

**Zuwendungsempfänger**

Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 40204 Düsseldorf

**Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm**

Pflanzenzüchtungsforschung-P2–Verbundvorhaben: Identifizierung und  
Charakterisierung neuer Maismutanten mit verbesserten Biomasse Eigenschaften als  
erneuerbare Resource für Grundstoffe der chemischen Industrie (CornWall – P2)

**Verantwortliche Autoren:**

Prof. Dr. Markus Pauly,  
Institut für pflanzliche Zellbiologie und Biotechnologie, Universitätsstr. 1, 40225  
Düsseldorf

**Förderkennzeichen:**

031B0885A

**Ausführende Stelle:**

Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,

**Projektlaufzeit:**

01.02.2020 bis 31.01.2023

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0885A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor

## Teil I: Kurzbericht

### Aufgabenstellung

Treibhausgas emittierende, endliche fossile Brennstoffe sollten durch nachhaltige, klimaneutrale Ressourcen ersetzt werden, z.B. für die chemische Industrie. Eine Ressource mit solchen Eigenschaften sind landwirtschaftliche Rückstände aus der Kulturpflanzenanzucht, z. B. Stroh aus Mais (*Zea mays*). Der Großteil des landwirtschaftlichen Maisrückstands- und Silagematerials besteht aus sogenannten Lignozellulosen, einem komplexen Non-Food-Pflanzenreststoff, dessen Zucker nach ihrer Freisetzung für die mikrobielle Fermentation zu Grundchemikalien verwendet werden können. Die größte Herausforderung einer solchen Umwandlung von Lignozellulose in Chemikalien besteht darin, das Material energetisch und kostengünstiger aufzuschliessen. Daher besteht ein großes Potential in der Züchtung von Pflanzen mit verbesserten, vorteilhaften Lignozellulose Eigenschaften, um z.B. Verdaulichkeit und Verzuckerungsausbeute zu erhöhen, und damit Verarbeitungskosten und Energieverbrauch zu senken. Genau dies ist die Aufgabe des CORNWALL Projektes: die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Maislinien, deren Stroh eine höhere Verdaubarkeit aufweist. Zudem sollen die genetischen Grundlagen für diese höhere Abbaubarkeit definiert werden, um zukünftige Züchtungsrichtungen aufzuweisen.

### Ablauf

Das Projekt war in 4 Arbeitspakete unterteilt:

Arbeitspaket 1: Charakterisierung von Mais „Candy-leaf“ Mutanten. Das in Phase 1 von CORNWALL durchgeführte Screening einer chemisch mutagenisierten Maispopulation führte zur Identifizierung von Candy Leaf (*Cal*)-Mutanten (*Cal-2* bis *Cal-6*). Im Feld zeigten diese fünf Mutanten im Vergleich zur Elternsorte A619 keine sichtbaren Phänotypen. Die chemische Charakterisierung der Lignozellulosen dieser Mutanten wurde veröffentlicht (Wang S et al., 2023, A large-scale forward genetic screen for maize mutants with altered lignocellulosic properties. *Frontiers in Plant Science*, 14:1099009 doi: 10.3389/fpls.2023.1099009)

*Cal-2*: *Cal-2* weist einen Rückgang der Verzuckerungsausbeute um 30 % auf, verbunden mit einer Reduzierung des Cellulosegehalts um 20 %. Durch markergestützte Kartierung konnte die ursächliche Mutation auf einen Chromosomeabschnitt eingegrenzt werden. Die Analyse der Gesamtgenomsequenzierung identifizierte mehrere Gen-Kandidaten Single Nucleotide Polymorphismens (SNPs). Leider konnte keiner dieser Mutationen eindeutig durch Mais Knock-out-Allele bestätigt werden.

*Cal-3* und *Cal-6*: Die Lignozelluloseanalyse von *Cal-3* zeigte einen Rückgang der Verzuckerungsausbeute, verbunden mit einem Anstieg von hemizelluloseicher Arabinose und Xylose. Die markergestützte Kartierung bestätigte eine Mutation in einer Chromosom 10 Region. Trotz weiterer Kreuzungen und mehrerer Genomsequenzanalyse konnte die kausative Mutation leider nicht gefunden werden. *Cal-6* zeigt einen Anstieg der Verzuckerung, ohne dass sich die Lignozellulosezusammensetzung weiter verändert. *Cal-6* Kartierungspopulationen wurden erzeugt. Weder eine markergestützte Kartierung noch eine Genomsequenzierung war in der Lage, einen konsistenten genomischen Ort für die verursachende Mutation aufzudecken.

Arbeitspaket 2: Verzuckerungsmodellierung. Ein erstes stochastisches Modell der Verzuckerung eines dreidimensionalen lignozellulosehaltigen Materials wurde veröffentlicht (Behle und Raguin, 2021, Stochastic model of lignocellulosic material saccharification, *PLOS computational biology*, doi:

10.1371/journal.pcbi.1009262). Das Model bestätigte, dass eine hohe Verzuckerung positiv mit einem hohen Glukosegehalt in der Hemizellulosefraktion korrelierte. Im Gegensatz dazu beeinflusst ein hoher Ligningehalt die Verzuckerungsausbeuten negativ.

Desweiteren wurde ein separates Modell erstellt, um die Verzuckerungsausbeuten basierend auf dem Konzentrationsmix verschiedener Lignozellulose-Enzyme vorherzusagen. Dieses Model wurde nun vorab publiziert (Parthosakha De et al., PREDIG: web application to model and predict the enzymatic saccharification of plant cell wall; DOI: 10.13140/RG.2.2.35284.78720).

Damit wurde das Ziel dieses Arbeitspaketes erfüllt.

Arbeitspaket 3: Evaluierung des Europäischen Diversitätspanels für Mais. Die lignozellulosehaltigen Eigenschaften eines Mais-Diversitätspanels, das einen großen Anteil europäischer Landrassenlinien umfasst, wurden bewertet. 332 Lanrassenlinien wurden im Laufe von zwei Jahren (2020, 2021) an drei verschiedenen Standorten (Köln, Industriepartner Corteva und KWS) gesammelt. Alle Proben wurden verarbeitet und ihre Lignozelluloseeigenschaften im Hinblick auf Verzuckerungsausbeute, Hemizellulosezusammensetzung, kristalline Zellulose und Ligningehalt hin analysiert. Die Daten deuten auf eine große chemotypische Streuung einiger Merkmale hin. Besonders interessant ist der 10-fache Unterschied zwischen der Linie mit der niedrigsten und der höchsten Stroh-Verzuckerungsausbeute. Die Ergebnisse zeigen auch eine starke positive Korrelation zwischen der Verzuckerungsausbeute und dem Gehalt an Hemizellulose Glukose, die in allen drei Datensätzen konsistent ist. Anhand dieser Daten wurde eine Genom-Wide Association Studie (GWAS) durchgeführt bei der 12 SNPs identifiziert wurden, die eine statistisch signifikante Korrelation mit der Verzuckerungsausbeute zeigten. Die erfolgreiche Identifizierung dieser mit der Verzuckerung verbundenen genetischen Varianten stellt einzigartige und nützliche Marker für zukünftige Züchtungszwecke zur Steigerung des Stroh-Verzuckerungsertrags dar. Daher verdeutlichen diese Ergebnisse das Potenzial, die genetische Variabilität bestimmter Landrassenlinien zu nutzen, um den Verzuckerungsertrag in angebauten Maissorten zu verbessern.

Arbeitspaket 4: Generation von Mais-Landrassen-Hybriden. Um die genetische Diversität der natürlichen Landrassenlinien zu erhöhen, wurde jede Mais Landrasse mit einem Dent-Einzelkreuzhybriden gekreuzt. Die genetische, phänotypische, und chemische Zusammensetzungsanalyse soll dann in CORNWALL Phase 3 durchgeführt werden.

### **Wissenschaftlicher und technischer Stand**

Im Vorfeld dieser Arbeit ist schon eine Cal-Mutanten identifiziert worden (*Cal-1*), welche als neue Maisvarietät und als Methode zur Erhöhung des Verzuckerungsgrades von Mais-Stroh doppelt patentiert wurde: i) Pauly M, Hake S, Kraemer F, 2018, Plants with elevated levels of glucan, US-Patent: US 9,920,327 B2; Pauly M, Hake S, Kraemer F, 2014, Maize variety and method of production, US-Patent: US 8,735,690 B2.

Durch entsprechende MTAs wurden die *Cal-1* Maismutanten an die industriellen Partner weitergegeben, welche diese Varietät nun in ihre Elitelinien kreuzt. Dieses Projekt führte daher diese erfolgreiche Strategie weiter.

## Teil II: Eingehende Darstellung

### Detaillierter Inhalt des Projektes

Das Projekt wurde von 5 Partnern durchgeführt: Institut für pflanzliche Zellbiologie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf (Pauly); Institut für theoretische Genetik und Genomik, Heinrich-Hein Universität, Düsseldorf (Stich); Institut für Botanik, RWTH Aachen (Usadel) und den Industriellen Partnern Corteva und KWS.

#### Arbeitspaket 1: Charakterisierung Mais „Candy-leaf“ Mutanten

Das in Phase 1 von CORNWALL durchgeführte Screening einer chemisch mutagenisierten Maispopulation führte zur Identifizierung von Candy Leaf (*Cal*)-Mutanten (*Cal-2* bis *Cal-6*). Im Feld zeigten diese fünf Mutanten im Vergleich zur Elternsorte A619 keine sichtbaren Phänotypen. Die chemische Charakterisierung der Lignozellulosen dieser Mutanten wurde veröffentlicht (Wang S et al., 2023, A large-scale forward genetic screen for maize mutants with altered lignocellulosic properties. *Frontiers in Plant Science*, 14:1099009 doi: 10.3389/fpls.2023.1099009)

*Cal2*: *Cal-2* weist einen Rückgang der Verzuckerungsausbeute um 30 % auf, verbunden mit einer Reduzierung des Zellulosegehalts um 20 % (Pauly). Durch markergestützte Kartierung konnte die ursächliche Mutation auf eine 4,1-Mpb-Region in Chromosom 2 eingegrenzt werden. Die Analyse der Gesamtgenomsequenzierung identifizierte fünf Kandidaten-SNPs (Tabelle 1), die durch Sanger-Sequenzierung chemotypischer Individuen bestätigt wurden. Um die ursächlichen Mutationen zu identifizieren und zu bestätigen, wurden Versuche unternommen, Knock-out-Allele aus den Sammlungen UniformMu und BonnMu zu erhalten. Linien für 4 der 5 Kandidatengene (Nr. 1, Nr. 3, Nr. 4 und Nr. 5) wurden erhalten und gescreent, um homozygote Individuen zu finden (Pauly).

Candidate	Gene ID	aa Change	Functional Description	# Insertional lines	
				UFMu	BonnMu
#1	Zm00001d0072 68	S - L	L-Type Lectin domain-containing receptor kinase	NO	1
#2	Zm00001d0072 85	R - H	NADP-dependent alkenal double bond reductase P2	NO	NO
#3	Zm00001d0073 08	E - K	Unknown	1	NO
#4	Zm00001d0073 34	A - V	Protein kinase	1	1
#5	Zm00001d0073 88	G - D	NO EXINE FORMATION1	5	6

Table 1. Transposon Linien der 5 Kandidaten-Gene für *Cal-2*.

Nach der Genotypisierung der entsprechenden Insertionen wurden homozygote Individuen für drei Linien identifiziert, die eine Mu-Transposon-Insertion in der 5'-UTR-Region von Gen Nr. 5

enthielten, eine Linie für Gen Nr. 1 und eine Linie für Gen Nr. 4. Lignozelluloseanalysen dieser Mutanten zeigten keine Unterschiede in den Lignozelluloseattributen für die identifizierten Insertionslinien in den Genen Nr. 1 und Nr. 4. In zwei der drei Linien, die ein mutiertes Gen Nr. 5 aufwiesen, wurde im Vergleich zur Kontrolle eine Verringerung der Verzuckerungsausbeute um etwa 20 % beobachtet. Allerdings wurde für keine der Linien ein Unterschied im Zellulosegehalt festgestellt, was darauf hindeuten könnte, dass diese UTR-Insertionsmutanten schwache Allele darstellen könnten. Es wurden nur heterozygote Individuen mit Insertionen in der kodierenden Region von Gen Nr. 5 identifiziert, ohne dass damit verbundene Verzuckerungs- oder Zellulosegehaltsunterschiede verbunden waren. Desweiteren wurden auch Arabidopsis Knock-out Linien mit homologen Genen erworben. Aber auch hier war kein Unterschied in den Lignozelluloseattributen festzustellen. Obwohl die Ergebnisse mit Gen 5-Linien vielversprechend sind, konnte die ursächliche Mutation für den *Cal-2*-Phänotyp bisher nicht eindeutig bestätigt werden.

*Cal-3*: Die Lignozelluloseanalyse von *Cal-3* ergab einen Rückgang der Verzuckerungsausbeute um 30 %, verbunden mit einem Anstieg von hemizelluloseicher Arabinose und Xylose um 35 %. Lignozelluloseanalysen einer neuen F2-Population bestätigten das Vorhandensein einer rezessiven Mutation, die für beide beobachteten Chemotypen verantwortlich ist. Die markergestützte Kartierung von 70 F2-Individuen bestätigte eine 34-Mbp-Region in Chromosom 10 (Pauly). F3-Nachkommen wurden gezüchtet (Stich) und der F3-Lignozellulose-Chemotyp bestätigt (Pauly). Es wurden chemotypische und nicht-chemotypische DNA-Pools hergestellt und eine Sequenzierung des gesamten Genoms durchgeführt (Usadel). Darüber hinaus wurde *Cal-3* zweimal mit der ursprünglichen A619-Elternlinie rückgekreuzt. Basierend auf dem Chemotyp wurde eine homozygote Linie identifiziert und parallel sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse (Usadel) gaben aber leider keinen Aufschluss über eindeutige kausative SNPs, die weiterverfolgt werden könnten.

*Cal-4/5*: Die Chemotypen der Lignozellulosestruktur beider Mutanten konnte in den nachfolgenden Generationen leider nicht bestätigt werden. Daher wurden die Mutanten verworfen.

*Cal-6*: *Cal-6* zeigt einen Anstieg der Verzuckerung um 28 %, ohne dass sich die Lignozellulosezusammensetzung hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung, des Zellulose- und Ligningehalts oder der Ligninzusammensetzung weiter verändert. *Cal-6* Kartierungspopulationen wurden durch Kreuzung mit der Inzuchtlinie Mo17 (Stich) erzeugt. Lignozelluloseanalysen von 36 F2-Individuen führten zur Identifizierung von 19 *Cal-6* Mutanten, was laut Chi-Quadrat-Test mit einer dominanten Mutation übereinstimmt. Die Analyse der F3-Nachkommen bestätigte das Ergebnis (Pauly). Chemotypische und nicht-chemotypische DNA-Pools wurden einer Sequenzierung des gesamten Genoms (Usadel) unterzogen. Parallel dazu wurde eine markergestützte Kartierung durchgeführt, um ein Kartierungsintervall zu identifizieren (Pauly). Keiner dieser komplementären Ansätze war in der Lage, einen konsistenten genomischen Ort für die verursachende Mutation aufzudecken. Alternativ wurde eine Sequenzierung des gesamten Genoms einer rückgekreuzten *Cal-6* Linie durchgeführt (Usadel), um mögliche Interferenzen mit dem Mo17-Genom auszuschließen, welches zur Generierung der

Kartierungspopulationen verwendet wurde. Als Kontrolle wurde auch die Mo17-Linie neu sequenziert. Mit diesem Ansatz gelang es leider auch nicht, Kandidatenmutationen zu identifizieren, die mit dem *Cal-6* Chemotyp assoziiert sind, und die weitere Forschung an dieser Mutante wurde eingestellt.

Für die Elternlinie A619 wurden die vorhandenen Daten mit besseren Genomassemblern zusammengestellt. Mit dem Assembler Flye wurde ein N50 von 12,4 MB erhalten, während der N90 2,6 MB betrug (d. h. 50 bzw. 90 % der Genomassemblierung sind Contigs mit der Mindestgröße von 12,4 bzw. 2,6 MB). Darüber hinaus wurde der aggressive Assembler NECAT verwendet und N50- und N90-Werte von 32 bzw. 8 MB erhalten. Beide Baugruppen wurden durch Neuausrichtung der Oxford-Nanoporen-Lesevorgänge und der Polier-Medaka poliert. Für die endgültigen Verbesserungen wurden präzise, kurz gelesene Illumina-Daten verwendet. Mit dieser Methodik waren nahezu lückenlose Zusammenstellungen möglich, die anhand vorhandener genetischer Maiskarten für eine verbesserte Kartierung von *Cal*-Mutanten ausgerichtet werden konnten. Trotz dieser neu erstellten genetischen Ressource konnte keine der kausativen Mutationen in den *Cal*-Mutanten bestimmt werden.

Damit ist das Ziel kausative Mutationen in diesen *Cal* Mutanten zu finden und zu bestätigen gescheitert. Es ist nicht vorgesehen, dass die *Cal* Mutanten in CORNWALL Phase 3 weiterbearbeitet werden. Stattdessen wird versucht die Arbeiten durch andere Ressourcen wie z.B. durch einen DFG-Normalantrag weiterzuführen.

Nichtsdestotrotz wurde das *Cal-1* Saatgut (35% höherer Verzuckerungsgrad von Mais-Stroh) den Projektpartnern KWS und Corteva nach Abschluss von entsprechenden Lizenz- und Materialaustauschvereinbarungen zur Verfügung gestellt. Die Firmen wollen diese Mais Varietät mit ihren Elitevarietäten kreuzen, um festzustellen, ob sich Vorteile in der Pflanzenbiomassenverwertung ergeben.

### Arbeitspaket 2: Verzuckerungsmodellierung.

Ein erstes stochastisches Model der Verzuckerung eines dreidimensionalen lignozellulosehaltigen Materials wurde veröffentlicht (Ebenhöh; Behle und Raguin, 2021, Stochastic model of lignocellulosic material saccharification, PLOS computational biology, doi: 10.1371/journal.pcbi.1009262). Um das Model zu optimieren, wurden zwei Sätze experimenteller Daten erhalten: die Lignozellulose-Strukturvielfalt in verschiedenen Geweben einer Maispflanze (siehe Tabelle 2; Pauly) und die detaillierte Lignozellulose-Struktur der verschiedenen *Cal* Mutanten, einschließlich Braun-Mittelrippen-Lignin (*bm*) defiziente Mutanten (Tabelle 2; Pauly).

	Arabinose	Glucose	Xylose	Cellulose	Lignin	H-Lignin	G-Lignin	S-Lignin	S/G ratio	Saccharification
Seedling	46.8 ± 4.2	42.4 ± 18.9	117.8 ± 16.0	285.2 ± 12.3	12.3 ± 0.3	2.7 ± 0.3	71.4 ± 1.2	25.9 ± 1.0	0.4	197.7 ± 4.9
Adult leaf	20.2 ± 2.7	24.8 ± 2.7	97.0 ± 16.2	159.7 ± 22.6	19.6 ± 0.4	3.2 ± 0.2	62.9 ± 1.9	33.9 ± 2.1	0.5	64.7 ± 7.7
Cob	30.4 ± 11.4	25.8 ± 11.4	211.6 ± 69.7	239.2 ± 10.9	19.7 ± 1.0	1.2 ± 0.3	27.3 ± 0.8	71.5 ± 1.0	2.6	30.3 ± 15.3
Flag leaf	19.4 ± 17.8	21.9 ± 17.8	80.4 ± 71.0	179.8 ± 29.0	22.7 ± 0.6	3.4 ± 0.3	61.9 ± 0.9	34.7 ± 1.1	0.6	36.1 ± 9.4
Husk	61.6 ± 8.6	41.8 ± 8.6	202.4 ± 25.8	308.1 ± 38.8	21.9 ± 3.1	1.3 ± 0.0	38.2 ± 1.5	60.5 ± 1.5	1.6	32.3 ± 2.9
Node	28.2 ± 9.2	27.7 ± 9.2	120.5 ± 43.4	301.2 ± 25.7	24.2 ± 1.1	1.6 ± 0.7	38.5 ± 3.0	59.8 ± 2.7	1.6	48.7 ± 6.5

	Arabinose	Glucose	Xylose	Galactose	Cellulose	Lignin	H-Lignin	G-Lignin	S-Lignin	S/G ratio	Acetate	Saccharification
<b>A619</b>	46.8 ± 0.9	42.4 ± 5.1	117.8 ± 6.6	14.2 ± 0.7	285.2 ± 12.3	77.9 ± 4.7	2.5 ± 0.1	71.9 ± 1.5	25.5 ± 1.6	0.4	39.6 ± 2.2	220.2 ± 8.9
<i>cal1</i>	44.0 ± 4.2	147.8 ± 18.9	106.0 ± 16.0	15.1 ± 1.2	286.3 ± 14.3	75.7 ± 3.4	2.6 ± 0.1	72.1 ± 0.8	25.3 ± 0.8	0.4	40.0 ± 1.8	299.3 ± 14.0
<i>cal2</i>	45.5 ± 4.5	39.4 ± 2.1	116.8 ± 8.0	16.2 ± 0.9	231.1 ± 17.5	78.5 ± 5.3	2.6 ± 0.1	72.2 ± 2.1	25.2 ± 2.2	0.3	38.9 ± 2.1	155.5 ± 12.7
<i>cal3</i>	57.3 ± 1.3	43.0 ± 2.9	139.7 ± 6.3	18.4 ± 0.7	267.6 ± 54.5	73.3 ± 1.9	2.5 ± 0.1	72.5 ± 0.7	25.1 ± 0.6	0.3	39.4 ± 1.2	161.7 ± 19.4
<i>cal6</i>	44.7 ± 2.8	46.5 ± 18.6	117.0 ± 9.1	15.0 ± 1.3	291.3 ± 21.3	76.3 ± 3.8	2.5 ± 0.1	72.1 ± 0.6	25.4 ± 1.0	0.4	40.1 ± 1.0	276.5 ± 28.4
<b>A619</b>	49.7 ± 4.6	48.6 ± 7.9	115.0 ± 16.4	14.3 ± 1.5	282.4 ± 10.4	73.3 ± 3.3	2.5 ± 0.1	71.9 ± 1.5	25.5 ± 1.6	0.4	39.8 ± 2.4	212.7 ± 10.1
<i>bm1</i>	45.3 ± 6.9	50.1 ± 11.5	117.0 ± 6.4	13.8 ± 2.1	323.8 ± 25.9	77.4 ± 7.3	2.8 ± 0.5	69.0 ± 1.5	28.2 ± 1.0	0.4	32.7 ± 5.4	242.6 ± 26.3
<i>bm3</i>	45.3 ± 2.7	43.0 ± 2.5	114.4 ± 11.6	14.2 ± 0.8	296.9 ± 5.4	68.8 ± 2.1	2.3 ± 0.3	91.6 ± 0.0	6.1 ± 0.3	0.1	29.9 ± 4.3	298.2 ± 12.0

Tabelle 2. Lignozellulosestruktur verschiedener Maispflanzen und verschiedener Maismutanten. Der Gehalt wird in µg/mg Zellwand (AIR) angezeigt. Die Werte der Monolignol-Zusammensetzung (H-, G- und S-Lignin) sind in % angegeben. Die Verzuckerung wird als µg Glucose/mg AIR angezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass zwei Strukturmerkmale der Lignozellulose für das Ergebnis der Verzuckerungsausbeute wichtig sind. Einerseits korrelierte eine hohe Verzuckerung positiv mit einem hohen Glukosegehalt in der Hemizellulosefraktion, was wahrscheinlich mit der Häufigkeit amorpher (nichtkristalliner) Zellulose korreliert. Im Gegensatz dazu scheinen ein hoher Ligningehalt und ein hohes S/G-Monolignol-Verhältnis die Verzuckerungsausbeuten negativ zu beeinflussen.

Desweiteren wurde ein separates Modell erstellt (Ebenhöh), um die Verzuckerungsausbeuten basierend auf dem Konzentrationsmix verschiedener Lignozellulose-Enzyme vorherzusagen. Dazu wurde die Verdauzeit als zusätzliche Dimension bestimmt (Abbildung 1; Pauly).

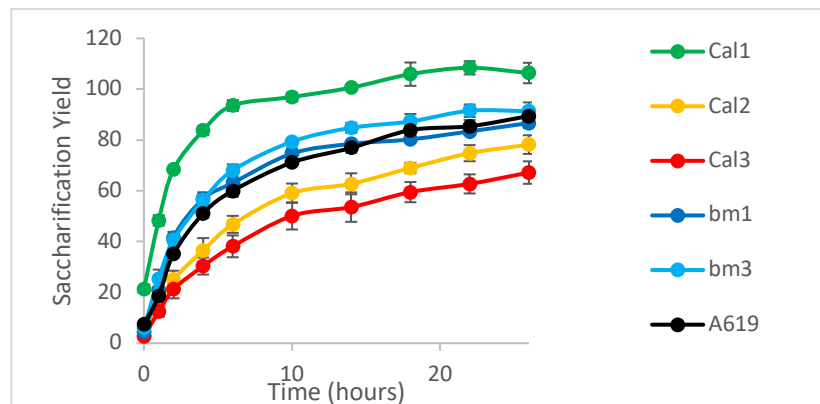


Abb. 1. Verzuckerungsertrag von verschiedenen Mais Mutanten.

Dieses Modell wurde nun vorab publiziert (Parthosakha De et al., PREDIG: web application to model and predict the enzymatic saccharification of plant cell wall; DOI: 10.13140/RG.2.2.35284.78720).

Damit wurde das Ziel dieses Arbeitspaketes erfüllt.

### Arbeitspaket 3: Evaluierung des Europäischen Diversitätspanels für Mais.

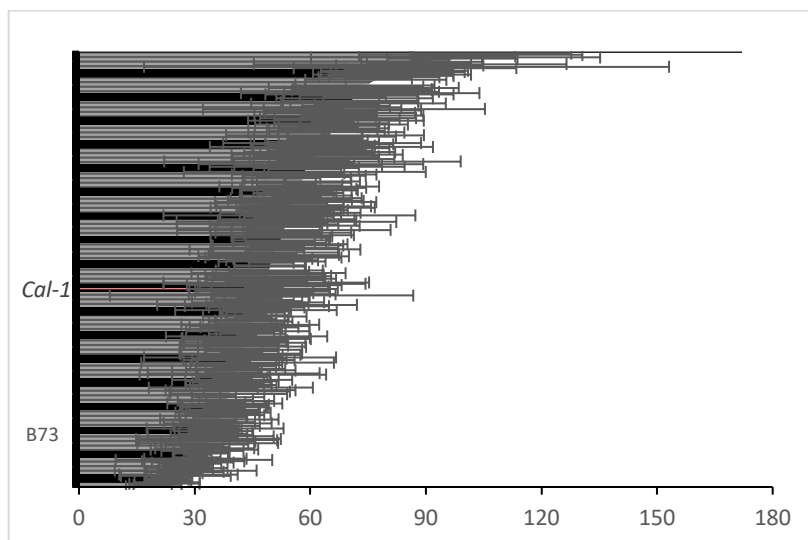
Die lignozellulosehaltigen Eigenschaften eines Mais-Diversitätspanels, welches einen großen Anteil europäischer Landrassenlinien umfasst, wurden bewertet. Fast 2700 Maisproben, die 332 Inzuchtlinien entsprechen, wurden im Laufe von zwei Jahren an drei verschiedenen Standorten gesammelt. Dazu gehören 756 Proben aus 256 Linien im Jahr 2020 (Stich), 851 Proben aus 289

Linien im Jahr 2021 (de la Vega, Corteva) und 1053 Proben aus 304 Linien im Jahr 2021 (Presterl, KWS). Alle Proben wurden verarbeitet und ihre Lignozelluloseeigenschaften im Hinblick auf Verzuckerungsausbeute, Hemizellulosezusammensetzung, kristalline Zellulose und Ligningehalt analysiert (Pauly).

	Ara			Gal			Glc			Xyl			CC			Lignin			Saccharification		
	Stich	Corteva	KWS	Stich	Corteva	KWS	Stich	Corteva	KWS	Stich	Corteva	KWS	Stich	Corteva	KWS	Stich	Corteva	KWS	Stich	Corteva	KWS
MAX	49.9	44.2	48.6	14.0	16.0	14.0	77.7	116.5	60.8	352.0	336.9	305.5	397.8	440.3	455.4	229.4	247.7	221.2	119.7	172.1	110.9
MIN	10.1	20.6	16.2	3.6	3.8	2.6	17.7	24.3	17.7	157.6	207.7	194.0	202.4	255.4	231.1	132.5	125.3	129.3	12.6	17.1	8.2
Range	39.8	23.6	32.4	10.5	12.2	11.3	60.0	92.2	43.1	194.4	129.3	111.5	195.4	184.9	224.3	96.9	122.4	92.0	107.1	155.0	102.7
AVG	25.4	29.5	26.9	6.8	7.0	6.3	41.4	52.0	35.7	260.1	270.2	244.8	329.3	357.6	342.0	185.6	179.2	181.5	51.9	58.7	46.0
STDEV	5.4	4.3	5.2	1.6	1.7	1.7	11.2	13.2	8.0	31.3	20.9	18.9	31.5	32.6	39.1	21.1	18.0	18.1	18.0	20.6	16.7
N	256	289	304	256	289	304	256	289	304	256	289	304	256	289	304	256	289	304	256	289	304
Corr	0.21	0.20	0.05	0.09	0.30	0.07	0.52	0.68	0.52	-0.29	-0.37	-0.31	0.06	0.20	0.19	-0.42	-0.36	-0.21	1.00	1.00	1.00

Tabelle 3. Zusammenfassung der in Cornwall-Proben ermittelten lignozellulose Eigenschaften. Ara: Arabinose, Gal: Galaktose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, CC: kristalline Zellulose, Verzuckerung: Verzuckerungsausbeute. Grün und rot hervorgehoben sind die höchsten gefundenen positiven bzw. negativen Korrelationen ( $-0,2 \leq r \leq 0,2$ ). MAX: Maximalwert, MIN: Minimalwert, AVG: Durchschnittswert, STDEV: Standardabweichung, N: Anzahl der Zeilen, Corr: Pearson-Korrelation.

Die Daten deuten eindeutig auf eine große chemotypische Streuung einiger Merkmale hin (Tabelle 3). Besonders interessant ist der 10-fache Unterschied zwischen der Linie mit der niedrigsten Verzuckerungsausbeute von 18,1 µg freigesetzter Glukose/Wandmaterial (B79) und der höchsten mit einer Ausbeute von 172,1 µg freigesetzter Glukose/Wandmaterial (Mo44) (Abbildung 2 und Tabelle 3). Hemizellulose-Zusammensetzungsmerkmale wie Arabinose-, Galaktose- oder Glucosegehalt zeigen eine mäßige Streuung (5- bis 4-fach), während Xylose-, kristalline Cellulose- oder Ligningehalte die geringste Streuung aufweisen (etwa das 2-fache). Die Ergebnisse zeigen auch eine starke positive Korrelation zwischen der Verzuckerungsausbeute und dem Gehalt an Glukose in den Hemizellulosen, die in allen drei Datensätzen konsistent ist (Tabelle 3;  $r > 0,5$ ). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass eine erhöhte Mixed-Linkage Glukan Akkumulation oder ein amorpher Zellulosegehalt zu einer erhöhten Verzuckerungsausbeute führen könnte. Andererseits wurden auch negative Korrelationen zwischen der Verzuckerungsausbeute und dem Xylose- (Xylan) und Ligningehalt gefunden.



### Saccharification yield of 330 inbred lines ( $\mu\text{g}$ Glucose /mg AIR)

Abb. 2. Verzuckerungsertrag eines europäischen Mais-Diversitätspanels über 2 Jahre und 3 verschiedene Standorte. Als Referenz ist die Position der B73-Inzucht und der *Cal-1* Mutante angegeben.

Eine GWAS Studie wurde mit diesen Daten durchgeführt, die nach der Analyse der Verzuckerungsausbeute aller Cornwall-Proben erhalten wurden (Pauly, Abbildung 3). Basierend auf den Ergebnissen konnten 12 SNPs identifiziert werden, die eine statistisch signifikante Korrelation mit der Verzuckerungsausbeute zeigten.

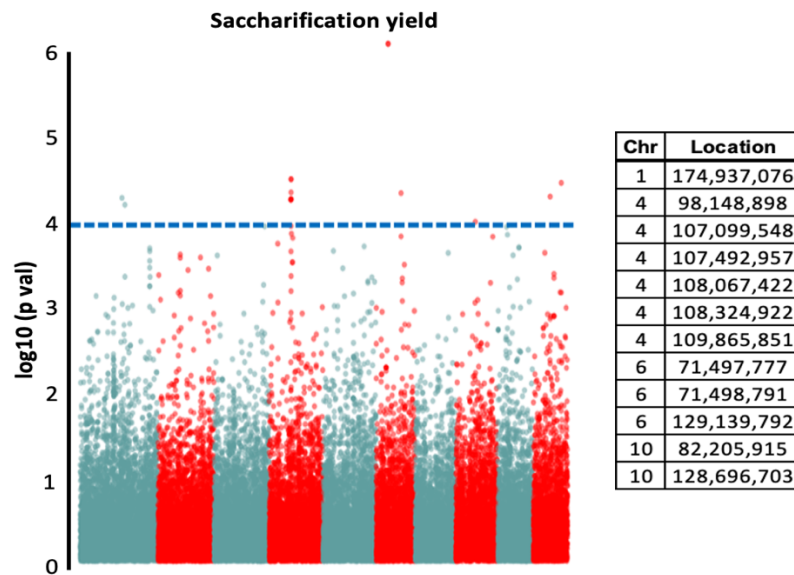


Abb. 3. Manhattan-Diagramm, das die Assoziation von SNPs mit dem Verzuckerungsertragsmerkmal in allen Cornwall-Proben zeigt (3 Standorte x 2 Jahre). Die gestrichelte blaue Linie zeigt eine Schwellensignifikanz an ( $p_{\text{val}} > 1 \times 10^{-4}$ ). Die horizontale Achse stellt die physische Position der SNPs basierend auf dem B73-Referenzgenom dar. Zur Verdeutlichung sind die Chromosomen abwechselnd blau oder rot gefärbt. Neben dem Diagramm wird eine Liste der SNPs angezeigt, die eine signifikante Assoziation mit dem Merkmal aufweisen. Chr: Chromosomenzahl.

Eine ähnliche Analyse wurde auch durchgeführt, um auch SNPs zu finden, die mit den übrigen in CORNWALL 2 quantifizierten Lignozelluloseattributen assoziiert sind, d. h. dem Gehalt an kristalliner Zellulose, Lignin, Xylose, Glucose, Arabinose und Galaktose (Pauly, Abbildung 4).

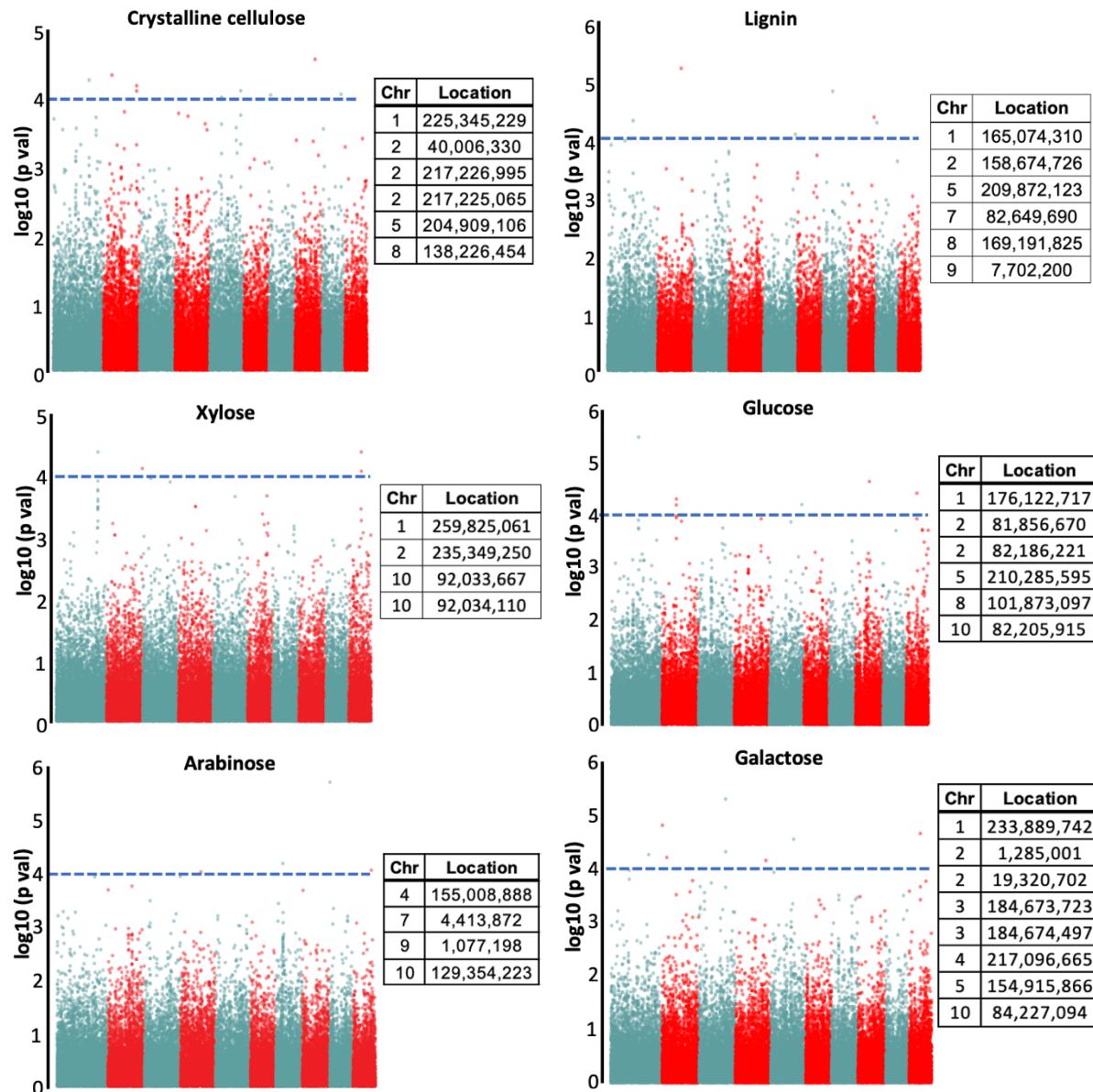


Abbildung 4. Manhattan-Diagramme, die den Zusammenhang von SNPs mit Lignozellulose-Attributmerkmalen in allen Cornwall-Proben zeigen (3 Standorte x 2 Jahre). Die gestrichelte blaue Linie zeigt eine Schwellensignifikanz an ( $p_{val} > 1 \times 10^{-4}$ ). Die horizontale Achse stellt die physische Position der SNPs basierend auf dem B73-Referenzgenom dar. Zur Verdeutlichung sind die Chromosomen abwechselnd blau oder rot gefärbt. Neben jedem Diagramm wird eine Liste der SNPs angezeigt, die eine signifikante Assoziation mit dem Merkmal aufweisen. Chr: Chromosomenzahl.

Die erfolgreiche Identifizierung dieser mit der Verzuckerung/Lignozellulose verbundenen genetischen Varianten stellt einzigartige und nützliche Marker für zukünftige Züchtungszwecke zur Steigerung des Verzuckerungsertrags dar. Damit wurde das anvisierte Ziel erreicht. In CORNWALL Phase 3 werden nun einige der identifizierten SNPs genauer untersucht, um die genetische Variabilität bestimmter Inzuchtlinien zu nutzen, um den Verzuckerungsertrag in angebauten Maissorten zu verbessern.

#### Arbeitspaket 4: Generation von Mais-Landrassen-Hybriden.

Im Jahr 2021 wurden auf einem Feld in Köln 448 Mais-LandrassenLinien angebaut, im Jahr 2022 noch einmal 401. Bis zu drei Pflanzen jeder Landrasse wurden mit einem Dent-Einzelkreuzhybriden gekreuzt. Für zukünftige DNA-Analysen wurde von jeder Landrasse, die als Elternteil einer Kreuzung verwendet wurde, Blattproben entnommen und eingefroren. Darüber hinaus wurden die Landsorten hinsichtlich Blütezeit, Pflanzenhöhe und Stammdurchmesser charakterisiert. Die Samen des Kreuzungsexperiments wurden geerntet, sodass sie für die Analyse in CORNWALL 3 verfügbar sind. Dieses Workpackage wurde daher auch wie geplant erfolgreich durchgeführt.

#### **Verwendung der Zuwendung**

Im Institut pflanzliche Zellbiologie (Prof. Pauly) wurde während der Projektperiode ein wissenschaftlicher Mitarbeiter eingestellt (Dr. Shaogan Wang; E13), welcher für die genetische Charakterisierung der *Cal*-Mutanten (Workpackage 1) sowie für die Lignozellulose Analyse der Mais Landrassen und der nachfolgenden GWAS Analyse zuständig war (Workpackage 3). Auf Grund der Pandemie konnte Dr. Wang erst ab September 2020 eingestellt werden.

Bei der Probenvorbereitung und Analyse der Lignozellulosen der *Cal*-Mutanten (Workpackage 1) aber vor allen Dingen der Mais Landrassen Proben (mehr als 2700 Proben; Workpackage 3) wurde er von einer technischen Assistentin unterstützt (Barbara Schulten).

Die Zuwendungen für das Verbrauchsmaterial und Chemikalien wurde für die Lignozellulose-Analyse der Pflanzenproben verwendet. Dazu gehörte neben Plastikbehältern, Pipetierverbrauchsmittel, Derivatisierungs-Chemikalien und Aufschlussenzymen auch Chromatographie Verbrauchsmaterial wie z.B. Chromatographie Säulen. Bei der genetischen Analyse der *Cal*-Mutanten (Workpackage 1) wurden Klonierungskits und DNA-Sequenzierungen benötigt. Zur Überprüfung von Gen-Kandidaten wurden die entsprechenden Mais Knock-out Mutanten, aber auch homologe Arabidopsis Mutanten benutzt, und entsprechende Gene wurden kloniert und sequenziert.

Im Institut quantitative und theoretische Biologie (Prof. Ebenhöf) war für die Modellierung (Workpackage 2) ursprünglich ein/e wissenschaftliche Mitarbeiter\*In auf dem Niveau einer/s Doktorand\*in für den gesamten Projekt Zeitraum vorgesehen (65%, E13). Auf Grund fehlender Bewerber\*Innen wurde stattdessen eine erfahrenere, promovierte wissenschaftliche Mitarbeiterin (Dr. Adelaide Raguin) eingestellt (100% E13), aber kostenneutral dann nur für 14 Monate.

Im Institut quantitative Genetik und Genomik (Prof. Stich) war für den Projektzeitraum eine technische Assistenz eingestellt worden (George Alskief und nachfolgend Vesna Lamesic (E7)).

Die Assistenten waren für die Feldversuchsarbeit verantwortlich. Dazu gehörte das Ausbringen von Mais-Samen, Probenernte (Stängel und Samen), und Kreuzungen der Maispflanzen. Unterstützt wurden sie von verschiedenen studentischen Hilfskräften. Als Verbrauchsmaterial waren unerwarteter Weise Vogelschutznetze notwendig geworden, um die Mais-Samen vor Krähenfrass zu schützen.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die Zuwendungen waren notwendig, um die vorgestellten, geplanten Arbeiten durchzuführen. Nur auf Grund dieser Zuwendung wurden die oben genannten Ergebnisse erzielt und Ziele erreicht. Daher halten wir die geleistete Arbeit für angemessen.

### **Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Die Erschließung neuer, nicht transgener Maisvarianten mit leicht abbaubaren Lignozellulosen aber ohne Minderung des Körnerertrages stellen patentierbares Material dar, aber nur wenn die verantwortlichen Gene der verschiedenen *Cal* Mutanten gefunden bzw. bestätigt werden konnten, welches neben *Cal-1* nicht der Fall war. Daher wurden bisher keine weiteren Patente angemeldet. Nichtsdestotrotz haben Züchter-Firmen durch MTAs Zugriff auf das *Cal-1* Samenmaterial erhalten und testen die Eigenschaften durch Einkreuzen in ihre Elitevarietäten.

### **Bekanntgewordener Fortschritt von anderer Seite**

Die identifizierten Mais Cal-Mutanten sind einzigartig und daher gibt es keine Studien von anderer Seite, die sich mit solchen Mais-Mutanten beschäftigt.

### **Erfolge oder geplante Veröffentlichungen**

Folgende Veröffentlichungen sind durch die Arbeiten an diesem Projekt entstanden:

- Wang S et al., 2023, A large-scale forward genetic screen for maize mutants with altered lignocellulosic properties. *Frontiers in Plant Science*, 14:1099009 doi: 10.3389/fpls.2023.1099009
- Perrot T, et al., 2022, Emerging roles of  $\beta$ -glucanases in plant development and adaptive responses, *Plants*, 11 (9), 1119; doi: 10.3390/plants11091119
- Behle und Raguin, 2021, Stochastic model of lignocellulosic material saccharification, *PLOS computational biology*, doi: 10.1371/journal.pcbi.1009262
- Vorabpublikation: Parthosakha De et al., PREDIG: web application to model and predict the enzymatic saccharification of plant cell wall; DOI: 10.13140/RG.2.2.35284.78720

Desweiteren erwarten wir weitere Publikationen über die Mais-Landrassen Analyse, so bald SNPs identifiziert und genetisch bestätigt werden können.