

# Production of oilseed rape with increased seed shattering resistance

MSc Janina Braatz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Jung

Raps (*Brassica napus*) ist die wichtigste Ölpflanze Deutschlands, die zudem großflächig in Kanada, China und Indien angebaut wird. Typisch für die Gattung *Brassica* ist die Bildung von Schoten, welche zur Reife entlang einer Zellschicht zwischen Schotenwand und Replum (Dehiszenz-Zone) aufplatzen. Auf dem Feld wird das Platzen beispielsweise durch landwirtschaftliche Maschinen, Hagel oder Tiere ausgelöst. Zusätzlich zum Ernteverlust bereitet der Durchwuchsrap Probleme. Demnach ist die Selektion von Rapssorten mit platzfesten Schoten ein wichtiges Zuchtziel.

Ein Ansatz zur Entwicklung fester Schoten ist die Modifikation der Sollbruchstelle. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sind die Transkriptionsfaktoren INDEHISCENT (IND) und ALCATRAZ (ALC) maßgeblich an der Differenzierung des Gewebes beteiligt. Während ALC und IND den enzymatischen Abbau der sogenannten Trennschicht einleiten, induziert IND auch die Lignifizierung der benachbarten Zellschicht, vermutlich über die Gene *NAC SECONDARY WALL THICKENING FACTOR 1* und *3* (*NST1/3*).

Ziel meiner Arbeit war es, durch die Mutagenese von Genen, welche die Differenzierung des Gewebes der Sollbruchstelle kontrollieren, Raps mit platzfesteren Schoten zu erzeugen. Nachfolgend sollte die Platzfestigkeit durch Labortests und Feldversuche untersucht werden. Zur Materialgewinnung wählte ich folgende Ansätze: Die gezielte Mutagenese von zwei *BnALC* und vier *BnNST1* Homöologen mit der CRISPR/Cas9 Methode sowie die chemische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS) zur Induktion zufälliger Punktmutationen. *Bnind* EMS Mutanten standen zu Beginn der Arbeit bereits zur Verfügung.

Zur gezielten Mutagenese transformierte ich CRISPR/Cas9 Konstrukte mit *Agrobacterium tumefaciens* in Raps hypocotyle und regenerierte transgene T<sub>1</sub> Pflanzen. Ich bestätigte die effiziente Mutagenese aller *Bnalc* Sequenzen bei Abwesenheit von Wildtypallelen. Dagegen fand ich für jedes *BnNST1* Gen bis zu fünf mutierte Allele sowie verbliebene Wildtypsequenzen. Eine Analyse der *BnNST1* Vererbung steht noch aus. *Bnalc* Mutationen spalteten in der T<sub>2</sub> nach Mendel und zeigten in einem Zugkrafttest die erwartete Schotenfestigkeit. Allerdings erwies sich die transformierte Sorte „Haydn“ als *per se* platzfest, sodass der Effekt gering ausfiel. Um den Phänotyp zu bestätigen, untersuchte ich bis zu 3.840 EMS-mutagenisierte M<sub>2</sub> Pflanzen der platzenden Sorte „Express“ nach *Bnalc* Mutationen. Aus 79 Kandidaten selektierte ich vier Mutationen, die ich durch Kreuzung zu drei Doppelmutanten kombinierte. Eine der im Gewächshaus angebauten Doppelmutanten erwies sich im Zugkrafttest als platzfest, was den *Bnalc* Phänotyp untermauerte.

Die *Bnind* Mutanten wurden ebenfalls im Gewächshaus untersucht und die Platzfestigkeit der geernteten Schoten mit drei Tests (Zugkrafttest, Aufpralltest, Biegebalkentest) bestätigt. Erste Felddaten legten eine Korrelation von Laborergebnissen und tatsächlichen Ernteverlusten nahe. Durch mikroskopische Analysen gefärbter Kryoschnitte schloss ich eine atypische Lignifizierung der *Bnind* Doppelmutante aus. Nähere Untersuchungen zeigten hingegen eine vergrößerte Auflagefläche zwischen Schotenwand und Replum sowie kleinere, abgerundete Zellen. Diese Beobachtungen suggerierten ein neues Modell der *Bnind* Wirkung: In „Express“ kann sich ein Riss entlang der Sollbruchstelle leichter ausbreiten als in der Mutante, weil er dort häufiger (an jeder kleinen Zelle) neu initiiert werden muss. Dieser Effekt wird durch die große Kontaktfläche verstärkt.