

Etablierung der TILLING-Technik im hexaploiden Winterweizen

M. SCHMOLKE

In den letzten Jahren wurden Wissenschaftlern zunehmend DNA-Sequenzinformationen zugänglich gemacht. So ist beispielsweise bereits vor 6 Jahren die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* vollständig sequenziert worden. Zudem hat man auch bei Kulturpflanzen beispielsweise über Expressionsanalysen (ESTs, expressed sequence tags) und Map-based-cloning Strategien Sequenzinformationen von Genen ermitteln können. Auf diese Weise können also Kandidatengene für ein Merkmal identifiziert werden, die eigentliche Funktion dieser Gene muss jedoch verifiziert werden. Induzierte Mutationen spielen bei der Aufklärung der Funktion eines Gens eine zentrale Rolle. Bei der Reversen Genetik soll ausgehend von der DNA-Sequenz die Funktion eines Gens charakterisiert werden. Dafür wird geprüft, inwiefern Mutationen innerhalb der Gensequenz einen Einfluss auf den Phänotyp der Mutanten haben.

Eine Methode der Reversen Genetik ist TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes). TILLING kombiniert die Vorteile der chemischen Induktion von Punktmutationen mit High-throughput Methoden der DNA-Analyse. Über TILLING können potentiell in jeder beliebigen Gensequenz Punktmutationen induziert und so alle Serien für ein Gen entwickelt werden. Die Analyse von Individuen mit unterschiedlichen Mutationsallelen sollten Rückschlüsse hinsichtlich der Genfunktion ermöglichen. Zudem können neue Allele entstehen, welche die Wirkung des Wildtyps übertreffen und einen Nutzen für die Züchtung haben.

TILLING wurde bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelt (MC-CALLUM et al. 2000, GREENE et al. 2003) mittlerweile wurden aber auch erste Ergebnisse von der Etablierung dieser Technik bei Nutzpflanzen wie Gerste (CALDWELL et al. 2004), Mais

(TILL et al. 2004) und Weizen (SLADE et al. 2005) veröffentlicht.

Im tetraploiden und hexaploiden Weizen konnten über TILLING 246 verschiedene Mutationsallele für die homöologen Wachsloci *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* induziert und nachgewiesen werden. Die Kreuzung zwei dieser Mutanten hat dazu geführt, dass eine annähernd Null-Amylose Weizenlinie entwickelt werden konnte (SLADE et al. 2005).

Ziel unseres Projekts ist die Etablierung der TILLING Methode im hexaploiden Winterweizen mit einer mutagenisierten Population der Sorte Dream. Dafür wurde Saatgut mit Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt, um zufällig im Genom verteilte Punktmutationen zu induzieren.

EMS verursacht Punktmutationen, wobei zu 99% G/C zu A/T Transitionen entstehen (GREENE et al. 2003). Da die M_1 -Pflanzen für die induzierten Mutationen chimär sind, werden ein oder zwei Körner jeder M_1 -Pflanze zur M_2 -Generation weitergeführt. Um die Suche nach Pflanzen mit Punktmutationen in einer Zielsequenz effizienter zu gestalten, wird genomische DNA von vier bis acht M_2 -Pflanzen gepoolt. Aus diesen DNA-Pools wird über eine PCR die Zielsequenz amplifiziert. Die Primer für diese PCR sind mit unterschiedlichen Infrarot-Farbstoffen markiert. Zur Bildung von Heteroduplexmolekülen zwischen mutierter und Wildtyp-DNA werden die PCR-Produkte erhitzt und wieder gekühlt, um eine Hybridisierung von DNA-Strängen verschiedener Individuen zu zulassen kann. Anschließend wird der Reaktionslösung die Endonuklease *Cel1* zugegeben. *Cel1* erkennt und schneidet spezifisch Basenfehlpaarungen (OLEY-KOWSKI et al. 1998). Mittels Polyacrylamidgelelektrophorese werden geschnittene PCR-Fragmente getrennt und mit einem Li-Cor-DNA-Analyser detektiert. Bei der Detektion der Fragmente kön-

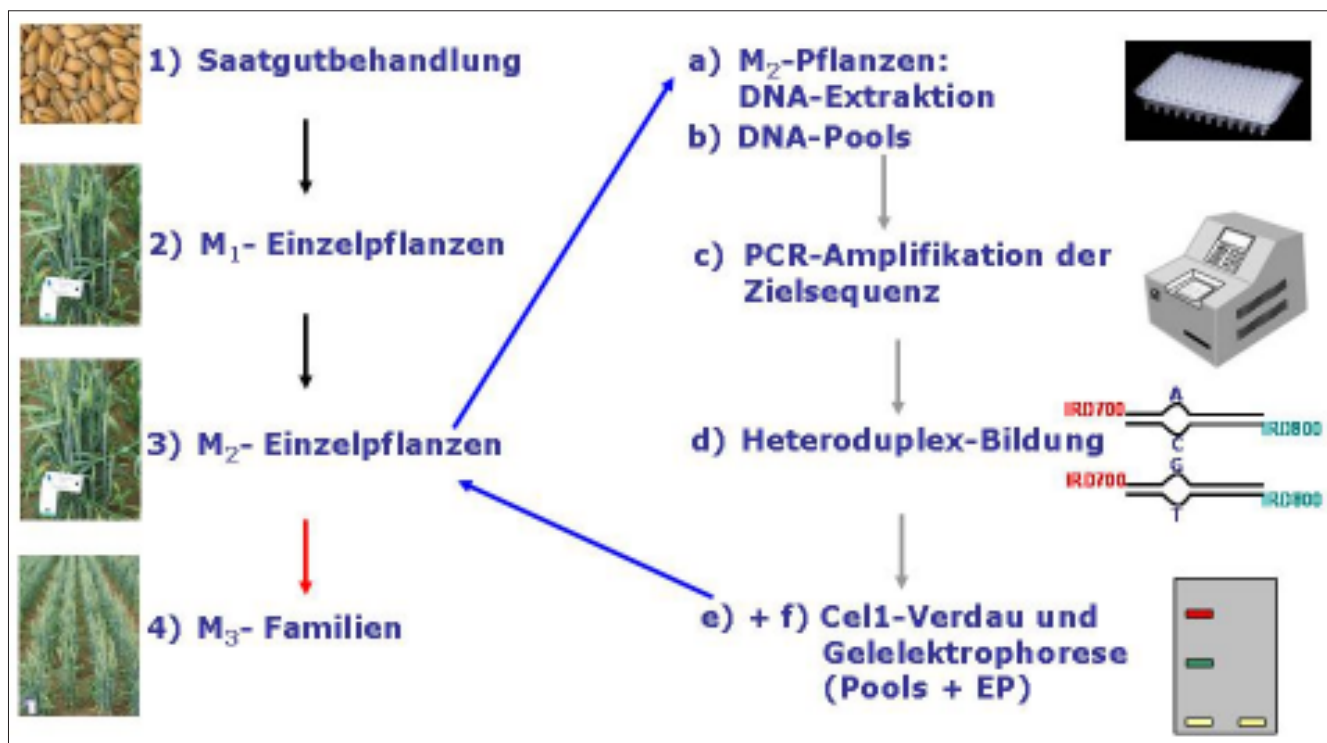
nen Artefakte (falsch-positive Fragmente) ausgeschlossen werden. Eine Punktmutation in der Zielsequenz liegt nur vor, wenn in einem Pool zwei unterschiedlich markierte Fragmente detektiert werden, deren addierte Basenpaargrößen der Größe des Wildtyp-Fragments entsprechen. Derart identifizierte Pools werden aufgelöst und die DNA der Einzelpflanzen untersucht. Damit es zur hier Entstehung von Heteroduplexmolekülen kommen kann, wird genomische DNA der Einzelpflanzen aus den Pools und Wildtyp-DNA miteinander vermischt. Auf diese Weise können M_2 -Einzelpflanzen mit Punktmutationen in der Zielsequenz identifiziert werden.

Die PCR-Fragmente von Pflanzen mit Punktmutationen in der Zielsequenz werden für die Ermittlung der Mutationsdichte sequenziert. Die Effekte von Mutationsallelen eines Gens (inklusive von Knock-out-Mutationen) werden in der M_3 -Generation der entsprechenden Pflanzen untersucht, um Hinweise auf die Funktion der Kandidatengene zu erhalten.

Für TILLING Analysen ist die Mutationsdichte im Zusammenhang mit der Individuenanzahl der Population ein kritischer Faktor. Zum einen muss gewährleistet sein, dass Mutationen in der Zielsequenz vorkommen zum anderen steigt bei der Induktion von zu hohen Mutationsdichten das Risiko von letalen Defekten und der Entstehung von sterilen Pflanzen. Aus diesem Grund wurden zunächst zwei Subpopulationen mit den EMS-Konzentrationen 0,4%, 0,6% entwickelt und deren Keimrate bestimmt (HOLZAPFEL 2005). Insgesamt wurden 10000 Körner der M_1 -Pflanzen der im Feld angebaut. Aus diesem Ansatz resultierten 2700 fertile M_2 -Pflanzen. Anhand von 600-800 dieser M_2 -Generation soll die Mutationsdichte bestimmt werden. Für diese Bestimmung ist geplant Se-

Autor: Dr. Michael SCHMOLKE, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, 85350 FREISING





Schematische Darstellung der TILLING-Methode

quenzabschnitte der klonierten Vernalisationsgene *Vrn-A1*, *Vrn-B1* und *Vrn-D1* zu verwenden.

Referenzen

CALDWELL, D.G., N. MCCALLUM, P. SHAW, G.J. MUEHLBAUER, D.F. MARSHALL and R. WAUGH, 2004: A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* 40: 143-150.

GREENE, E.A., C.A. CODOMO, N.E. TAYLOR, G.J. HENIKOFF, B.J. TILL, S.H. REYNOLDS, C.L. ENNS, C. BURTNER, J.E. JOHNSEN, A.R. ODDEN, L. COMAI and S. HENIKOFF, 2003: Spectrum of chemically induced

mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics* 164: 731-740.

HOLZAPFEL, J. 2005: Erstellung einer TILLING Population und Validierung von SSR Markern für Fusarium-Resistenz bei Weizen (*Triticum aestivum* L.) Diplomarbeit, LS Pflanzenzüchtung, TU München.

MCCALLUM, C.M., E.A. COMAI, L. GREENE and S. HENIKOFF, 2000: Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol* 18: 455-457.

OLEYKOWSKI, C.A., C.R. BRONSON MULLINS, A.K. GODWIN and A.T. YEUNG, 1998: Mutation detection using

a novel plant endonuclease. *Nuc Acids Res* 26: 4597-4602.

SLADE, A.J., S.I. FUERSTENBERG, D. LOEFFLER, M.N. STEINE, D. FACCIOTTI, 2005: A reverse genetic, non-transgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotech* 23: 75-81.

TILL, B.J., S.H. REYNOLDS, C. WEIL, N. SPRINGER, C. BURTNER, K. YOUNG, E. BOWERS, C.A. CODOMO, L.C. ENNS, A.R. ODDEN, E.A. GREENE, L. COMAI and S. HENIKOFF, 2004: Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol* 4: 12.