

Georg-August Universität Göttingen, DNPW,
Abteilung für Zuchmethodik der Pflanze
apl. Prof. Dr. Wolfgang Link wlink@gwdg.de

18. March 2025

MSc Henri Laugel, Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Doktorand

Zuwendungsempfänger: Georg-August-Universität Göttingen

Förderkennzeichen: 2820EPSS003

Zwischenbericht / Interim Report

Name des Projekts: **Abo-Direkt**

Dauer des Projekts: 01.12.2022 – 30.11.2025

Berichtszeitraum: 30.04.2024 – 18.03.2025

1. Wichtigste wissenschaftliche und technische Ergebnisse

Arbeitspaket P1 bis P3: Genotypisierung von Individuen der Ackerbohne

Die Genotypisierung der Individuen der Ackerbohne ist abgeschlossen. Anhand der gesammelten genotypischen Daten konnten wir die populationsgenetische Zusammensetzung der Göttinger Winterbohnenpopulation (GWBP) darstellen.

Arbeitspaket P4 bis P6: Kalibrierung und Validierung der genomischen Vorhersage

Es wurde ein erstes genomisches Vorhersagemodell erstellt und entsprechend die Ausprägung mehrere Feldmerkmale der Nachkommenschaften der mit dem Axiom-Chip genotypisierten GWBP-Individuen genomisch vorhergesagt. Um diese Vorhersage zu validieren, wurden also 143 von ihnen durch kontrollierte Selbstbefruchtung in Isolierhäusern/Käfigen vermehrt. Ihre Nachkommen werden derzeit (Saison 2025, Aussaat im Herbst 2024) im Feld in Parzellen mit 200 Pflanzen an drei Standorten (Göttingen, Hohenlieth und Wartmannsroth) getestet. Genauer gesagt interessieren wir uns für die Pflanzenhöhe, den Zeitpunkt des Blühbeginns, das Lager, die Reifezeit, das Tausendkorngewicht (TGW) und den Kornertrag. Die Merkmale Trockenstresstoleranz, Winterhärte und die Resistenz gegen Mehltau und Ascochyta werden insofern erfasst und die Vorhersage validiert, als die laufende Saison an den drei Umwelten dafür Variation erzeugt.

Arbeitspaket P7: Theoretische Arbeit

Um unser Ziel zu erreichen, hoch ingezüchtete Individuen aus der Ackerbohnenpopulation zu identifizieren, haben wir zunächst die Annahme des Projekts überprüft, dass nämlich solche hoch ingezüchtete Individuen in den Populationen vorhanden sind, und uns dann darauf konzentriert, den besten und effizientesten Ansatz zu finden, um diese mithilfe von KASP-Markern zu identifizieren.

Für das Projekt definierten wir hoch ingezüchtete Individuen als solche, die einen Inzuchtkoeffizienten von mehr als 0,83 aufweisen, wobei wir eine Schätzung aus genomweiten genotypischen Daten verwendeten. Dieser Wert von 0,83 wurde aus Expertenwissen heraus festgelegt. Er ergibt sich auch aus dem 20 %-Quantil der Verteilung des Inzuchtkoeffizienten von F4-Linien der Ackerbohne, die in praktischen Zuchtprogrammen als ausreichend ingezüchtet gelten, um als Ausgangs-Elter einer Liniensorte benutzt zu werden.

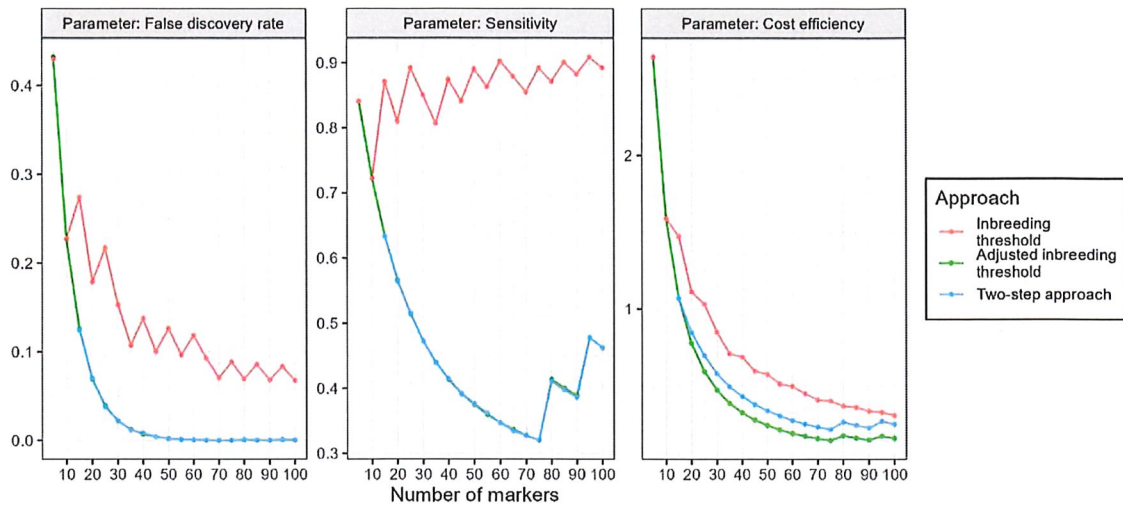
Nach dem Testen mehrerer Inzuchtkoeffizienten-Schätzer, die auf genotypischen Daten beruhen, unter Verwendung simulierter und empirischer Daten, wählten wir vier aus, die eine vergleichbare Zuverlässigkeit aufweisen. Wir haben uns schlussendlich für den Likelihood-Schätzer (FL) entschieden, weil seine Treffsicherheit bei der Schätzung des Inzuchtkoeffizienten mit empirischen Daten (bewertet über den mittleren quadratischen Fehler RMSE), etwas besser war als für die anderen drei Schätzer.

Anhand der genotypischen Daten (SNP, Axiom-Chips) haben wir herausgefunden, dass 92 einzelne Pflanzen (etwa 12 % der Gesamtpopulation von 767 Individuen) hoch ingezüchtet sind.

Wir versuchten drei Arten von Ansätzen, um diese hoch ingezüchteten Individuen kosteneffizient zu identifizieren. Für jeden Ansatz untersuchten wir die Anzahl der SNP-Marker, die erforderlich sind, um die Sensitivität (Anteil der ausgewählten hoch ingezüchteten Individuen), die FDR (Anteil der ausgewählten Individuen, die nicht ausreichend ingezüchtet sind) und die Kosteneffizienz (Sensitivität; ermittelt mit Kosten für DNA-Extraktion und KASP-Analyse) zu optimieren. Beim ersten Ansatz werden die Individuen auf der Grundlage des zuvor definierten Inzuchtschwellenwerts von 0,83 ausgewählt. Der zweite Ansatz berücksichtigt die Verteilung des individuellen Inzuchtkoeffizienten in der Population, um die FDR unter Verwendung eines angepassten Inzuchtschwellenwerts zu kontrollieren. Der dritte Ansatz basiert auf dem zweiten, verwendet aber zusätzlich einen Vorselektionsschritt, um die nicht ausreichend ingezüchteten Individuen zu eliminieren und so die Kosten des letzten Selektionsschritts zu reduzieren.

Die Ergebnisse aller Ansätze sind in Abb. 1A mit simulierten Daten und in Abb. 1B mit empirischen Daten dargestellt.

A.



B.

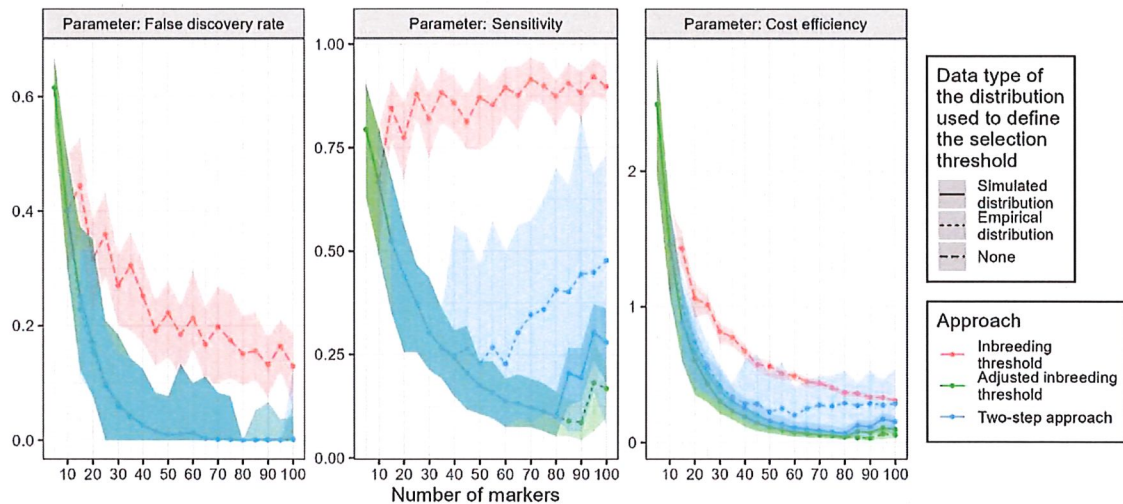


Abb. 1 Variation der drei Parameter zur Bewertung des Ansatzes in Abhängigkeit von der Anzahl der Marker (beim zweistufigen Ansatz entspricht sie der Anzahl der Marker im letzten Auswahlschritt) unter Verwendung der drei Ansätze mit (A.) simulierten und (B.) empirischen Daten. Der Legende zeigt, ob simulierte oder empirische Daten zur Anpassung der Auswahlchwelle im zweiten und dritten Ansatz verwendet wurden. Mit empirischen Daten erhielten wir 50 Werte pro Kombination von Markeranzahl und Ansatz aus 50 Markersätzen; die Punkte stellen deren Durchschnitt dar und die Bänder den Bereich der Werte.

Insgesamt schnitt der erste Ansatz in Bezug auf die Empfindlichkeit am besten ab, erlaubte aber keine Kontrolle der FDR, die nicht unter 5 % lag. Mit den beiden anderen Ansätzen konnte die FDR stark reduziert werden, was sich jedoch stark auf die Empfindlichkeit auswirkte. Darüber hinaus kann die FDR bei empirischen Daten selbst bei einer hohen Anzahl von Markern unter Verwendung der beiden angepassten Ansätze stark variieren (sie kann selbst bei Verwendung von 65 Markern höher als 5 % sein). Schließlich haben wir festgestellt, dass beim dritten Ansatz die Kenntnis der empirischen Verteilung des individuellen Inzuchtkoeffizienten in der Population die Sensitivität deutlich erhöht.

Wir untersuchten Schemata von praktischen Zuchtprogramme für Ackerbohnen, die uns insbesondere von der Firma NPZ zur Verfügung gestellt wurden, und leiteten neue Schemata ab, die unsere entwickelten zuchtmethodischen Konzepte umsetzen. Diese Schemata ermöglichten es, die Umsetzung dieser Methoden zu untersuchen und zu diskutieren, um den Züchtern von Ackerbohnen entsprechende Empfehlungen zu geben. Diese Arbeit muss intensiviert und fortgesetzt werden.

Die theoretischen Arbeiten über die Algebra des LD-Zerfalls und die genetische Zusammensetzung in teilweise allogamen Populationen können nach aktuellem Stand erst in der letzten Phase des Projekts durchgeführt werden.

Arbeitspaket P8: Feldversuche

In der letzten Saison (2024) haben wir drei Feldversuche durchgeführt. Zunächst sammelten wir phänotypische Daten von 838 Selbstungs-Nachkommen, die aus Individuen der GWBP in unserer Zuchtschule stammen. Die Parzellen waren 30 Pflanzen groß. Einige der Nachkommen wurden auch in Hohenlieth von unserem Partner NPZ getestet, aber sie konnten witterungsbedingt erst sehr spät nämlich Mitte Januar ausgesät, was zu problematischen Beständen führte und die Interpretation der Daten extrem erschwerte. In Göttingen wurde die Entwicklung einiger Parzellen durch eine unbeabsichtigte Verdichtung des Bodens durch ein Traktorräder während der Aussaat beeinträchtigt. Die ausgewerteten Daten werden uns dennoch einen ersten Hinweis auf die Genauigkeit der genomischen Vorhersage geben und eine Vor-Selektion von überlegenen Genotypen ermöglichen.

Unser Feldversuch über die Mendelsche Stichprobenvarianz (MSV) unter halbkontrollierten Bedingungen ergab wie geplant phänotypische Daten von Einzelpflanzen. Die bewerteten Merkmale umfassten Pflanzenhöhe, Blühbeginn und -ende, TGW und Ertrag. Weitere morphologische Daten und Ertragskomponenten der geernteten Pflanzen werden derzeit gesammelt. Die analysierten Daten werden es uns insbesondere ermöglichen, die züchterisch relevante Beziehung zwischen Heterozygotie von Eltern und Variation von Merkmalen innerhalb und zwischen ihren Selbstungs-Nachkommen zu untersuchen.

Schließlich haben wir planmäßig einen Feldversuch durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen dem Vicin-Convicin-Gehalt (VC) der Samen und der Toleranz gegenüber der Leguminosenmüdigkeit („Fatigue“; Bedrohung der Ackerbohne durch bodenbürtige Krankheitserreger wie Fusarium) zu untersuchen. Ein Großteil der relativ VC-armen und relativ VC-reichen Linien aus einem Assoziationsset von Linien, die aus der GWBP durch Single-Seed-Descent (SSD) abgeleitet wurden, wurden auf einem Feld mit Leguminosen-Fatigue getestet (der Erregerdruck auf diesem Feld wurde durch den Anbau von Ackerbohnen-Monokultur über mehr als 7 Jahre akkumuliert; orgprints.org/id/eprint/39470/1/2815EPS004_Abschlussbericht.pdf). Unerwarteterweise haben wir auf dem Feld nicht viele Krankheitssymptome beobachtet. Es gab keinen Unterschied zwischen den niedrigen und den hohen VC-Mengen. Wir nahmen an, dass die Aussaat und die Umweltbedingungen für die Entwicklung von Krankheiten nicht günstig waren. Der Versuch wird aktuell wiederholt.

In dieser Saison (2025, Aussaat im Herbst 2024) haben wir vier Feldversuche. Wie bereits erwähnt, führen wir eine gemeinsame Feldprüfung in Göttingen, Hohenlieth

und Wartmannsroth durch, um die Feldleistung von Selbstungs-Nachkommen von Individuen aus der GWBP zur Validierung unseres genomischen Vorhersagemodells zu untersuchen.

Wir haben zwei weitere Versuche in Göttingen-Reinshof: (1) einen zur Phänotypisierung von Selbstungs-Nachkommen von 81 genotypisierten Individuen, die aus der GWBP stammen, (2) und einen weiteren als Erweiterung unseres MSV-Versuchs aus der letzten Saison, der darauf abzielt, die genetische Variation innerhalb und zwischen Familien von insgesamt 122 Selbstungs-Nachkommen von genotypisierten Einzelpflanzen unter Feldbedingungen zu untersuchen. Beide Versuche bestehen aus Parzellen mit 30 Pflanzen pro Parzelle.

Schließlich haben wir (s.o.) den im letzten Jahr angelegten VC-Versuch im Feld mit Leguminosenmüdigkeit wiederholt, wobei wir dasselbe Versuchsdesign verwendeten und auf ‚günstigere‘ Bedingungen hoffen, um aussagekräftig die Hypothese zu bestätigen oder abzulehnen (Einfluss von Vicin-Convicin auf Wüchsigkeit an einem Leguminosen-müden Standort).

Arbeitspaket P9: so-genanntes ‚Chipped-Seed‘ Experiment

Ackerbohnsensamen wurde in der einen oder anderen Weise eine minimale Menge Samengewebe für DNA-Extraktion entnommen (‚chipped seed‘). Die DNA-Extraktion aus diesen Proben wurde erfolgreich mit einem Protokoll mit NaOH-Behandlung durchgeführt, und die resultierenden Proben wurden erfolgreich für die KASP-Analyse mit mehreren KASP-Markern verwendet.

Nachdem wir verschiedene Beprobungstechniken (Chipping) für trockene und nasse Ackerbohnsensamen angewandt hatten, wählten wir das Anbohren trockener Samen und das Stanzen nasser Samen als die interessantesten Techniken aus. Beide führten zu einer erfolgreichen KASP-Analyse der gesammelten Proben. In einem kleinen Experiment stellten wir fest, dass die Reinigung des Bohrers bei der ersten Technik nur zur Erleichterung des Bohrens notwendig war, aber keine Kreuzkontamination zwischen den Proben verursachte, was das Anbohren zu einer relativ schnellen Technik zur Gewebeentnahme machte (Abb. 2).

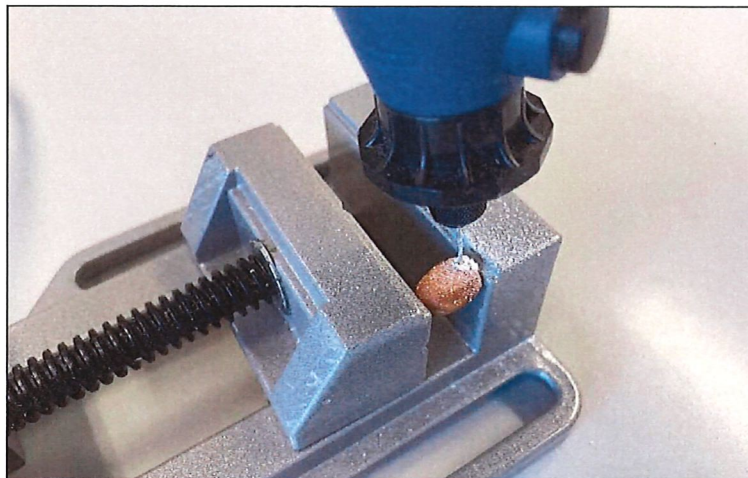


Abb. 2 Zerkleinerung des Saatguts durch Anbohren trockener Ackerbohnsensamen unter Verwendung eines Schraubstocks, um das Saatgut zu erhalten.

Bei der Stanztechnik prüften wir, wie lange die Samen in Wasser eingeweicht werden mussten, bevor sie weich genug waren, um in unserem Sinne gestanzt zu werden. Wir testeten Samen von drei Genotypen in Petrischalen mit verschiedenen Wassermengen (Abb. 3). Wir stellten fest, dass in Isolierhäusern erzeugte Samen länger brauchten um anzuquellen und weich zu werden als solche aus Freiland-Ernte. Bei der gleichen Kombination von Saatgutcharge und Wassermenge stellten wir außerdem eine erhebliche Schwankung bei der Erweichung der Samen fest: Einige Samen waren nach wenigen Stunden weich und begannen sogar zu keimen, während andere Samen länger hart blieben (dormant), was die Optimierung der Einweich- und Quellzeit dieser Ackerbohnsensamen schwierig beherrschbar macht.

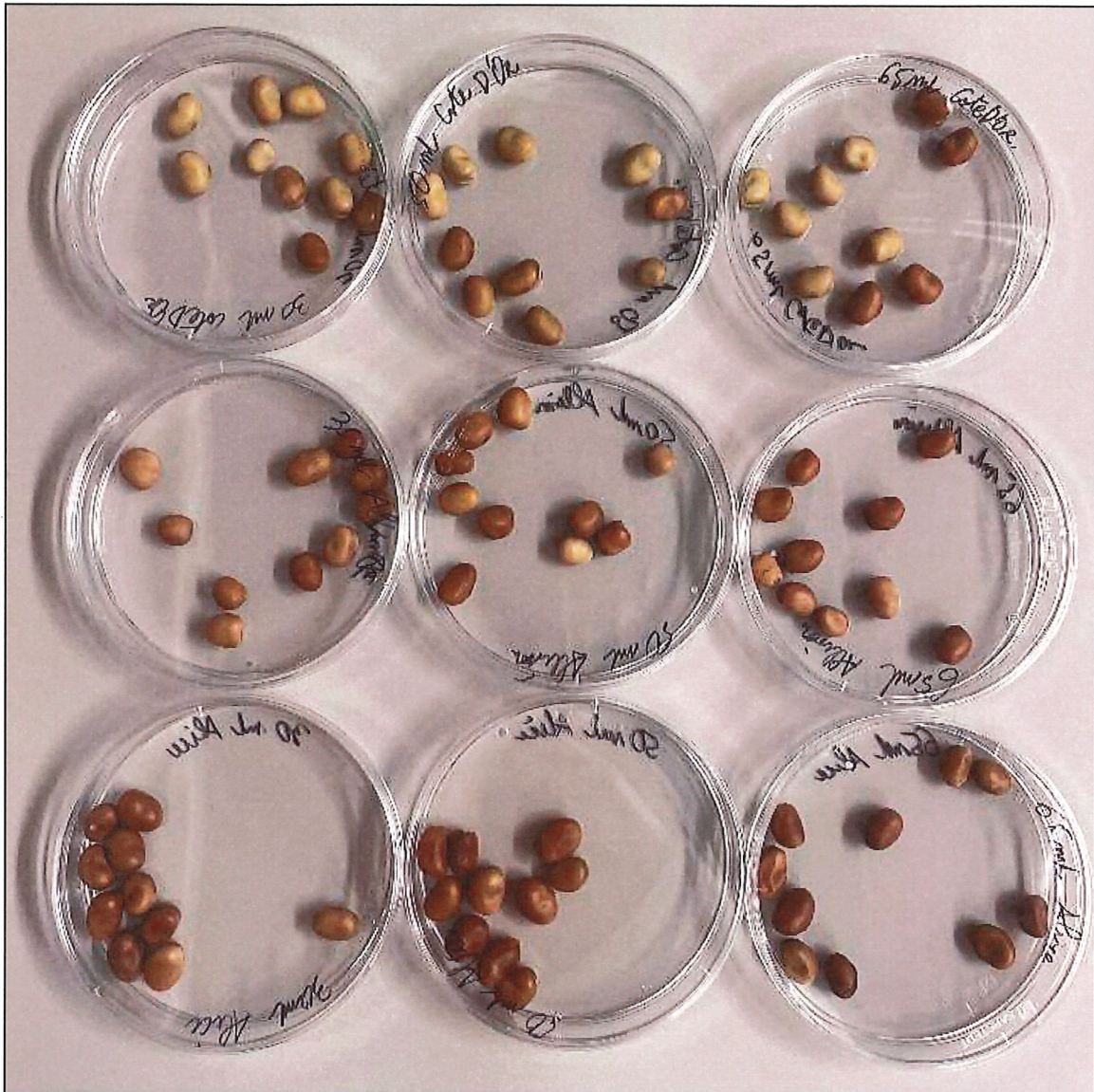


Abb. 3 Versuchsaufbau zur Prüfung der erforderlichen Einquell-Dauer (damit die Samen weich genug sind, um für die DNA-Beprobung gestanzt zu werden). Wir haben drei verschiedene Genotypen (obere Reihe: 'Côte d'Or'; mittlere Reihe: 'Allison'; untere Reihe: 'GL Alice'), mit drei verschiedenen Wassermengen in Petrischalen getestet (Links: 30 ml; Mitte: 50 ml; Rechts: 65 ml).

Darüber hinaus schwankte der Feuchtigkeitsgehalt der Samen stark, nach dem Einquellen bei einem anfänglichen Feuchtigkeitsgehalt von 12 % zwischen schließlich 43 und 54 %, was sich vermutlich ebenso stark auf die Lager- und Keimfähigkeit der Samen auswirkt.

Wir kamen zu dem Schluss, dass das Anbohren trockener Samen die einfachste und optimale Methode zur Gewinnung von Gewebe für die DNA-Extraktion aus Ackerbohnsamen ist (Abb. 2). Wir haben ein Experiment durchgeführt, um die Auswirkungen des Anbohrens trockener Samen auf die Keimfähigkeit und die Lebensfähigkeit der Sämlinge zu quantifizieren. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Einfluss des Hackens auf den Keimungsprozentsatz, die Keimungsgeschwindigkeit, die Keimlingslänge 19 Tage nach der Aussaat und den Keimlingswachstumsindex ($\text{Keimungsprozentsatz} \cdot \text{Keimlingslänge} / 100$) mit t-Test (p-Werten waren von 0,39 bis 0,74).

2. Vergleich des Projektstatus mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung

Arbeitspaket P1 bis P3: Die Aufgaben wurden in der letzten Periode wie geplant abgeschlossen.

Arbeitspaket P4 bis P6: Die Vermehrung der 143 Individuen aus der GWBP war erfolgreich und führte zu einer hohen Anzahl von Samen. Sie wurden wie geplant im Herbst 2024 ausgesät und werden nun im Feld an drei Standorten getestet. Eine erste genomische Vorhersage wurde durchgeführt. Eine weitere Validierung und die Untersuchung des am besten geeigneten genomischen Vorhersagemodells werden derzeit vorbereitet. Aktuell werben wir für diese Teilaufgabe zusätzlich einen Masterstudenten ein.

Arbeitspaket P7: Die Aufgabe in Bezug auf die Mindestanzahl von Markern zur Identifizierung hoch ingezüchteter Individuen aus Ackerbohnenpopulationen ist abgeschlossen. Wir sind nun in der Lage, den Züchtern Empfehlungen für den besten Ansatz zu geben, der zu verwenden ist. Erste Konzepte für die Umsetzung in der praktischen Züchtung wurden erstellt, aber weitere Studien und Diskussionen werden weitere Verbesserung ermöglichen. Die Arbeit an der Algebra über den LD-Zerfall und die genetische Zusammensetzung von teilweise allogamen Populationen wird im weiteren Verlauf des Projektes durchgeführt werden.

Arbeitspaket P9: Die allerletzten Ergebnisse des ‚chipped-seed‘ Experimentes werden aktuell erzeugt. Mit einem Jahr Verspätung, bedingt durch eine Verfeinerung des Ziels des Arbeitspakets, wird diese Aufgabe in Kürze abgeschlossen werden.

3. Veränderung der Aussichten für die Erreichung der Projektziele im Vergleich zum ursprünglichen Antrag

Das Team in Göttingen und im NPZ (Hohenlieth) sieht keine Veränderung der Aussichten für die Erreichung der Projektziele.

4. Ergebnisse von Dritten, die für die Durchführung des Projekts relevant sind

Das Arbeitspaket P8: NPZ (Hohenlieth) war an der Prüfung der Selbstungs-Nachkommen von Individuen aus der GWBP beteiligt. Die gewonnenen Daten werden die Validierung der genomischen Vorhersage und die Auswahl überlegener Genotypen für die weitere angewandte Züchtung und wissenschaftliche Erforschung von Ackerbohnen ermöglichen.

5. Notwendigkeit von Änderungen an den Zielen

Eine Änderung der Ziele gegenüber dem letzten Bericht war nicht erforderlich.

6. Jährliche Aktualisierung des Nutzungsplans

Der Antragsteller oder die am Projekt beteiligten Parteien haben keine Schutzrechte angemeldet oder geltend gemacht.

Die Aussichten auf eine wissenschaftlich erfolgreiche Durchführung des Projekts sind sehr hoch. Die Risiken im Zusammenhang mit den Feldversuchen sind jetzt sehr gering, da die Vermehrungsphase des Projekts in der letzten Saison abgeschlossen wurde und unser entscheidender Feldversuch auf mehrere Standorte verteilt ist.

apl. Prof. Dr. Wolfgang Link

Göttingen, 18.03.2025

Ort, Datum



Unterschrift