

Random and CRISPR-Cas mutagenesis to create oilseed rape with reduced seed phytic acid content

Doctoral Dissertation von Niharika Sashidhar

Zusammenfassung

Brassica napus L. ist eine bedeutende Ölf Frucht in gemäßigten Breiten und wird zur Ölproduktion und zur Nutzung als Tierfutter angebaut. Züchter bemühen sich um eine Verringerung von antinutritiven Substanzen wie Phytinsäure (PS) im Rapsextraktionsschrot, da diese ernsthafte Probleme bei der Fütterung von monogastrischen Nutztieren verursachen.

Weil die natürliche Variation des PS-Gehalts in Raps gering ist, war das Ziel dieser Studie die Verringerung von PS in einem Mutationsansatz. Aufgrund von Gen-Annotationen in *Arabidopsis* wählte ich sieben Gene, die für Schlüsselenzyme der PS-Biosynthese kodieren, und ein Transportergen aus. Die entsprechenden Raps Gene wurden als *BnMIPS*, *BnMIK*, *BnIMP*, *Bn2-PGK*, *BnITPK*, *BnIPK2 β* , *BnIPK1* und *BnMRP5* bezeichnet. Da viele Zwischenprodukte der PS-Synthese auch eine Rolle als Substrate in anderen Stoffwechselprozessen spielen, war eine sorgfältige Auswahl der Zielgene nötig, um keine Störungen in wesentlichen physiologischen Prozessen zu verursachen. Ich habe in dieser Studie das Gen *BnIMP* nicht verwendet, da sein Produkt Inositol-Monophosphat an verschiedenen Signalprozessen und im Purinstoffwechsel beteiligt ist.

Um die Gesamtzahl der Gene zu identifizieren, die für die sieben Schlüsselenzyme kodieren, führte ich eine *in silico* Analyse durch und fand insgesamt 59 Gene in Raps, die den sieben *Arabidopsis*-Genen entsprachen. Um die Zahl von Kandidatengenen für Knockout-Studien weiter einzugrenzen, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Für den Mutationsansatz wurde sowohl Genom-Editing mittels CRISPR-Cas9 sowie TILLING by Sequencing (TbyS) in einer EMS-mutagenisierten Rapspopulation verwendet. Für alle Gene wurden paralog-spezifische Primer entwickelt, die sich auch nachher bei der Unterscheidung paralog-spezifischer Mutanten als nützlich erwiesen. Abschließend wurden 12 hochexprimierte Paraloge für den TbyS-Ansatz ausgewählt und mehr als 90% ihrer kodierenden Regionen untersucht, um mutmaßliche Knockout-Mutanten zu erhalten. Ich konnte insgesamt 1437 putative EMS-Mutationen identifizieren. Für alle untersuchten Gene mit Ausnahme eines *BnMIK* Paralogs wurden Stopcodon-Mutationen gefunden, die einen Funktionsverlust des kodierten Proteins verursachen. Da die Genfamilie von *BnITPK* 14 Paraloge umfaßte, habe ich dafür einen CRISPR-Cas9-Ansatz gewählt und fand Knockout-Mutanten in drei Paralogen von *BnITPK1* und *BnITPK4*. Ich konnte die Vererbung der editierten Allele von der T₁ bis zur T₄ Generation aufzeigen und damit wertvolle Information zur Selektion zusätzlicher Mutantenallele in fortgeschrittenen Generationen gewinnen.

EMS Einzelmutanten wurden durch Kreuzung zu Doppelmutanten kombiniert. Bei der Phänotypisierung zeigten die Einzelmutanten keine reduzierten PS-Gehalte, was die Vorstellung redundanter Gene in Polyploiden unterstützt. In Doppelmutanten von *bn2-pgk2* beobachtete ich jedoch eine PS-Reduktion von 25,4% und in Doppelmutanten des PS-Transportergens *BnMRP5* 15% weniger PS. Weitere Untersuchungen von Doppelmutanten der übrigen EMS-Mutanten stehen noch aus. Die Reduktion in den CRISPR-Cas *bnitpk* Dreifachmutanten war noch größer und betrug 27,2%. Darüberhinaus zeigten sie auch eine Erhöhung der Gehalte an anorganischem Phosphat, was einen zusätzlichen wirtschaftlichen Nutzen für die Verwendung als Tierfutter bedeuten könnte.

Abschließend läßt sich sagen, daß in dieser Studie vielversprechende Kandidaten für die Züchtung von Niedrig-Phytinsäure-Raps gefunden wurden, sowohl für die Nutzung als Tierfutter für Geflügel und Fische als auch für die menschliche Ernährung. Dies könnte ein Ersatz für Sojaprotein in der Zukunft sein.