Schwankungsbreite zu ermitteln, da gleichbleibende Qualität einen sehr wichtigen Qualitäts- und Prozessparameter darstellt.

AP2.1) *Analytik der ssII- und ssIII-Allele in den cases und controls (**BP, IME**)*

Es sollte in diesem Projektteil untersucht werden, ob bereits in den Zuchtklonen vorhandene ssII- oder ssIII-Allele einen vor- bzw. nachteilhaften Einfluss auf die Stärkequalität haben. Als entscheidendes Kriterium wurde vom Projektpartner Emslandstärke das Merkmal Langzeitstabilität erarbeitet. Anhand dieses Merkmals wurden die Hochamylopektin-Linien H01-H04 und H06 als *cases* und H05 als *control* eingestuft.

Unerwünschte Stärkequalitäten sind korreliert mit einem erhöhten Amylosegehalt, obwohl alle Klone H01-H06 homozygot für das inaktive gbssI-Allel sind. Der erhöhte apparente Amylosegehalt kann auch durch längere Seitenketten hervorgerufen werden, die Amylosecharakter annehmen. Dieses wiederum könnte durch eine erhöhte ssII/ssIII-Aktivität hervorgerufen werden.

Es wurden zunächst die ssIII-Allele in den *cases*- und *control*-Linien verglichen. Die lösliche Stärkesynthase III synthetisiert die langen Ketten des Amylopektins. In Linien mit inhibierter Amylosesynthese sind diese langen Seitenketten der Grund für messbare Restamylosegehalte. Es sollte untersucht werden, ob die Allelzusammensetzung des ssIII-Gens einen Einfluss auf den Restamylosegehalt bzw. auf die Langzeitstabilität in den vorliegenden Hochamylopektin-Klonen hat.

Hierfür werden verschiedene Amplicons des ssIII-Gens aus den Linien H01, H02, H03, H04, H06 (*cases*) und H05 (*control*) sequenziert. Die Linie H05 war in zwei aufeinander folgenden Anbauperioden durch einen erhöhten Restamylosegehalt und eine zu geringe Langzeitstabilität im Vergleich zu den anderen Linien aufgefallen

<u>Amplicon 1:</u> (Exon 1 - Exon 3, Primer SSIIIfw/SSIIIrev5):
Die PCR-Produkte wurden mit vier verschiedenen Primern sequenziert.
In **Abbildung 8** ist die Sequenzierung mit dem Primer SSIIIfw dargestellt. In Intron 1 findet sich ein Mikrosatellit (GT) in 5 bzw. 6facher Wiederholung, so dass die Sequenzen der Allele in den Linien H01, H02, H03, H05 und L89 gegeneinander verschoben und nicht mehr lesbar sind. Lediglich in der Linie H06 findet sich in allen 4 Allelen die 6fache GT Sequenzwiederholung.
Anhand dieser Sequenzierung lässt sich die Linie H05 mit hohem Restamylosegehalt nicht von den übrigen Linien unterscheiden

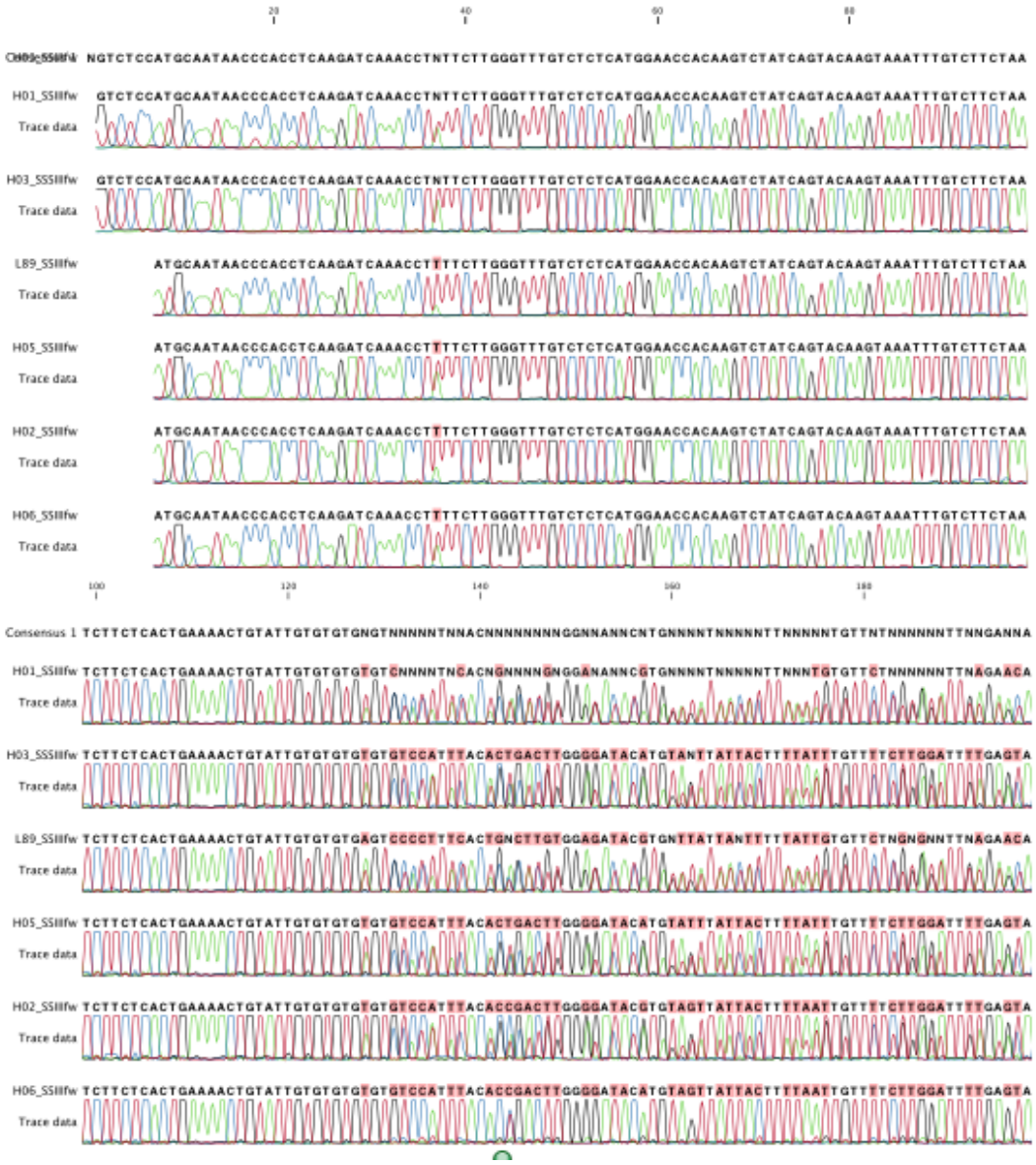


Abb. 8: Amplicon 1 des Gens für die lösliche Stärkesynthase III (ssIII)
Die genomische DNA aus 6 verschiedenen Amylose-freien Linien fand Verwendung, um jeweils das Amplicon 1 mittels PCR zu amplifizieren und zu sequenzieren. Dies diente dem Allelvergleich des *cases* (H01-H04, H06) mit der *control* (H05) bzgl. der Langzeitstabilität.

Dass Amplicon 2 umfasst Exon 3 – Exon 5 und wurde mit dem Primerpaar SSIIIfw5/SSIIIrev17 amplifiziert.

Auch das Amplicon 2 wurde mit insgesamt 4 Primern vollständig sequenziert. Es zeigt sich, dass in der Linie H01 ein InDel vorliegt, so dass die Sequenz nicht lesbar ist. In den übrigen Linien finden sich zwar einige SNPs, diese korrelieren jedoch nicht mit den gefundenen Restamylosegehalten.

Für beide Amplicons erbrachte die Sequenzierung auch mit den anderen drei Primern keine neuen Erkenntnisse, so dass man abschließend sagen kann, dass zwischen dem hohen Restamylosegehalt bzw. der geringen Langzeitstabilität in der Linie H05 und der Allelzusammensetzung von ssIII in dieser Untersuchung kein Zusammenhang hergestellt werden konnte.

AP2.2) *Ermittlung von single nucleotide polymorphisms* (***BP, IME***)

Wie unter AP2.1 dargestellt, konnten keine *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) gefunden werden, die mit den ssII- und ssIII-Allelen in den *cases*- und dem *control*- Klon korreliert.

AP2.3) *Entwicklung einer Marker-gestützen Selektion* (***BP, IME***)

Aufgrund des Mangels an SNPs, die mit den Merkmalsgruppen korrelierten, erübrigte sich die Entwicklung einer Marker-gestützten Selektion.

***AP3.1**) Identifizierung kompatibler Kreuzungspartner*

ssIII (BP)

Das Enzym ssIII macht ca. 85% der löslichen Aktivität in Kartoffelknollen aus, während ssII ca. 10% der Aktivität beisteuert. Da beide Enzyme somit einen wesentlichen Beitrag zur Stärkequalität in Knollen liefern können, sollten für beide Gene inaktive Allele gesucht werden. Beide Gene liegen auf dem Chromosom II der Kartoffel und sind mehr als 30 centiMorgan voneinander entfernt. Deshalb können für beide Gene gleichzeitig inaktive Allele gesucht werden, um diese dann – falls notwendig - im Rahmen der späteren Züchtung über Rekombinationsereignisse miteinander zu verknüpfen. Wie in der Einleitung dargestellt, musste zunächst ermittelt werden, wie die Exon/Intron-Struktur der Gene für die *soluble starch synthases* II und III aufgebaut ist.

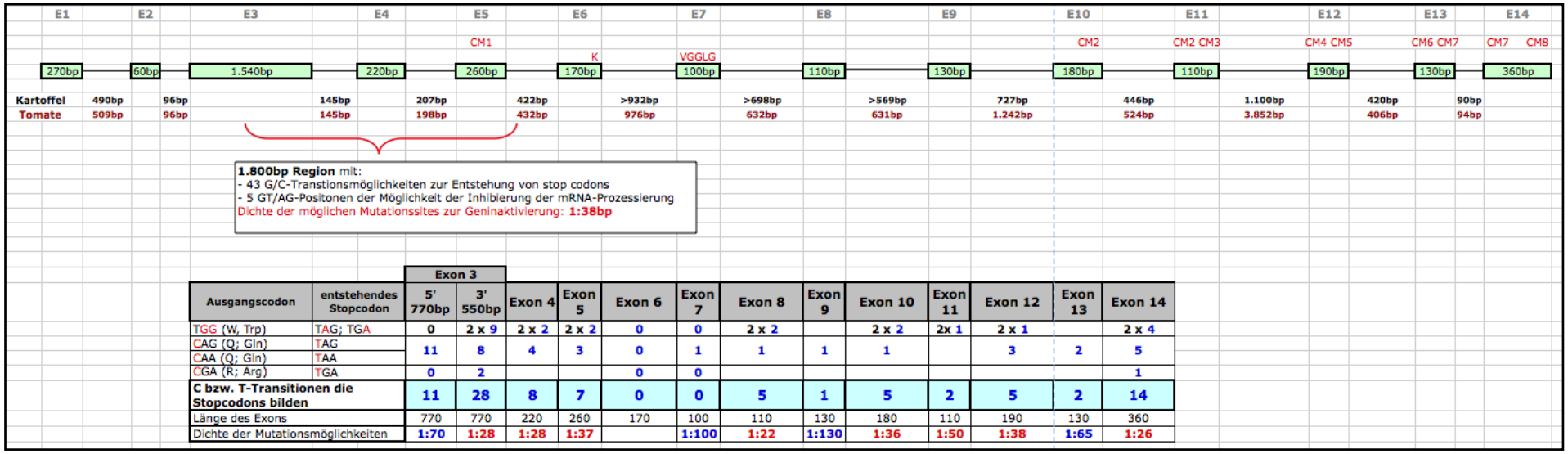
Im Folgenden sind die Ergebnisse zum Gen ssIII dargestellt. Zu Beginn der Arbeiten war die cDNA-Sequenz, die für das ssIII-Enzym der Kartoffel kodiert (**X95759**), bekannt. Die genomische Sequenz war für die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) jedoch noch nicht beschrieben worden. Da die genomische Sequenzierung für die nah verwandt Tomate (*Solanum lycopersicon*) jedoch schon weit fortgeschritten war, wurden die entsprechenden Datenbanken durchsucht (**http://solgenomics.net/genomes/Solanum_lycopersicum/genome_data.pl**). Es wurde eine genomische Sequenz gefunden (**AC215407**), die analog dem ssIII-Gen der Kartoffel auf Chromosom 2 positioniert ist. Zudem war für die Wildart *Solanum phureja* DM ein erster Sequenzentwurf (DM) zugänglich (**http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/**), der alternativ auch über eine chinesische Website (**http://yh.genomics.org.cn/potato/search.jsp**) durchsucht werden kann. Es konnte ein Scaffold gefunden werden, der an Chromosom 2 gekoppelt ist und der das ssIII-Gen beinhaltet (**St.AC.001.Scaffold000148**). Weitere homologe cDNA-Sequenzen wurden über die einen BLAST-search über die Datenbanken des „Rechenzentrum Primärdatenbank“ (RZPD) gefunden (**http://gabi.rzpd.de/database/cgi-bin/Blast.pl.cgi**). Die homologe Bereiche dieser Sequenzen wurden mittels clustalW (**http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/**) detektiert. Schließlich konnte mittels Spidey (**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/**) aus den Konsensussequenzen eine Exon/Intron-Struktur ermittelt werden.

Zunächst konnte aus den genomischen Sequenzdaten sowohl von *Solanum lycopersion* als auch *Solanum phureja* geschlossen werden, dass es nur ein einzelnes ssIII-Gen gibt. Es liegen somit keine paralogen Genkopien vor und es muss nur ein einzelnes Gen inaktiviert werden, um die ssIII-Enzymaktivität zu unterdrücken.

Nach den Ergebnissen der oben beschriebenen Arbeiten besteht das ssIII-Gen aus 14 Exons und 13 Introns. Die Exongrößen bewegen sich zwischen 60bp und 1.540bp. Die Introngrößen liegen im Bereich von 941bp bis zu 1.100bp (sh. **Abb. 9**).

Für das Durchsuchen der zu generierenden EMS-Population nach inaktiven ssIII- Allelen sind solche Genregionen von großem Interesse, in denen es durch EMS- Mutagenese (G/C>A/T-Transitionen) häufig zur Bildung von Stop-Codons kommen kann. Die Nukleotide für Tryptophan (TGG), für Glutamin (CAG;CAA) und für Arginin (CGA) können in die entsprechenden Stop-Codons TAG, TGA oder TAA umgewandelt werden. In der Tabelle in **Abb.9** ist wiedergeben, wie viele solcher Codons in den Exons auftreten und wie hoch die Dichte von möglichen Nukleotiden ist, durch deren Mutation Stopcodons entstehen können. Ein weiteres Kriterium zur Auswahl des zu untersuchenden Genbereiches ist es, möglichst wenige und möglichst kleine Introns mit einzubeziehen.

Aufgrund dieser Kriterien wurde eine ca. 1,8kb große Region im 5’-Bereich des ssIII-Gens ausgewählt für die Hochdurchsatz-Analytik (**sh. Abb. 9**).



		Exon 3												
Ausgangscodon	entstehendes Stopcodon	5' 770bp	3' 550bp	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 13	Exon 14
TGG (W, Trp)	TAG; TGA	0	2 x 9	2 x 2	2 x 2	0	0	2 x 2		2 x 2	2x 1	2 x 1		2 x 4
CAG (Q; Gln)	TAG	11	8	4	3	0	1	1	1	1		3	2	5
CAA (Q; Gln)	TAA													
CGA (R; Arg)	TGA	0	2			0	0							1
C bzw. T-Transitionen die Stopcodons bilden		**11**	**28**	**8**	**7**	**0**	**0**	**5**	**1**	**5**	**2**	**5**	**2**	**14**
Länge des Exons		770	770	220	260	170	100	110	130	180	110	190	130	360
Dichte der Mutationsmöglichkeiten		1:70	1:28	1:28	1:37		1:100	1:22	1:130	1:36	1:50	1:38	1:65	1:26

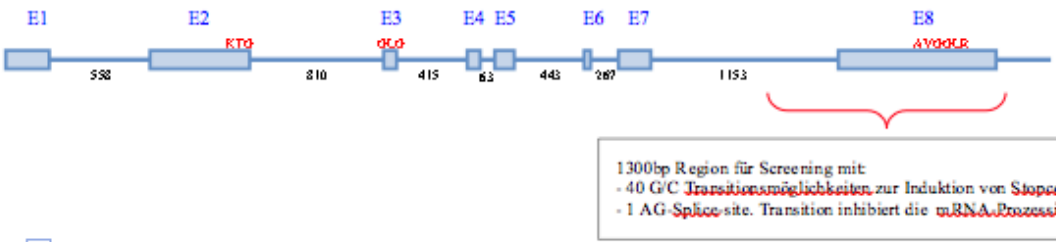
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Exon/Intron-Aufbaus für das ssIII-Gen

Oberer Bildteil: Der Exon/Intron-Aufbau des Gens für das Enzyme *soluble starch synthase* III ist schematisch dargestellt. Es sind Bereiche gekennzeichnet, die für *carbohydrate-binding moieties* (CM) kodieren. Zudem ist hervorgehoben der Bereich, der für das Hexapeptid KVGGLG kodiert, bei dem es sich vermutlich um eine ATP-Bindungsdomäne handelt.

Unterer Bildteil: In der Tabelle sind die Aminosäure-Codons aufgelistet, die durch eine G/C>A/T-Transition in Stop-Codons umgewandelt werden können. Es ist aufgelistet, wie häufig solche Codons in den einzelnen Exons vorkommen. Das TGG-Codon für Tryptophan wird dabei doppelt gezählt, da es an zwei Positionen mutiert werden kann, um entweder das TAG- oder das TGA-Stop-Codon zu bilden. Es zeigt sich, dass der 3'-Bereich von Exon 3 und die Exons 4 und 5 eine hohe Dichte solcher Codons beinhalten. Deshalb wurde der in der Abbildung dargestellte, etwa 1,8kb große Bereich ausgewählt für ein Screening der zu erstellenden EMS-Population.

ssII (IME)

Zu Beginn des Projektes war lediglich die für ssII kodierende cDNA Sequenz bekannt (X87988). Mit Hilfe dieser Sequenz konnten Datenbanken durchsucht werden um die genomische Sequenz des ssII-Gens zu identifizieren. Da noch keine Genomsequenz für *Solanum tuberosum* verfügbar ist, wurden die verfügbaren Genomsequenzen der nahe verwandten Tomate (*Solanum lycopersicum*; http://solgenomics.net/genomes/Solanum_lycopersicum/genome_data.pl) und der Wildkartoffelart *Solanum phureja* (http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/) durchsucht. Es konnten so eine genomische Sequenzen für das ssII Gen aus Tomate gefunden werden (AC226507) welche auch auf Chromosom 2 lokalisiert ist. Auch aus der Wildkartoffel *Solanum phureja* wurde ein genomischer Bereich identifiziert, welcher das ssII-Gen beinhaltet (Solanum_phureja.DM.scaffold.20101004111247530816000). Diese Sequenzen wurden nun mit Hilfe des Programmes Spidey (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/) mit der bekannten cDNA-Sequenz verglichen und die Exon-Intron Struktur ermittelt. Da jeweils nur ein zu ssII homologer genomischer Bereich identifiziert werden konnte, kann geschlossen werden, dass es sich bei ssII um ein Einzelgen handelt, also keine weiteren paralogen Genkopien vorliegen. Anschließend wurden Primer abgeleitet und durch Test-Amplifikationen mit genomischer DNA von *Solanum tuberosum* und anschließender Sequenzierung der Amplikons die ermittelte genomische Sequenz von ssII bestätigt. Die oben dargestellten Analysen ergaben, dass das Gen für ssII in *Solanum tuberosum* aus 8 Exons besteht (siehe **Abb.10**). Diese sind zwischen 65 und 977 Basenpaare lang. Die dazwischen liegenden Introns variieren in ihrer Länge von 63 bis 1153 Basenpaaren. Mit den erhaltenen Informationen war es nun möglich, eine für das Screening nach induzierten Mutationen geeignete Genregion auszuwählen. Da insbesondere inaktive Allele von Interesse sind, waren solche Regionen auszusuchen, in denen eine möglichst große Wahrscheinlichkeit besteht, dass eine durch EMS verursachte G/C > A/T Transition zur Bildung von Stop-Codons oder defekten Splicesites führt. Wie in der Tabelle in **Abb. 10** dargestellt, sind die Codons für Tryptophan (TGG), Glutamin (CAG; CAA) und Arginin (TGA) solche Ziele. In der Tabelle ist die Anzahl und die Dichte derartiger Codons in den einzelnen Exons angegeben. Weiterhin sollte eine geeignete Genregion möglichst geringe Intronbereiche enthalten, da Mutationen dort keine Wirkung haben und außerdem in den Intronbereichen erfahrungsgemäß die Anzahl unerwünschter InDels größer ist, welche die Auswahl geeigneter Kreuzungspartner zur Erstellung der TILLING-Population erschweren. Für das Screening wurde das Exon 8 ausgewählt (sh. **Abb.10**).



Ausgangscodon in SSII	entstehendes Stopcodon durch EMS	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8
TGG (Trp)	TAG, TGA	2 x 1	2 x 1	0	0	0	0	2 x 2	2 x 10
CAG (Gln) CAA (Gln) CGA (Arg)	TAG TAA TGA	7	5	1	2	1	0	1	20
Anz. Transitionen die zu Stopcodon führen können		9	7	1	2	1	0	5	40
Länge des Exons		254	623	65	78	111	45	174	977
Dichte möglicher EMS induzierter Stopcodons		1:28	1:89	1:65	1:39	1:111		1:35	1:24

Abbildung 10: Schematische Darstellung der ssII-Genstruktur
Oberer Bildteil: Schematische Darstellung des Exon/Intron-Aufbaus des Gens für das Enzyme *soluble starch synthase* II. Der für das Hexapeptid KTGGLG kodierende Bereich ist hervorgehoben. Bei diesem Bereich handelt es sich vermutlich um eine ATP-Bindungsdomäne. Weiterhin ist das sogenannte "KTGGL-look-alike" Motif hervorgehoben (AVGGLR), welches sich im gefalteten Protein vermutlich in enger räumlicher Nähe zum KTGGLG-Motif befindet und möglicherweise ebenfalls die ATP-Bindung beeinflusst (Edwards et al., 1999)
Unterer Bildteil: In der Tabelle sind die Aminosäure-Codons aufgelistet, die durch eine G/C>A/T-Transition in Stopcodons umgewandelt werden können und wie häufig solche Codons in den einzelnen Exons vorkommen. Das TGG-Codon für Tryptophan wird dabei doppelt gezählt, da es an zwei Positionen mutiert werden kann, um entweder das TAG- oder das TGA-Stopcodon zu bilden.

Innerhalb der zu untersuchenden Region des ***ss*III**-Gens (Projektteil **BP**) und des ***ss*II**-Gens (Projektteil Fraunhofer **IME**) müssen alle 4 Allele des Zielgens (zwei pro Kreuzungspartner) das gleiche InDel-Muster besitzen. Zudem müssen die Kreuzungspartner miteinander sexuell kompatibel sein. Zudem muss einer der Kreuzungspartner effizient vitalen Pollen produzieren. Als weiterer Punkt musste die Gewebekulturtauglichkeit geprüft werden. Dies ist wichtig, um die Genome der selektierten Klone schließlich wieder auf das tetraploide Niveau anzuheben. Die nach diesen Kriterien ausgewählten Zuchtklone fanden Verwendung in Arbeitspaket 3.2.

AP 3.2) *Kreuzung und Samenproduktion (**BP**)*

Für jede Kreuzung wurden 40 Pollenempfänger- und 16 Pollenspender-Pflanzen angezogen. Um eine effiziente Bildung von Beeren und Samen zu erhalten, muss die Knollenbildung unterdrückt werden. Andernfalls kommt es zur Knollenbildung und die Pflanze stoppt die sexuelle Vermehrung und die Samenbildung wird beendet.

Es gibt zwei Techniken, um diesen Prozess zu unterdrücken. Zum einen kann die Mutterknolle auf einen Stein gepflanzt werden, so dass die Bildung von Tochterknollen erkannt und diese entfernt werden können. In unserem Fall lagen jedoch keine Knollen, sondern *in vitro*-Pflanzen vor, so dass zunächst eine *in vitro*-Vermehrung durchgeführt wurde von den Klonen, die als Kreuzungspartner identifiziert worden waren. Anschließend wurde diese Pflanzen in das Gewächshaus überführt und auf Tomate gepfropft, wie in **Abb. 11** dargestellt ist. Die Kreuzungen wurden in der Wintersaison (IV/2010 bis I/2011) durchgeführt unter Kunstlicht. Es konnten erfolgreich etwa 20.000 Samen pro Gen bzw. Kreuzungsgeneration geerntet werden.

Es wurden dann pro Kreuzungs-kombination 4.000 Samen EMS-behandelt. Zudem wurde durch den Einsatz von Giberellin die Samenruhe gebrochen. Diese Samen wurden ausgelegt, um die erste Population nach EMS-Behandlung (v1M) anzuziehen.

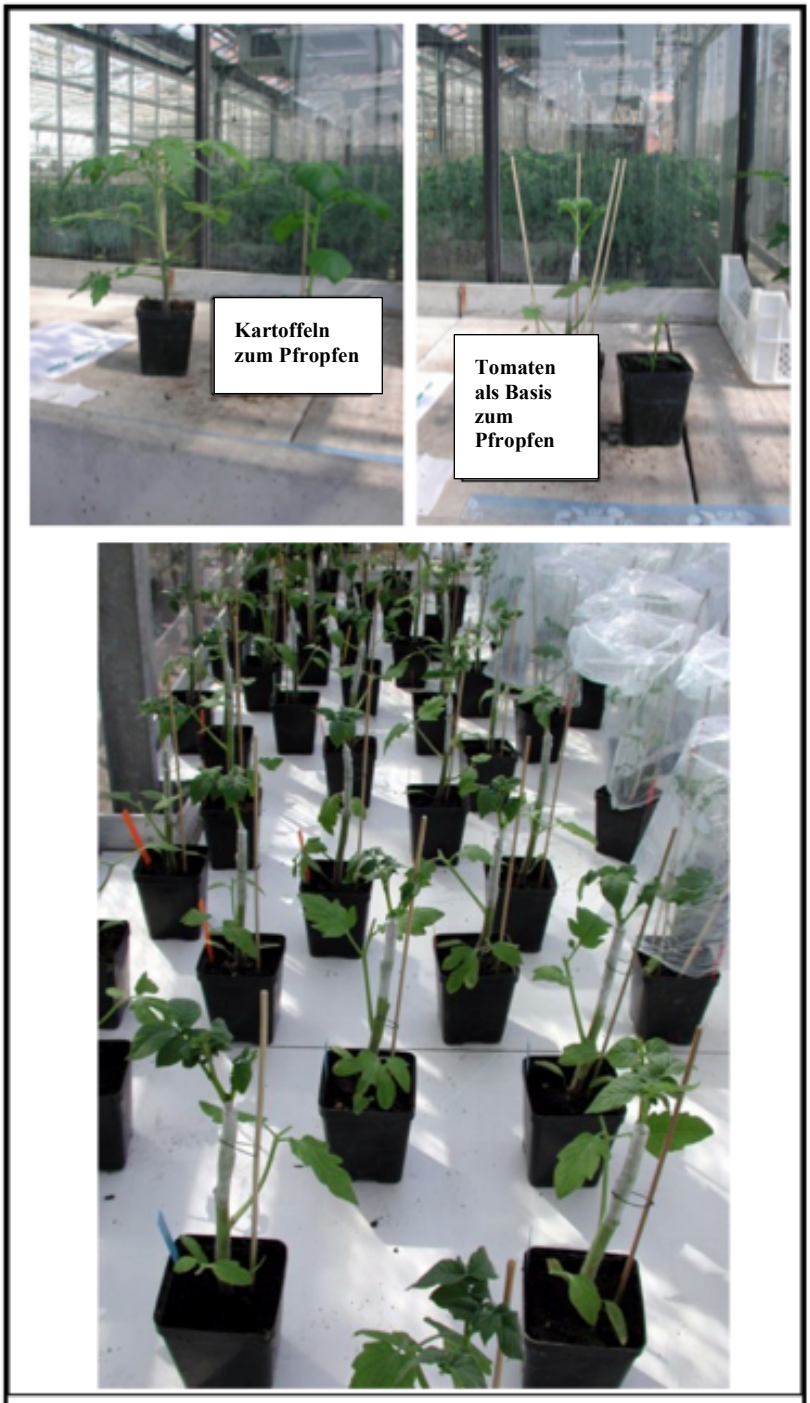


Fig. 11: Propfung von Kartoffelklonen auf Tomate
Oben links: Kartoffeln liefern den oberen Pflanzenbereich zum Pfropfen
Oben rechts: Der Kartoffel-Propf wird auf die Tomatenunterlage übertragen.
Unteres Bild: In den ersten Tagen nach dem Propfen werden die Pflanzen mit einer Plastikhaube abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern (rechter Bildteil). Nach drei Tagen wird die Haube entfernt, um eine effiziente Pflanzen- und Blütentwicklung für die späteren Kreuzungsarbeiten zu ermöglichen. Dafür werden die Pflanzen dann noch in ein größeres Kulturgefäß umgepflanzt.

AP3.3) *EMS-Mutagenese & Knollenpassage* (***IME & BP***)

Es wurde das Mutagen Ethylmethansulfonat (EMS) eingesetzt. Es vermittelt die folgenden Modifikationen mit steigender Effizienz von a) nach c):

a) N^7-Alkylguanin: kein biologischer Effekt, es wirkt wie Guanin

b) N^3-Alkylguanin: toxischer Effekt, da es nicht von den Enzymen erkannt wird und deshalb die Transkription und Replikation unterdrückt wird. Es kann in Pflanzen jedoch zu Sequenzmodifikationen kommen durch die Mechanismen des *error-prone-DNA-repair*

c) O^6-Alkylguanin: resultiert in G/C- nach A/T- Transitionen.

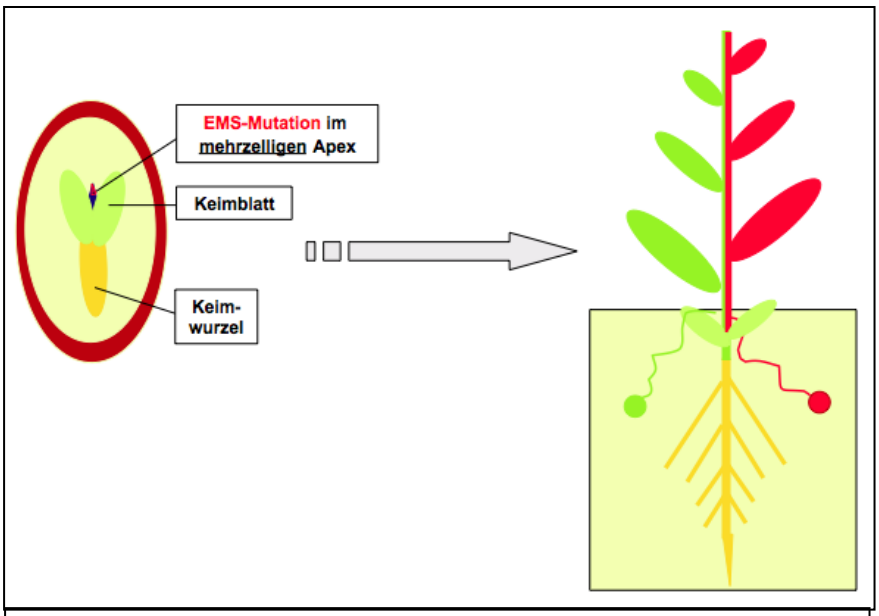


Abb. 12: EMS-Mutagenese des Samens
Die Mutation eines mehrzelligen Pflanzenembryos (links) kann in der Bildung genetisch chimärer Pflanzen resultieren (rechts).

Abb. 13: Anzucht und Phänotyp der M-Generation
In der linken Bildhälfte ist die Kultivierung der **M**-Pflanzen dargestellt. Die rechte Bildhälfte zeigt eine Pflanze mit chlorotischen Blattarealen, die den genetisch chimären Charakter der **M**-Pflanzen zeigt.

Die Etablierung effizienter Mutagenese-Bedingungen war ein wichtiges Ziel. Für das verwendete Saatgut galt es, die maximal tolerierbare EMS-Konzentration zu ermitteln, um eine möglichst hohe Mutationsdichte bei Erhalt der nötigen Fitness der Pflanzen zu erzielen. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass dieses bei einer EMS Behandlung, die zu einer um ca. 50% reduzierten Keimfähigkeit führt, erzielt wird. Daher wurden diverse EMS-Konzentrationen (0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0% EMS) mit konstanter Inkubationszeit (16h) getestet. Da Konzentrationen oberhalb von 1.2% EMS in drastisch reduzierten Keimungsraten resultierten, wurde eine Konzentration von 1% EMS bei 16h Inkubationszeit zur Produktion der EMS-Population (**M**) gewählt. Die Optimierung und

Durchführung der EMS-Mutagenese erfolgte durch den Projektpartner Fraunhofer IME. Die darauf folgenden Arbeitsschritte führte der Projektpartner Bioplant durch.

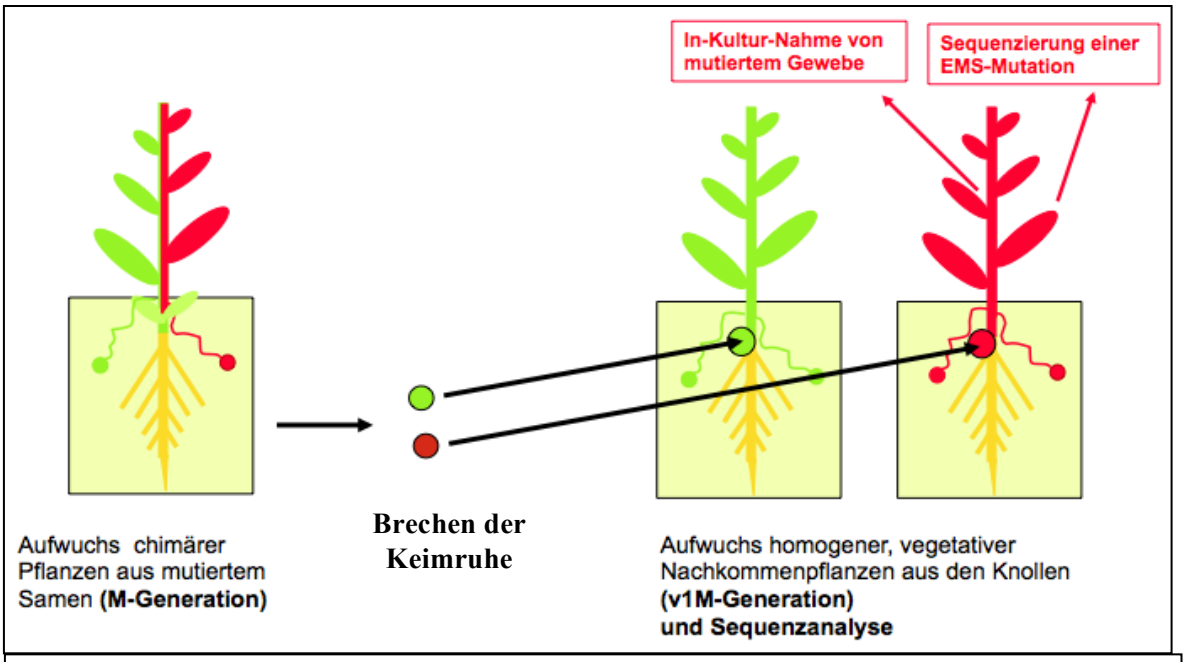


Abb. 14: Produktion von genetisch homogenen Pflanzen
Knollen werden von **M**-Pflanzen geerntet (links), die Knollendormanz gebrochen und die Knollen werden ausgepflanzt zur Anzucht der vegetativen Folgegeneration (**v1M**) von genetisch homogenen Pflanzen (rechts). Von diesen wird jeweils ein Blatt geerntet und DNA isoliert zur Sequenzanalyse der Zielregionen in den Genen ssII und ssIII.

Die Samendormanz wurde durch eine Behandlung für 24h in GA_3 gebrochen und die Samen anschließend auf sterilem Substrat ausgebracht. Es wurden pro Kreuzungskombination 4.000 Samen EMS-behandelt. Nach dieser Behandlung zeigten etwa 1% der Nachkommen panaschierte Blätter, was als Hinweis auf eine erfolgreiche Mutagenese angesehen wurde.

Der pflanzliche Embryo, der sich im Samen befindet, ist ein mehrzelliges Gebilde. Folglich werden bei der EMS-Behandlung nur einzelne Zellen im Apex mutiert. Daher ist die resulierende Pflanze genetisch chimär aufgebaut, und trägt ggf. in verschiedenen Pflanzenteilen verschiedene Mutationen (sh. **Abb.12 und 13**).

In der hier beschriebenen Strategie wurden diploide Kartoffeln verwendet. Diese können aufgrund eines Systems der gametophytischen Inkompatibilität nicht geselbstet werden. Deshalb wurden die Knollen dieser ersten Population nach der Mutagenese (**M**) geerntet und die Knollenruhe durch eine GA_3 –Behandlung gebrochen, um die nächste, vegetative Folgegeneration (**v1M**) anzuziehen. Da die Pflanzen aus einem eng umgrenzten meristematischen Bereich („Auge“) anwachsen, wird angenommen, dass die Pflanzen nun weitgehend homogen aufgebaut sind (sh. **Abb. 14**).

*AP 3.4 Pflanzenanzucht, Blatternte **(BP)***

Aufgrund der effektiven Kooperation der Verbundpartner konnten die Arbeitsschritte hoch effizient durchgeführt werden. Blattmaterial wurde geerntet und in Aufschlussgefäßen im 96Well Format (QIAGEN *collection microtubes*) bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

AP 3.5) *HTS-Analytik der Gene ssII- (**BP**) und ssIII (**IME**)*

Die in AP3.1 identifizierten Regionen der ssII- und ssIII-Zielgene (ssII: Exon 8; ssIII: Exons 3-5) wurden mittels HTS-Analytik auf EMS-induzierte Mutationen hin untersucht werden.

ssIII-Gen (BP): Es wurde genomische DNA aufgereinigt, die im nächsten Schritt als Template zur PCR Amplifikation der Zielregionen dient. Die 1,8kb-große Region des ssIII Gens wurde vom Partner Bioplant PCR amplifiziert, die PCR-Produkte aufgereinigt und zum Projektpartner Fraunhofer IME zur Sequenzierung gesandt. Die *trace files* der ssIII-Analysen wurden dann Bioplant zur Verfügung gestellt (sh. **Abb.15**) Hier wurde das Programm „CLC Main Workbench 6“ (CLCbio.com) eingesetzt, um die *trace files* auf neue, EMS-generierte SNPs hin zu durchsuchen. Analog dazu hat Partner IME die 1,3kb umfassende Zielregion des ssII Gens mittels PCR amplifiziert, die Produkte aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die resultierenden *trace files* der ssII-Sequenzen wurden vom Projektpartner Fraunhofer IME mittels der Programme *Pregap*4 und *Gap*4 des Staden Programm-Paketes analysiert.

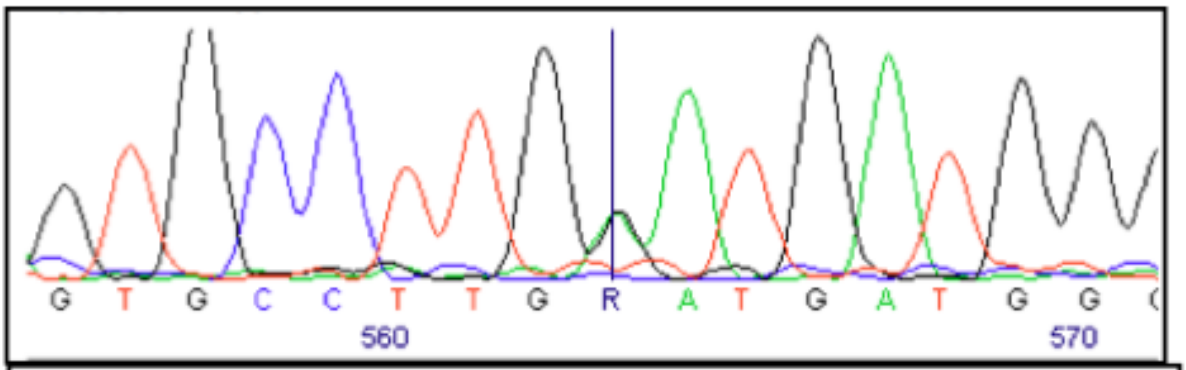


Abbildung 15: Mutation in dem neuen ssII-Allel P108
Dargestellung des *trace files* des neuen ssII-Allels P108, in dem ein Stopcodon (TGA/ UGA) entstanden ist. In diploiden Pflanzen erkennen automatische Analyseprogramme unproblematisch, wenn nach einer Mutation einzelne Positionen der Sequenz heterozygot vorliegen. Deshalb sind tetraploide Pflanzen ungeeignet, da hier eine Mutation im Verhältnis von 1:3 auftreten und so im „Grundrauschen“ der Sequenz von den Analyseprogrammen nicht erkannt würde.

	AS-Austausch	SIFT	POLY-PHEN	Funkt.-Test
A06	E>K	0,03	1,522	
A286	V>I	0,12	0,119	
A306	L>F	0	1,401	
A309	Q>stop			
A368	A>T	0,08	0,052	
A392	E>K	0,18	1,47	
A402	M>I	0,05 low conf.	0,225	
A549	G>E	1	0,225	
V10	G>E	0,26	n.a.	
V88	M>I	0,17	0,682	
V119	V>I	0,09	0,835	
V142	G>E	0,02 low conf.	n.a.	
V231	V41I	0,77	n.a.	
V136	P>S	0	2,274	AKTIV
V257	A>T	0,02	0	
V285	M>I	0,17	0,682	
V298	E>K	0,08	1,404	
V444	A>T	0,08	0,052	
V477	V>I	0,02	0,844	
V487	D>N	0	1,614	
V501	E>K	0,03	1,297	
V511	S>F	0,06	1,604	
V558	P>S	0,21	0,882	

	AS-Austausch	SIFT	POLY-PHEN
P54	D>N	1	0,86
P33	E>L	0,07	0,666
P115	A>T	0,06	0,052
P148	W>stop		
P221	L>F	0,27	0,244
P246	E>K	0,82	0,189
P264	E>K	0,16	1,47
P270	P>L	0,06	1,893
P302	A>T	0,21	0,038
P360	R>K	0,39	0,352
P376	R>Q	1	1,842
P387	A>V	0,34	1,413
P447	P>S	1	0,588
P441	G>S	0,02	1,722
P509	E>K	0,08	1,4,4
P569	A>T	0,06	0,052
P694	G>D	0,64	1,787
P721	W>stop		
P748	G>S	0,03	1,711
P869	E>K	0,13	0,989
P917	D>N	0,07	1,435
P951	R>H	0,01	1,526
P1122	H>Y	0,214	0,07
P1169	D>N	1	1,207
P1237	P>L	0	2,401
P1256	A>V	0,01	1,202

	CAA 64173	SIFT	POLY-PHEN	Bemerk.
C9	A>T	0,21	0,038	
C70	E>K	0,02	1,51	
C168	P>S	0	2,274	(sh. V136)
C435	K>N	2,72	0,102	
	R>K	0,25	0,313	
C510	E>N	0	0,999	
C614	R>C	0,1	0,721	

Tabelle 3: EMS-generierte Klone mit neuen ssIII-Allelen

Es sind nur diejenigen Klone dargestellt, die in den Exons solche Mutationen tragen, die zu Aminosäure-Austauschen führen.

Gezeigt sind die Klonbezeichnungen, die AS-Austausche und die vermuteten Effekte auf die Enzymaktivität. Der SIFT-Test zeigt Aktivitätsausfälle an durch Werte nahe 0. Der Test PolyPhen zeigt drastische Effekte an durch Werte oberhalb von 2. Solche Werte sind rot unterlegt. Klone, die in die Gewebekultur aufgnommen wurden, sind blau unterlegt.

Es wurden prioritär die Kartoffelklone A309, P148 und P721 mit EMS-generierten Stopcodons im Rahmen von AP3.7 für die Aufdopplung des Chromosomensatzes hin zu tetraploiden Kartoffeln verwendet.

ssII-Gen (IME)

In **Tabelle 4** sind die Ergebnisse dargestellt aus den Arbeiten zur Identifizierung neuer ssII-Allele. ES wurden nur solche Klone in die Gewebekultur aufgenommen und anschließend deren Chromosomensatz aufgedoppelt, in denen neue Stop-Codons entstanden waren.

Klon	Mutation	Exon	AS Tausch
A 240	C5130T	Exon8	P>S
A 73	G5502A	Exon8	V>I
A 227	G5574A	Exon8	E>K
A 331	G5588A	Exon8	W>opa
A 432	G5838A	Exon8	G>R
A 203	G5883A	Exon8	G>R
A 353	G5979A	Exon8	E>K
V 142	G5508A	Exon8	D>N
V 276	C5578A	Exon8	A>V
V 146	G5913A	Exon8	A>T
P 391	G5206	Exon8	G>D
P 218	C5178T	Exon8	P>S
P 359	G5175A	Exon8	D>N
R 333	C5260T	Exon8	T>I
P 147	G5309A	Exon8	W>opa
P 108	G5588A	Exon8	W>opa
P 625	G5154A	Exon8	D>N
P 565	C5178T	Exon8	P>S
P 904	G5175A	Exon8	D>N
C 228	C5131T	Exon8	P>L
P 917	G5175A	Exon8	D>N
P 534	C5178T	Exon8	P>S
P 796	G5125A	Exon8	R>H
C 395	C5130T	Exon8	P>S
C 381	G5358A	Exon8	V>M
C 634	G5122A	Exon8	G>D
P 1175	C5196T	Exon8	P>S
P 1148	C5505T	Exon8	R>C
P 621	G5580A	Exon8	V>M
P 1086	C5640T	Exon8	L>F
P 644	G5832A	Exon8	V>I
P 955	G5845A	Exon8	R>K
P 852	C5859T	Exon8	P>S
P 226	G5838A	Exon8	G>R
C 549	G5467A	Exon8	C>Y
P 1213	C5953T	Exon8	T>I

Tabelle 4: EMS-generierte Klone mit neuen ssII-Allelen
Es sind nur diejenigen Klone dargestellt, die in den Exons solche Mutationen tragen, die zu Aminosäure-Austauschen führen, oder die zur Bildung von *stop codons* führen.

AP 3.6 In-Kulturnahme von Mutationsklonen für ssII (**IME**) und ssIII (**BP**)

Es wurden bevorzugt die Klone mit neuen Stopcodons in die Gewebekultur aufgenommen. Dafür wurden mehrere Achselmeristeme isoliert und das resultierende Vermehrungsmaterial wurde in Form separater Subklone erhalten. Nach der Oberflächensterilisierung wurden diese in die Gewebekultur überführt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den Pflanzen noch um genetisch chimäre Organismen handelt, musste noch gezeigt werden, dass die Mutationen in den etablierten Gewebekulturen noch vorhanden war. Zudem wurden sensitive Medien verwendet um auf die Freiheit von Mikroorganismen zu überprüfen. Einige Pflänzchen pro Subklon wurden in das Gewächshaus überführt und mittels ELISA auf die Freiheit von Mikroorganismen hin überprüft. Es wurden somit nur gesunde Subklone in der Gewebekultur erhalten.

AP 3.7 Einführung in das HAP-Züchtungsprogramm (**BP**)

Der Chromosomensatz dieser diploiden Klone wurde aufgedoppelt hin zu tetraploiden Klonen. Internodien wurden mittels entsprechender Konzentrationen und Verhältnisse an Phytohormonen einer kurzen Kallusphase unterworfen. In dieser tendieren sie zur Verdopplung des Chromosomensatzes, ohne dass Agentien wie Colchicin oder Oryzalin zum Einsatz kommen müssen. Da die Anforderungen bzgl. Konzentrationen und Verhältnissen an Phytohormonen von den Genotypen abhängig sind, erforderte dies aufwändige Arbeiten, um diese für die diversen Klone zu optimieren. Die einzelnen Arbeitsschritte sind schematisch in **Abb.17** dargestellt.

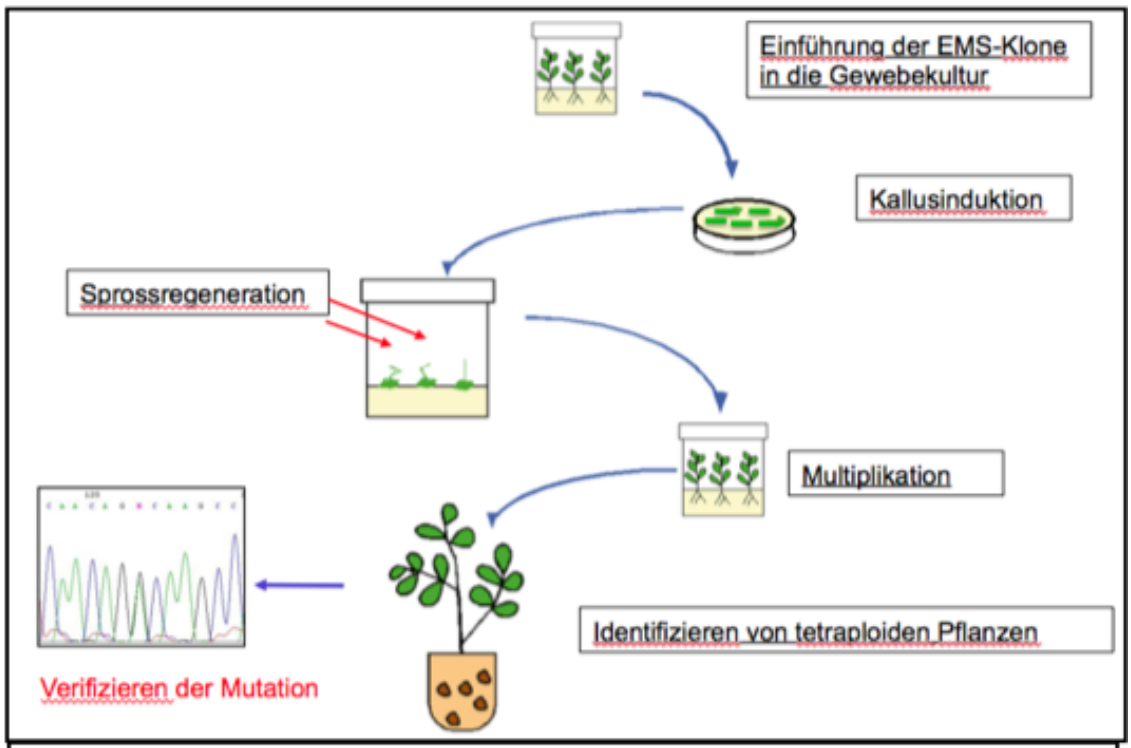


Abbildung 17 : Schematische Darstellung der Aufdopplung des Chromosomensatzes
Von ausgewählten EMS-Klonen werden Achselmeristeme oder Sprossspitzen von Knollenkeimen entnommen, die Oberflächen sterilisiert und in die Gewebekultur aufgenommen. Die erfolgreiche Aufdopplung mittels Kalluskultur wird nach der Regeneration neuer Pflanzen mittels entsprechender Techniken (u.a. Durchfluss-Cytometrie) überprüft. Da die Pflanzen noch chimär aufgebaut sein können, ist zudem das Vorhandensein der Mutation zu überprüfen. Sind die Resultate positiv, so können die Klone als Geniteure in die Züchtung aufgenommen werden.

Die 6 Klone mit *Stop-Codons* im ssII- bzw. ssIII-Gen wurden im Projekt als erstes Material in die Gewebekultur aufgenommen. Durch Induktion einer kurzen Kallusphase erfolgte die Aufdopplung des Chromosomensatzes der diploiden EMS-Klone. Die resultierenden Klone wurden auf eine erfolgreiche Aufdopplung des Genoms, zudem aber auch auf das Vorhandensein der Mutation hin überprüft. Bei der ursprünglichen EMS-Mutagenese von Samen diploider Kartoffeln erfolgten die Mutationen in einem bereits mehrzelligen Embryo. Die resultierenden Pflanzen waren also genetische Chimäre aus mutiertem und nicht mutiertem Gewebe. Zwar erfolgten einige „Aufreinigungsschritte", indem die jeweilige vegetative Folgegeneration aus dem eng umgrenzten meristematischen Bereich des „Auges" der Knolle erwächst. Genetisch homogene Pflanzen werden jedoch erst nach dem ersten Kreuzungsschritt vorliegen, wenn eine Passage über ein Einzell-Stadium (Oocyte, Spermatocyte) erfolgt ist. Zum Ende der Projektlaufzeit liegen die folgenden **Klone mit *Stop-Codons* in den Zielgenen** vor, für die erfolgreich die Chromosomenaufdopplung und Mutationsverifizierung erfolgten:

- A331 (stop codon, ssII-Gen): 9 tetraploide Klone mit Mutation
- P108 (stop codon, ssII-Gen): 20 tetraploide Klone mit Mutation
- P147 (stop codon, ssII-Gen): (schlechtes Wachstum in der Gewebekultur)
- A309 (stop codon, ssIII-Gen): 5 tetraploide Klone mit Mutation
- P148 (stop codon, ssIII-Gen): 21 tetraploide Klone mit Mutation
- P721 (stop codon, ssIII-Gen): (bisher keine erfolgreiche Aufdopplung)
- GR457 (stop codon, ssIII-Gen): (in-Kulturnahme erfolgt)

Kreuzungsarbeiten erfolgten 2013. Die folgenden Klone mit *nonsense*-Mutationen in den Zielgenen ssII und ssIII wurden in der Vegetationsperiode 2013 als Pollenempfänger für Kreuzungen verwendet:

- **A331** (stop codon, **ssII**-Gen); tetraploide Klone mit dem inaktiven Allel in *duplex*
- **A309** (stop codon, **ssIII**-Gen); tetraploide Klone mit dem inaktiven Allel in *duplex*
- **P148** (stop codon, **ssIII**-Gen); tetraploide Klone mit dem inaktiven Allel in *duplex*

Da diese Klone aus der Aufdopplung diploider Klone hervorgingen, die die mutierten Allele in einfacher Kopie trugen, besitzen diese Klone, wie oben dargestellt, die **inaktiven ssII- bzw. ssIII-Allele** jeweils in ***duplex***.

Diese inaktiven ssII- und ssIII-Allele sollten mit inaktiven gbssI-Allelen kombiniert werden, um die Seitenketten des Amylopektins zu verkürzen. Hierfür standen HAP-Klone (HochAmyloPektin) zur Verfügung, die **homozygot (*quadruplex*)** sind für **inaktive**

Abb.18: Kreuzungsarbeiten mit A309
Tetraploide Klone mit dem ssIII-Allel A309 wurden in der Vegetationsperiode 2013 als Pollenempfänger eingesetzt. HAP-Klone wurden als Pollenspender verwendet. Beeren, die sich bilden, werden von Tüten umhüllt.

gbssI-Allele. Zudem wurde zum Einbringen von Leistungsmerkmalen eine Stärkesorte als Pollenspender verwendet. Die Beerenernte erfolge zum Ende des Projektes. Die Samen wurden eingelagert für weitere Arbeiten.

II.2. Verwertung (der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschrittenen Verwertungsplanes)

voraussichtlicher Nutzen

Eine Veränderung der Seitenkettenlänge des Amylopektins wird es der Stärkeindustrie ermöglichen, die Produktcharakteristika ohne chemische Veränderung der Stärke zu verändern. Solche Charakteristika sind z.B. die Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Löslichkeit, Stabilität gegen Scherung, Retrogradierung und Klebstärke. Weitere Möglichkeiten eröffnen sich durch die Produktion chemisch modifizierter Stärken. Hier wird für die gleiche Produktqualität weniger Energie, weniger Abfall/ Schmutzwasser benötigt/erzeugt. Dies reduziert die Produktionskosten und führt zu umweltfreundlicheren Produktionsprozessen.

Beispiele hierfür sind ein geringerer Bedarf an Fixativen und Aufhellern während der Papierproduktion. Die Erzeugung spezifischer thixotroper Eigenschaften bei Bohranwendungen ist möglich. Im Nahrungsbereich kann eine bessere Textur in der Produktion von Snacks und Kartoffelprodukten (Flocken, Granulat) erzielt werden. Hohe Stabilitäten gegenüber Scherung und hoher Temperatur sind positive. Somit können Vereinfachungen in den Modifikationsprozessen und/oder bessere Produktqualitäten erzielt werden.

Die Untersuchungen des Projektpartners Emslandstärke zeigten, dass sowohl die Inaktivierung des ssII- als auch des ssIII-Gens zu einer Verbesserung der Qualitäten von HAP-Stärkekleistern führt. HAP-Stärken aus Pflanzen ohne ssIII-Aktivität zeigten jedoch die besten Produkteigenschaften, sowohl was die Langzeitstabilität als auch die Klarheit der Gele betrifft. Deshalb soll angestrebt werden, Pflanzen zu züchten, die homozygot sind für Allele der beiden Gene.

Verwertbarkeit des Ergebnisses

In dem Projekt wurden neue Allele der beiden ss-Gene generiert durch EMS-Mutagenese von Samen, die von Geniteuren aus einem praktischen dihaploiden Kartoffel-Züchtungsprogramm stammen. Nach der Chromosomenaufdopplung und einem ersten Kreuzungsschritt stehen nun tetraploide Zuchtklone zur Verfügung, die die neuen ss-Allele in Kombination mit inaktiven gbssI-Allelen tragen.

Für die Erstellung optimierter Amylopektinqualitäten mit kurzen Seitenketten müssen Klone vorliegen, die homozygot sind sowohl für ein inaktives gbssI-Allel (keine Amylosebildung) als auch für ein inaktives ssIII-Allel (keine Bildung langer Seitenketten).

Die Kartoffel ist tetraploid und folgt einem tetrasomen Erbgang. Werden z.B. zwei Zuchtklone miteinander gekreuzt, die ein inaktives Allel in doppelter Dosis *(duplex)* tragen, so sind nur 1/36 der Nachkommen homozygot für dieses Allel. Sollen die defekten Allele von zwei Genen (gbssI, ssIII) homozygot vorliegen, so wären bei der entsprechenden Kreuzung nur 1/36 x 1/36 = 1/1.296 der Nachkommen homozygot für beide Allele.

Erschwerend kommt hinzu, dass in der Kartoffelzüchtung bis zu 40 weitere Merkmale zu berücksichtigen sind. Dieses erfolgt im Rahmen der Kombinationszüchtung der Kartoffel, in der ein Züchtungszyklus 10 Jahre dauert (1. Jahr Kreuzung, 9 Jahre vegetative Vermehrung und Selektion).

Es zeigt sich, dass für neue, durch das TILLING generierte inaktive Allele und deren rezessiv vererbte Merkmale neue Züchtungs- und Selektionsstrategien zu entwickeln sind. Kreuzungen müssen hierbei möglichst in jährlichen Schritten erfolgen, die Sämlingsanzucht muss in die *in vitro* Kultur verlegt und die Selektion muss ebenfalls *in vitro* erfolgen mittels molekularer Marker.

Hierfür sind neue Infrastrukturen und Strategien zu entwickeln und anzuwenden am Beispiel der in diesem Verbundprojekt erstellten Klone. Ein Projektantrag zu dieser Thematik „**H**ochdurchsatz-**A**nalytik für eine **T**ILLING-adaptierte **Z**üchtung“ (**HATZ**) soll nach Ablauf der Laufzeit dieses Projektes eingereicht werden.

II.3. Erkenntnisse von Dritten (während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen) .

Es sind keine Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens von anderer Stelle bekannt geworden.

II.4. Veröffentlichungen (die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses)

Zunächst ist die Veröffentlichung bei TIB Hannover vorgesehen.
Um eine Publikation in wissenschaftlichen Zeitschriften zu ermöglichen, müssen zunächst Pflanzen mit ansteigender Dosis der inaktiven Allele bis hin zum homozygoten Zustand erstellt werden. Danach sind dann Knollen für die Stärkeanalytik zu produzieren. Deshalb kann eine weitere Publikation erst in einigen Jahren erfolgen.

Literatur:

Haebel, S., Hejazi, M., Frohberg, C., Heydenreich, M. und Ritte, G. (2008): Mass spectrometric quantification oft he relative amoints of C6 und C3 position phosphorylated glycosyl residues in starch. Analytical Biochemistry 379, 73-39.

Hizukuri, S., Tabata, S. und Nikuni, Z. (1970): Studies on starch phospate. Part I: Estimation of glucose-6-phosphate residues in starch and the presence of other bound phosphate(s). Stärke 22, 338-343.

Karlsson, M. (2005): Starch in processed potatoes. Influence of tuber structure, thermal treatments and amylose/amylopectin ration, Ph.D. Theis, Lund University.

Lindhauer, M.G. und Haase, N.U. (2003): Schlussbericht des FNR-geförderten Vorhabens K661/00NR; Verbund: Genetische Optimierung der Kartoffel als dominierender Stärkelieferant der Bundesrepublik Deutschland durch Züchtung, Zell- und Molekularbiologie. TechnischeInformationsBibliothek (TIB) Hannover