

**Abschlussbericht / Phase 1**

Zum LMS vom 07.07.2008, Nr. L/a-7396-298

Forschungsvorhaben Kap 1331 TG 62	<b>Klimatoleranz bei Gerste – von der Induktion zur Genfunktion Ein Smart Breeding Ansatz zur Selektion auf Trockentoleranz und UV-Strahlungsresistenz KL/08/06</b>
Laufzeit	<b>01.07.2008 – 31.12.2011</b> Verlängerung des vorliegenden Projektes wurde beantragt
Arbeitsbereich  Projektbearbeiter Projektleiter	IPZ 1b / Genomanalyse  Dr. Manuela Diethelm Dr. Schweizer

**Zielsetzung:**

Der Einfluss des Klimawandels auf unsere Kulturpflanzen ist besonders dramatisch, da Pflanzen am Anfang unserer Nahrungskette für Futter- und Lebensmittel stehen. „Ertragssicherung“ und damit die richtige Sortenwahl ist das wichtigste Kriterium dem Risikofaktor „Klimastress“ begegnen zu können. Zwar gibt es schon heute bei allen Fruchtarten trockenolerantere Typen, jedoch ohne die Qualität und Höchstserträge aktueller Kultursorten erreichen zu können. Da Sorten aus Israel, Spanien und Italien per se nicht in unsere Anbauggebiete passen, ist eine innovative Basis-Züchtung gefordert und damit Sorten, die im Durchschnitt der Jahre mit sicheren und hohen Erträgen bei bester Qualität punkten können.

Unsere Kulturpflanzen stellen sich mit Hilfe ihrer genetisch vererbten Eigenschaften unterstützt durch innovative Züchtungsmethoden den Extremereignissen des Klimas. Im vorliegenden Forschungsansatz sollen deshalb exakt die Gene, die in der Abwehrreaktion der Gerste auf „Klimastress“ eine entscheidende Rolle spielen, identifiziert, analysiert und innovativen Züchtungsprogrammen zur Verfügung gestellt werden. Für den Praxiseinsatz werden für diese Gene entsprechende Selektionsmarker für die Analyse genetischer Ressourcen (Genbank, Zuchtgarten, div. Genpools) und insbesondere aber für die Selektion von stresstolerantem Zuchtmaterial entwickelt.

Der vorliegende Forschungsansatz bedient sich neuester, molekulargenetischer Untersuchungsmethoden. Er ist die Grundlage für die Entwicklung eines übergreifenden DNA-Tests zur Erfassung der Gene, die von der Pflanze zur Reaktion auf den Klimawandel benötigt werden. Er ermöglicht die gezielte Bereitstellung von stresstoleranten Sorten für die Landwirtschaft ohne Ertrags- und Qualitätseinbußen eingehen zu müssen.

## Versuchsaufbau, Material und Methoden

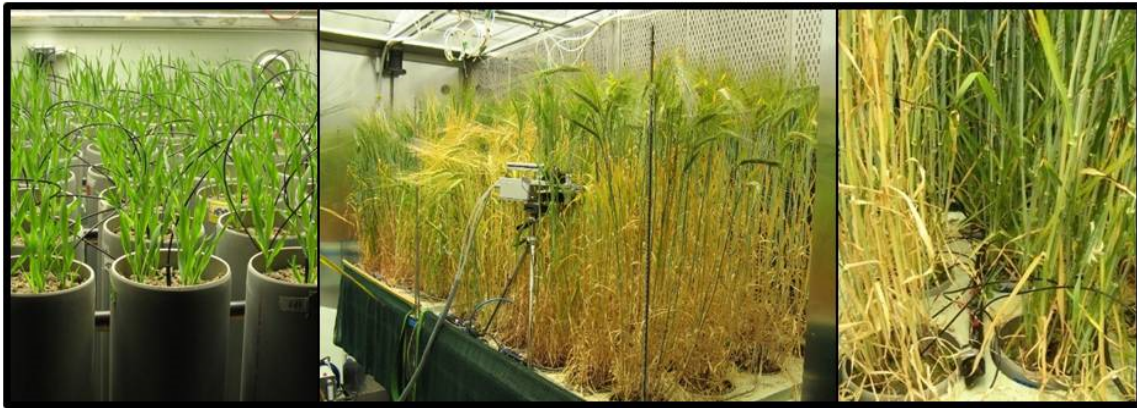


Abb. 1: LfL-Klimakammerversuch zum Thema: „Trockentoleranz bei Gerste“ am HelmholtzZentrum München. Bild 1: Anzucht der Versuchslinien in Erdröhren (0,8m hoch). Bild 2: Messung der Chlorophyllfluoreszenz in den Blättern. Bild 3: spezifisches Bewässerungssystem in den einzelnen Anzuchtröhren.

### Phänomics:

In Kooperation mit mehreren Arbeitsgruppen des HelmholtzZentrums München und der TUM konnten im Sonnensimulator-Versuch „V105“ in Neuherberg ausgewählte Gersten über den gesamten Vegetationsverlauf von der Keimung bis zur Abreife unter streng kontrollierten und realitätsnahen Klimabedingungen geprüft werden. Der Sonnensimulator besteht aus 4 identischen Klimakammern und konnte das Licht- und Klimaspektrum im Tages- und Jahresverlauf realitätsnah nachbilden. Während zwei Kammern den natürlichen Klimaverlauf simulierten, wurden zwei weitere Klimakammern mit zusätzlichem UV-Strahlungsstress gefahren. Die Bewässerung für den Trockenstress in jeder der 4 Kammern war Blockweise mit 6 Prüfgliedern steuerbar.

## Versuchsaufbau Klimakammer

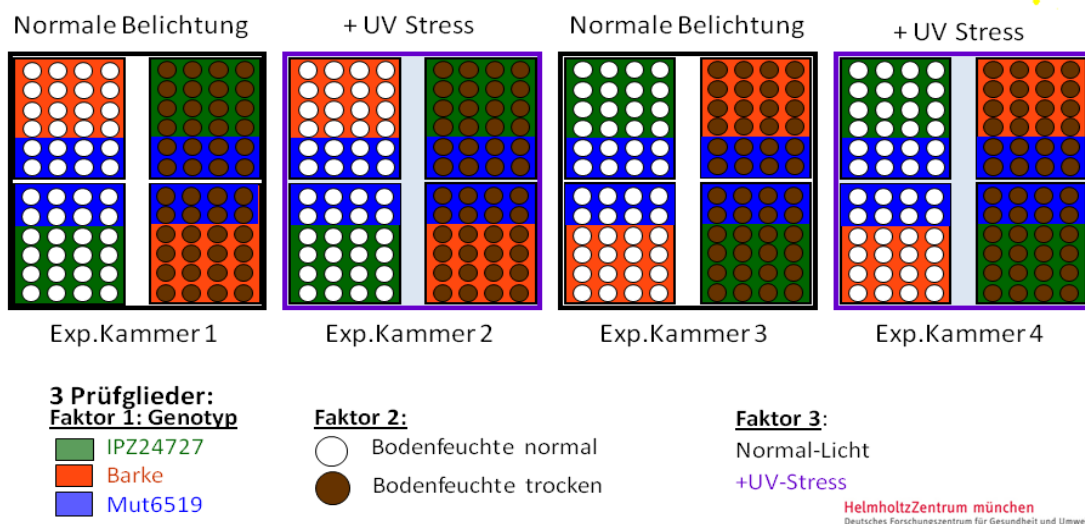


Abb. 2: Belegung der 4 baugleichen Klimakammern: Während die linke Hälfte jeder Kammern (weiße Punkte) als Kontrollbehandlung diente, wurde die rechte Hälfte (braune Punkte) zum Zeitpunkt der „Kornfüllungsphase“ einem 12-tägigen Trockenstress mit anschließender Wiederbewässerung unterzogen.

Durch den gewählten Versuchsaufbau konnte in jeder der 4 Klimakammern die „Trockenstressvariante“ über einen Zeitraum von 12 Tagen zur „Kornfüllungsphase“ jeweils im direkten Vergleich zur „normal bewässerten Variante“ bei allen Genotypen gleichzeitig geprüft werden.

### **Pflanzenmaterial:**

Für den vorgestellten Versuch wurden die Sommergersten: Barke, LfL24727 und Mut6519 ausgewählt:

*Barke*: 2z Sommerbraugerste (Sz. Breun) und Referenzsorte deutscher Genom-Projekte. Genom- und Chromosomenkarten sind verfügbar, sie ist anfällig gegenüber nichtparasitärer Blattverbräunung.

*LfL24727*: 2z Sommerbraugerste, ein LfL-Zuchtstamm mit verfügbaren Genomdaten, sie hat nachgewiesene Resistenz/Toleranz gegenüber abiotischem Stress und Ramularia.

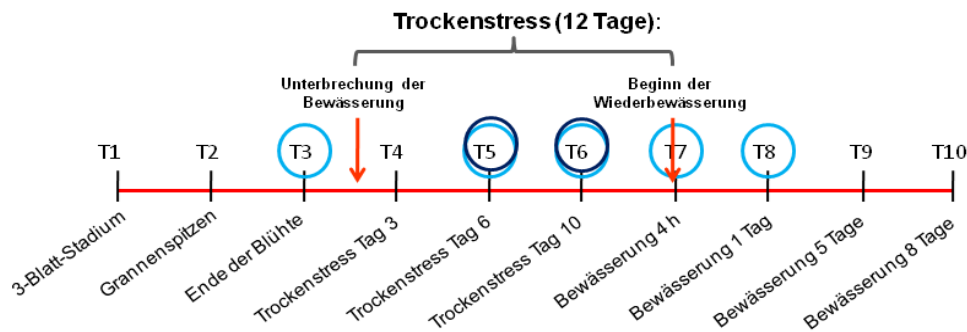
*Mut6519*: 2z Sommerbraugerste, sie ist sehr früh in Blüte und Abreife, ein argentinischer Zuchtstamm mit nachgewiesener Resistenz/Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress. Für alle 3 Genotypen liegen an der LfL entsprechende Kartierungspopulationen (DH-Populationen) vor.

### **Genomics:**

Kurze Einführung: Der Genomanalyse/IPZ1b ist es in den letzten Jahren gelungen die Expressions- und Transkriptomanalyse als festen Bestandteil der Markerentwicklung zu etablieren (GABI-, DFG- und Ministeriumsprojekte). Der Vorteil der Expressionsanalyse zeigt sich in der speziellen und alleinigen Analyse der „aktiven“ Gene einer Pflanze. Die Gesamtheit aller aktiven Gene wird hierbei als „Transkriptom“ bezeichnet. Bei der Transkriptomanalyse wird anstelle von DNA entsprechend mit mRNA als Ausgangssubstrat für die molekularen Analysen gearbeitet. Das Transkriptom der Pflanzen wird entscheidend durch äußere Einflüsse wie Hitze, Licht, Tageslänge aber auch durch Stress beeinflusst: Der Befall von Weizen durch den pilzlichen Schaderreger „Fusarium“ induziert dessen Verteidigungsgene, während die Vermälzung der Gerste in der Mälzerei die Gene für die Keimung im Gerstenkorn induziert. Die Pflanze reagiert somit auf die Induktion von außen mit einem speziellen Genexpressionsmuster (in den genannten Beispielen wären dies „Fusarium-Befall“ bzw. „Temperatur- und Feuchtigkeitsverläufe“ in der Mälzerei). Der Vergleich aller exprimierten, aktiven Gene am Beispiel „Fusarium befallener Weizen“ mit einem „nicht induzierten Weizen“ zeigt dann all die Gene auf, welche von der untersuchten Weizenpflanze speziell zu ihrer Verteidigung gegen Fusarium benötigt werden, sie werden auch als „Kandidatengene“ bezeichnet. Über weitere Analysen und DNA-Sequenzierungen können anschließend einfach zu handelnde Selektionsmarker für Züchtungsprogramme entwickelt werden. Da nur 5-10% des Erbmaterials der Pflanze auch tatsächlich Genen entspricht, bedeutet die Transkriptom- oder Expressionsanalyse eine enorme Effizienzsteigerung der Genomanalyse und Innovation für die Züchtungsforschung.

Projektansatz: Die Abfrage des Status Quo des Transkriptoms im vorliegenden Projekt erfolgte zunächst über einen DNA-Chip. Unter Anwendung des „Barley 44k DNA-Arrays“ der Fa. Agilent konnten parallel ca. 40.000 „bekannte“ Genfragmente der Gerste auf deren Expression abgefragt werden. Die Analyse „neuer“, unbekannter Gene und Transkriptionsfaktoren wurden dann über „New-Generation-Sequencing“-Techniken (NGS) nämlich der „454“-Sequenzierung der Fa. Roche und der „Solexa“-Sequenzierung der Fa. Illumina durchgeführt. Diese erfassen bis zu 400.000 Gensequenzen bzw. 10 Mio. Reads pro Durchgang. Die Ansätze zur vergleichenden Transkriptomanalyse im vorliegenden Projekt sahen wie folgt aus: Die ausgewählten Versuchsgersten Barke, LfL-24727 und Mut6519 wurden sowohl einem „normalen“ Vegetationsverlauf als auch einem realistischen „Trockenstress zur Kornfüllungsphase“ über 12 Tage ausgesetzt (*Abb. 2*). Zu definierten Zeitpunkten (*Abb. 3*) wurde dann von allen Gerstengenotypen parallel das Genmuster bezüglich Zeitpunkt und Stressvariante analysiert und herausgearbeitet, welche Gene in der Trockenstressvariante benötigt bzw. induziert wurden.

# Probenahmezeitpunkte



Alle Beprobungszeitpunkte je Genotyp waren abhängig vom Entwicklungsstadium

- Agilent 44K DNA-Array Analysis und Roche-454-DNA Sequenzierung
- Illumina-Solexa Tief-Sequenzierung (jew. 10 Mio reads/Genotyp und Variante)

Genomanalyse - IPZ1b

Abb. 3: Darstellung der Probenahmezeitpunkte für die 3 Gerstengenotypen Barke, LfL24727 und Mut6519. Die Zeitpunkte der durchgeführten Expressionsanalysen sind blau markiert.

## **Bioinformatics:**

Die aufwändige bioinformatische Auswertung des Versuches wurde in Zusammenarbeit mit dem Max Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm/Potsdam in Zusammenarbeit mit Prof. Björn Usedal, Dr. B. Kersten und Dr. Marc Lohse durchgeführt. Die bereinigten Genexpressionslisten der Sequenzinformationen aller Pflanzen, Zeitpunkte, Behandlungen und Wiederholungen zeigten alle Gene samt Expressionsprofile (Expressionslevel jeden einzelnen Gens) zum jeweiligen Entwicklungsstadium der untersuchten Pflanzen an. Zunächst wurden aus den einzelnen Sequenzfragmenten Gene mit einem möglichst langen Leseraster (contigs) gebildet. Sequenzvergleiche mit internationalen Datenbanken (TIGR, NCBI, GABI) ermöglichten die Identifikation und Zuordnung dieser Gene. Der Vergleich der verfügbaren Sequenzinformation eines Gens zwischen den Sorten führte zu Allelvarianten und selektierbaren Polymorphismen. Auf jeder dieser Ebenen konnten Genvariante und Häufigkeit eines Gens bestimmt und ein entsprechendes Expressionsprofil abgeleitet werden. Damit ist für jeden Probenahmezeitpunkt überprüfbar, ob und wann das entsprechende Gen in welcher Kopienzahl bei welcher Pflanze abgelesen wird – eine wertvolle Ressource auch für weitere Fragestellungen!

Folgende „vergleichende Expressionsprofile“ wurden bereits bearbeitet:

12 Tage Trockenstress ⇔ Normalbewässerung (bei Tages-/Normallicht)
Barke ⇔ LfL ⇔ Mut6519
Zeitpunkte T3, T4, T5, T6, T7, T8
Proben aus dem Rainout Shelter sind für 2012,13 geplant

### **Auswertung:**

Alle auffälligen und speziell induzierten oder herunter regulierten Gene wurden erfasst und ihre jeweilige Aktivität quantitativ bestimmt. Die Funktion und Vernetzung mit anderen Stoffwechselwegen wurde u.a. über Datenbank- und Literaturrecherchen sowie MapMan-Analysen (*siehe Abb. 5-7*) dargestellt und identifiziert. Über Sequenzanalysen und Resequenzierungen bei ausgewählten Sorten wurden erste Haplotypenmuster bestimmt und PCR-Reaktionen für eine MAS sowie Aussagen zur genetischen Diversität dieser Allele abgeleitet.

### **Abkürzungen/Glossar:**

ABA: Phytohormon Abscisinsäure

cDNA (copy DNA): In DNA umgeschriebene Boten- oder mRNA.

DNA-Array Technik: Bereits bekannte Gene werden in Form von kurzen Genfragmenten auf einen Filter/DNA-Chip gespottet. Auf diesen werden fluoreszenz-markierter RNA-Proben (cDNA) gegeben, welche an die Genfragmente spezifisch anhybridisieren können. Die Auswertung der Intensität der Fluoreszenz je Genfragment gibt Auskunft über den Expressionslevel des Gens.

DH (Doppel-Haploide): Aus Antheren oder Mikrosporen erzeugte reinerbige Gerstenlinien.

EST (Expressed Sequence Tag): Ein sequenziertes Stück cDNA

Expressionsprofil: Erfassung der Aktivität von Genen in unterschiedlichen Geweben/Zeitpunkten oder Genotypen.

Haplotypen: Beschreibung der vorliegenden/vorkommenden Allelformen eines Gens; i.d.R. auf der Basis von SNPs.

MAS: Marker Assisted Selection.

nt: Abkürzung für Nukleotide = DNA Bausteine

Oligonukleotide: Nukleotidsequenz bestehend aus ca. 10 bis 100 Basen langen, synthetisch hergestellten Einzelstrang-DNA-Einheiten

SA: Salicyl-Acid, Salicylsäure

SNP (Single Nucleotid Polymorphism): Einzelner Basenaustausch im Vergleich von Gensequenzen eines Gens oder DNA-Fragments.

Transkriptom: Gesamtheit aller aktiven (=exprimierten) Gene einer Pflanze im untersuchten Gewebe und zum untersuchten Zeitpunkt.

### **Ergebnisse:**

#### **Klimakammerversuch:**

Zusammen mit den Kooperationspartnern des HelmholtzZentrums konnten im Klimaversuch „V105“ alle 4 Kammern mit den 3 ausgewählten Gerstengenotypen Barke, LfL27727 und Mut6519 jeweils stadienspezifisch für die Expressionsanalysen beprobt werden. Während des Versuchsverlaufes wurden phänotypische Daten erhoben und Klimakammerdaten aufgezeichnet.

#### **DNA-Array:**

Eingesetzt wurde der „Barley 44k DNA-Array“ der Fa. Agilent. Jeder der eingesetzten DNA Chips enthält 4x40.000 Positionen mit jeweils genspezifischen DNA-Sequenzen zu 40.000 Genen. Sie sind in Form von spezifischen 60nt-Oligos (60 Nukleotid lange Oligonukleotide) auf dem DNA-Chip abgebildet. Die hierfür eingesetzten Gensequenzen wurden aus Datenbankeinträgen (TIGR, NCBI usw.) abgeleitet und repräsentieren das Gerstengenom. Es ist jedoch kein DNA-Chip der exklusiv stressassoziierte Gene enthält. Die Versuchsdurchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. C. Wagner vom IMGGM im Gründerzentrum München. Je häufiger ein Gen exprimiert und abgelesen wird, desto häufiger kann es an die 60nt lange, komplementäre Oligosequenz andocken (hybridisieren). Die Expressionsdaten der regulierten Gene wurden in das MapMan-Tool (Usedal et al. 2005) des Max Planck-Instituts/Golm eingelesen und pro Zeitpunkt und Genotyp dar-

gestellt. Ergebnisse hierzu sind am Beispiel Barke (Abb. 4a-4c) dargestellt. Die Zuordnung der unter zunehmendem Wassermangel exprimierten Gene zu den entsprechenden Stoffwechselwegen war somit erfolgreich.

## Barke, T5 (Trocken – Bewässert)

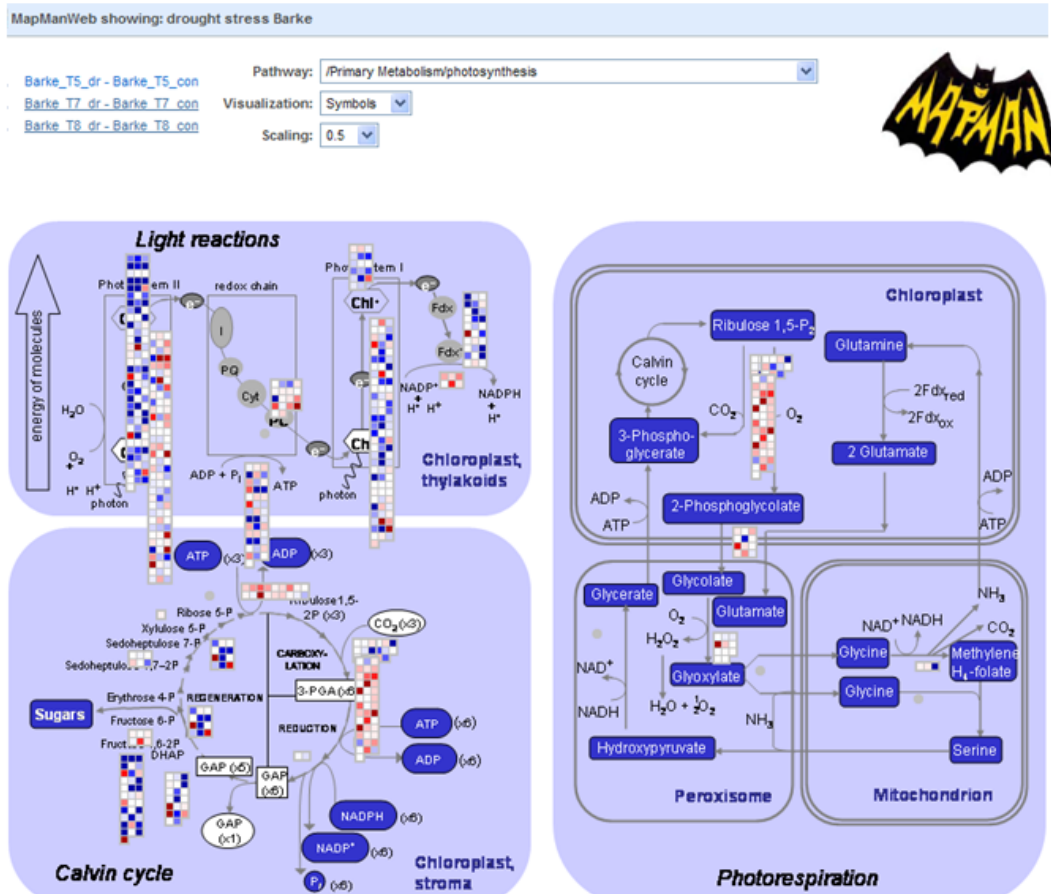


Abb. 4a: Auszug der MapMan Analyse am Beispiele der Sorte „Barke“ zum Zeitpunkt T5 (Screenshot) unter Anwendung der DNA-Chip-Technologie. Im Versuch exprimierte Gene konnten spezifischen Stoffwechselwegen zugeordnet werden, in der Abbildung sind beispielhaft Photosynthese und Calvin Cyclus ausgewählt. Jedes Kästchen steht hierbei für ein spezifisches Gen im jeweils gezeigten Stoffwechselweg der Pflanze. Blaue Kästchen repräsentieren hoch- rot markierte Kästchen herunter regulierte Gene. Für weitere Stoffwechselwege bis hin zum Sekundärstoffwechsel der Pflanze als auch zu Transkriptionsfaktoren liegen entsprechende weitere Analysen vor. Weitere Erklärungen siehe Text.

# Barke, T7 (Trocken – Bewässert)

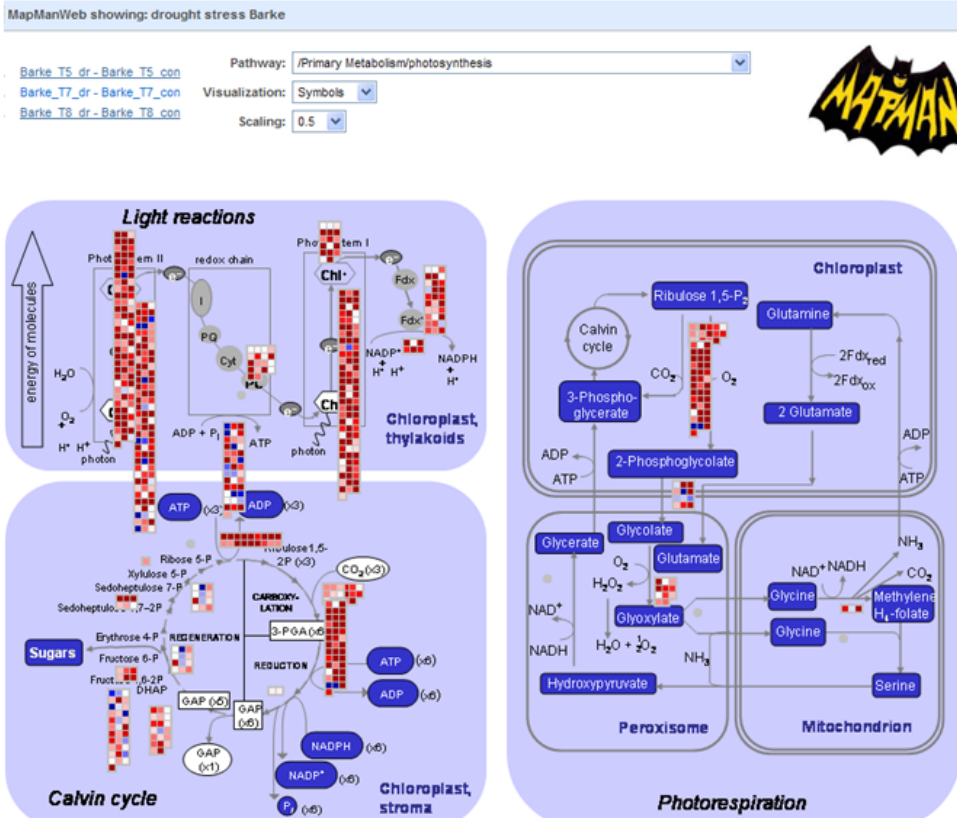


Abb. 4b: MapMan Analyse der Sorte „Barke“ zum Zeitpunkt T7.

# Barke, T8 (Trocken – Bewässert)

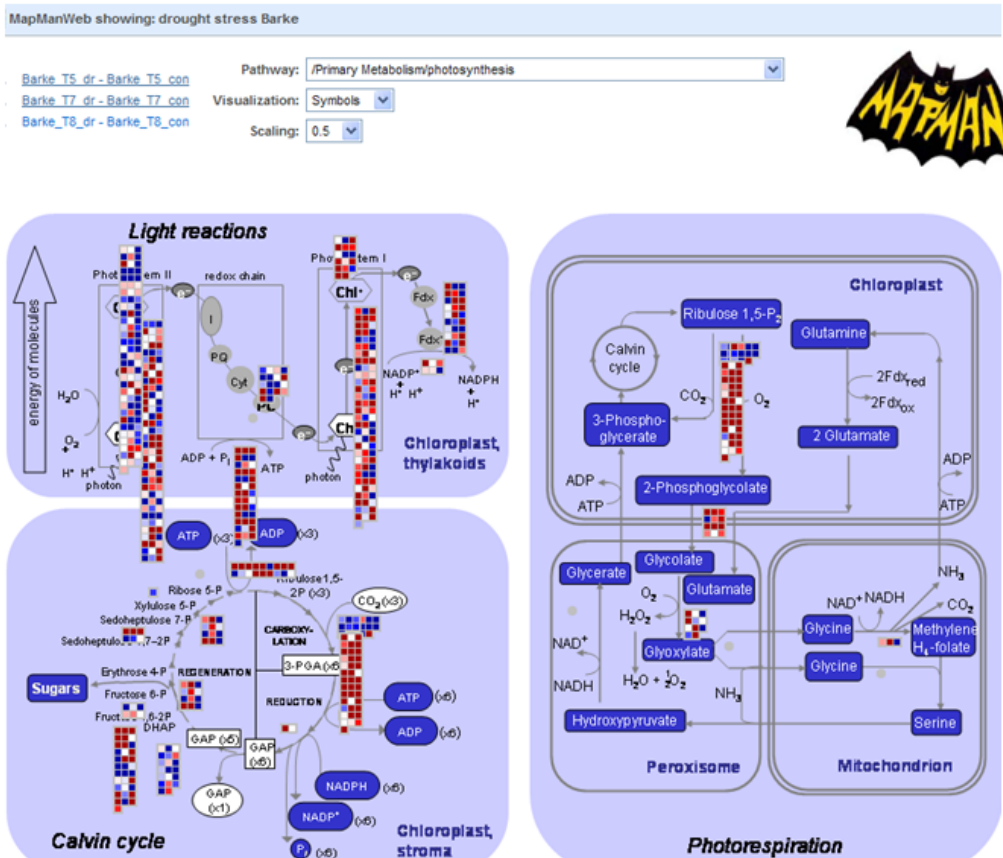


Abb. 4c: MapMan Analyse der Sorte „Barke“ zum Zeitpunkt T8.

### MapMan-Analyse Tool:

Das Programm wurde ursprünglich für *A. thaliana* entwickelt und ermöglicht erstmalig die sichtbare Darstellung des Expressionslevels aller wichtigen Gene eines Stoffwechselweges im vorliegenden Versuch. Jedes Kästchen/Gen der Abb. 4a-4c in der MapMan-Auswertung ist animiert und mit weiteren Informationen und Sequenzen zum jeweiligen Gen hinterlegt, es repräsentiert jeweils ein spezifisches Gen eines Stoffwechselweges (die Position ist in allen Abbildungen fix). Die Farbe der Kästchen symbolisiert hierbei die Stärke der Genexpression dieses Kandidatengens bezüglich Trockenstresses. Je dunkelblauer das Kästchen eingefärbt ist, desto stärker ist das Gen unter Trockenstress im Vergleich zur Bewässerten Kontrolle exprimiert. Grau bis weiß zeigt, dass dieses Gen kaum/keinen Unterschied in seiner Genregulation zeigt und die Intensität der Rotfärbung zeigt, wie stark das Gen unter Trockenstress im Vergleich zur bewässerten Kontrolle herunter reguliert wird.

Zusammenfassend lässt die MapMan-Analyse deutlich erkennen, wie zum Zeitpunkt T5 (6 Tage „ohne Bewässerung“) bereits viele Gene herunter reguliert werden, nach 12 Tagen Trockenheit (T7) ist das komplette Ausschalten (rot markierten Gene) ganzer Stoffwechselwege bei der Sorte „Barke“ zu beobachten. Doch bereits am ersten Tag nach der Wiederbewässerung (T8) werden Photosynthese und Energiestoffwechsel erkennbar hochgefahren und die Syntheseleistungen erneut aufgenommen (die jeweiligen Zeitpunkte sind in Abb. 3 zusammengestellt).

Während die MapMan-Darstellung einen sehr guten Eindruck vermitteln konnte, bei welchem Genotyp zu welchem Zeitpunkt welche Stoffwechselwege auffällig reguliert waren, so konnte über die VENN-Diagramm Darstellung (Abb. 5) ein Überblick über die Anzahl der betroffenen und differentiell regulierten Gene wiedergegeben werden. Blau gekennzeichnet sind die hochregulierten- rot gekennzeichnet die herunter regulierten Gene, welche zum Zeitpunkt T7 im Vergleich der jeweiligen Sorte von „Trockenstress“ und „Bewässert“ deutlich auffällig reguliert waren.

## Signifikant unterschiedlich regulierte Gene unter Trockenstress

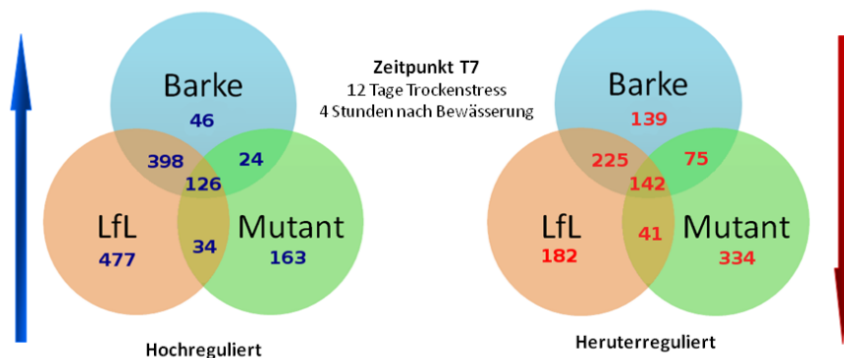


Abb. 5: Anzahl der bezüglich Trockenstress signifikant hoch- bzw. herunter regulierten Gene. Je nach Schnittmenge können die Kandidatengene einem oder allen 3 Genotypen zugeordnet werden.

### Kandidatengene:

Aufbauend auf den bislang erreichten Ergebnissen und unter Einbeziehung der in der Literatur als „stressreguliert“ beschriebenen Genen, konnte eine Vielzahl an deutlich differentiell regulierten „Kandidatengenen“ für die weiteren Analysen herausgearbeitet werden. Besonderer Augenmerk sollte hierbei auf die „sinnvolle“ Verknüpfung der einzelnen Kandidatengene in logisch zusammenhängenden und gemeinsam regulierten Stoffwechselwegen gelegt werden (u.a. Comadran, J. et al. 2008; Vaahtera, L. et al. 2011).

Die Kandidatengenanalyse wurde im Projekt für eine breite Anzahl an Genen erfolgreich durchgeführt. Das jeweilige Kandidatengen wurde hierfür im ausgewählten Gersten-Genpool resequenziert und bezüglich seiner vorhandenen Allele untersucht. Sequenzunterschiede wurden dann mit internationalen Gendatenbankeinträgen abgeglichen (BLAST-Analysen) und das Haplotyp-Muster (sie-



he auch Beispiel in Abb. 6) in eine eigene Genpool-Dokumentation niedergelegt. Auf Basis dieser Daten konnten erste allelspezifische Marker für sich anschließende Assoziationsstudien und Züchtungsprogramme entwickelt werden, bzw. befinden sich im derzeit laufenden Folgeprojekt in Arbeit (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht zur Kandidatengenanalyse unter Trockenstress bei Gerste

Projektpunkte:	Anzahl
assemblierter Genfragmente	36.000
SNPs in den assemblierten Genfragmenten	12.860
Anzahl der Gene mit signifikanten Unterscheiden im Expressionslevel (trocken vs. bewässert)	2.800
Anzahl der Gene mit signifikanten Unterscheiden im Expressionslevel (trocken vs. bew.) + bekannten SNPs	640
Für weiterführende Analysen ausgewählte Kandidatengene	252
Resequenziert (Barke, Mut6519, LfL24727)	90
Haplotypenanalyse (an 15 Gersten) → bereits erste Marker für die Testung in der Praxis verfügbar	50

Der Programm-Arbeitsschritt „Kandidatengene“ bringt zwei wichtige Vorteile: Über die Sequenzvariationen und die hieraus entwickelten SNP-Marker kann zum einen eine entsprechende Genkartierung im Gerstengenom und damit der genetischer Einfluss dieses Genortes auf das Zuchtmerkmal berechnet und bestimmt werden. Zum anderen sollten sich Gen und Marker hierbei als züchtungsrelevant erweisen, dann können diese Marker umgehend als allelspezifische SNP-Marker in eine schnelle und zielgerichtete MAS für den Praxiseinsatz umgesetzt werden.

Im Folgenden sollen drei Beispiele zur oben beschriebenen Kandidatengenanalyse die Vorgehensweise erläutern:

**Drei Beispiele zur Kandidatengenanalyse:**  
**Kandidatengen: „NADP-malic enzyme“**

**Haplotyp des Gerstengens: NADP-malic enzyme (TA34549\_4513)**

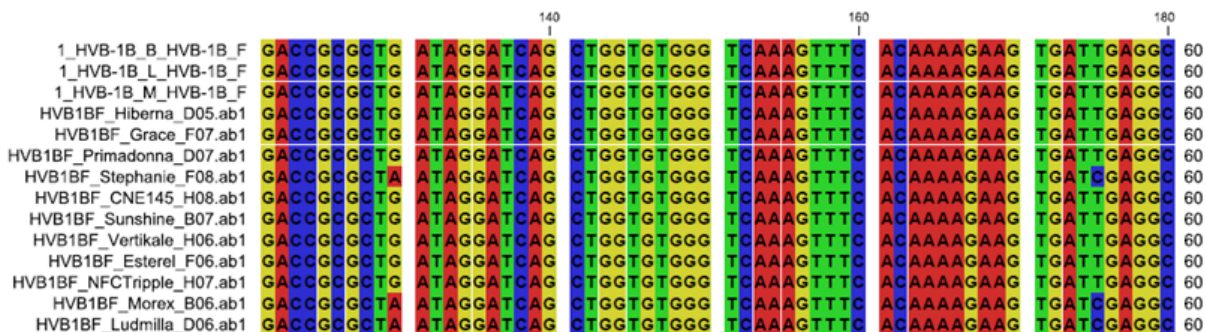


Abb. 6: Haplotyp des trockenstress-induzierten Gens „NADP-malic enzyme“. Die Resequenzierung dieses Gens bei 14 ausgewählten Gerstensorten zeigt das Vorkommen von 2 Allelgruppen an. SNP1(G/T) konnte bei 130bp, SNP2 (T/C) bei 175bp nachgewiesen werden.

„NADP-malic enzyme“ ist ein Kandidatengen für Trocken- und Kältstress und konnte u.a. im Blatt nachgewiesen werden. Das Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von L-Malat und produziert Pyruvat, CO<sub>2</sub> und NADPH. Dem vorgestellten Enzym wird wegen seiner Genregulation über die Phytohormone Abscisinsäure (ABA) und Salicylsäure (SA) eine wichtige Rolle zur Vermeidung von Trockenstress in der Pflanze zugeschrieben. Die herausgearbeiteten SNPs (SNP1: T/C, SNP2: G/T) können sowohl für die Kartierung des Gens als auch als Selektionsmarker in Züchtungsprogrammen eingesetzt werden. In noch ausstehenden Assoziationsstudien muss nun gezeigt werden, welches dieser Allele einen Selektionsvorteil der Pflanze im Sinne des Züchters unter Trockenstressbedingungen mitbringt.

**Kandidatengen: „NCED“ (9-cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase)**

Ein weiteres Schlüsselenzym für die Reaktion auf Trockenstress bei Pflanzen stellt NCED für die Synthese von Abscisinsäure (ABA) dar. Abscisinsäure ist ein essentielles Phytohormon und regelt in unterschiedlichen Stufen die Pflanzenentwicklung. Eine Vielzahl stress-induzierbarer Kandidatengene besitzen deshalb Erkennungs-Sequenzen die durch ABA bzw. durch ABA-regulierte Transkriptionsfaktoren induziert werden. Eine große Anzahl an Untersuchungen belegen die zentrale Rolle der ABA-gesteuerten Reaktion auf abiotischen Stress (Abb. 7).

## Abcisinsäure/ABA und Trockenstress

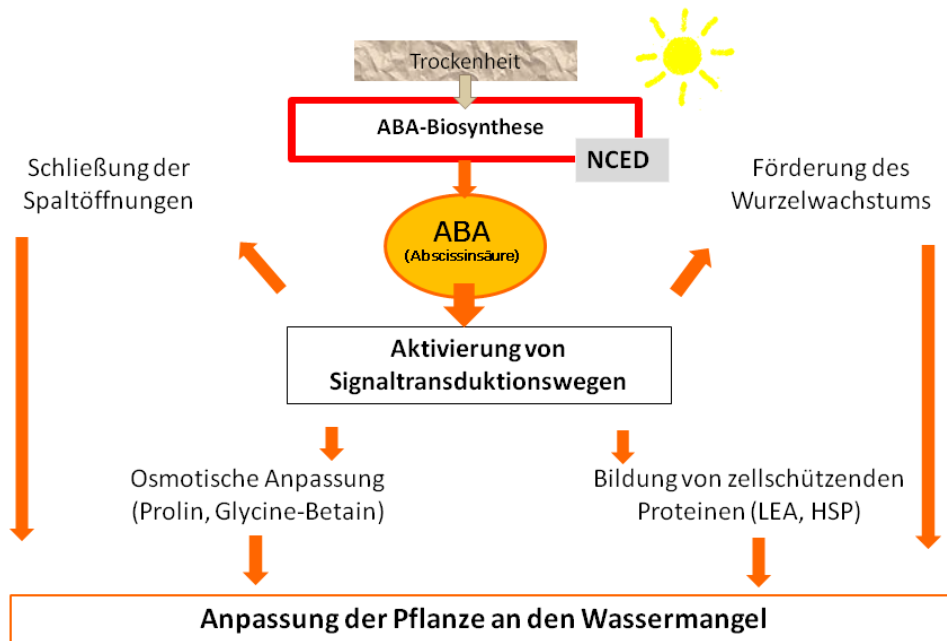


Abb 7: Übersicht der Abscisinsäure-Wirkung (ABA) zur Anpassung der Pflanze an Wassermangel. Die Abbildung ist stark vereinfacht, da ein vielfaches an Enzymen, Transkriptionsfaktoren und Transportproteinen an der Regulation und Feinsteuerung beteiligt sind.

Abcisinsäure ist damit ein enorm wichtiges abiotisches Stresshormon - seiner Synthese wird deshalb eine ganz besondere Rolle bezüglich Trockenstress und Genregulation zugewiesen. Die Verfügbarkeit von ABA wird auf zwei Wegen sichergestellt: ABA kann enzymatisch im Gewebe neu hergestellt oder aber in einer glycosilierten inaktiven Form gespeichert und durch Abspaltung des Zuckerrestes durch die  $\beta$ -Glucosidase „BG1“ (Lee et al. 2006) sehr schnell verfügbar gemacht werden. „BG1“ wiederum wird schnell und effektiv durch Wasserentzug aktiviert.

In der Neu-Synthese von ABA spielt das Enzym NCED (9-cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase) eine zentrale Schlüsselrolle und wird als Kandidatengen im vorliegenden Versuchsansatz intensiv analysiert.

Im vorliegenden Versuch zeigte der Expressionslevel des Genes für die NCED über DNA-Array- und qRT-PCR-Analysen im Verlauf der 3 Zeitpunkte (T5, T6 und T8) bei „LFL-24727“ einen deutlich früheren und stärkeren Expressionslevel an, als bei der Sorte „Barke“ (Abb. 9). Der NCED-Level geht dann kontinuierlich zurück, um dann wieder auf den Normallevel abzusinken, der für ein normales Entwicklungswachstum notwendig ist. Barke reagiert hier Zeitversetzt. Zum Zeitpunkt T8, dem ersten Tag der Wiederbewässerung, wird wieder ein niedriger, stressfreier NCED-Pegel erreicht.

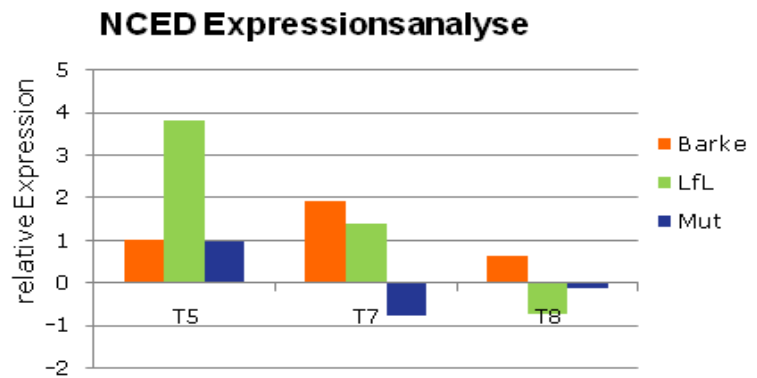


Abbildung 9: Relative Genexpression von NCED, einem Schlüsselenzym der ABA-Biosynthese zu den Zeitpunkten T5, T7 und T8. Gezeigt ist die Genexpressionsveränderung im Vergleich zur bewässerten Kontrolle.

### Kandidatengen: „Prolin5C-Synthase“

Prolin gilt als Biomarker für Trockenstress in der Pflanze und konnte ebenfalls im Blattgewebe nachgewiesen werden. Untersuchungen im Bereich der Prolin-Biosynthese ergaben im Vergleich zur NCED ein ähnliches Bild (Abb. 10). Bei LfL24727 und Mut6519 wird deutlich schneller als bei Barke über die eingeleitete Genexpression der P5C-Synthase in Richtung Prolin-Produktion in der Pflanze reagiert. Nach Wiederbewässerung wird die Produktion von Prolin und damit der P5C-Synthase umgehend eingestellt.

#### Prolin-Biosynthese: P5C-Synthase Expressionsanalyse

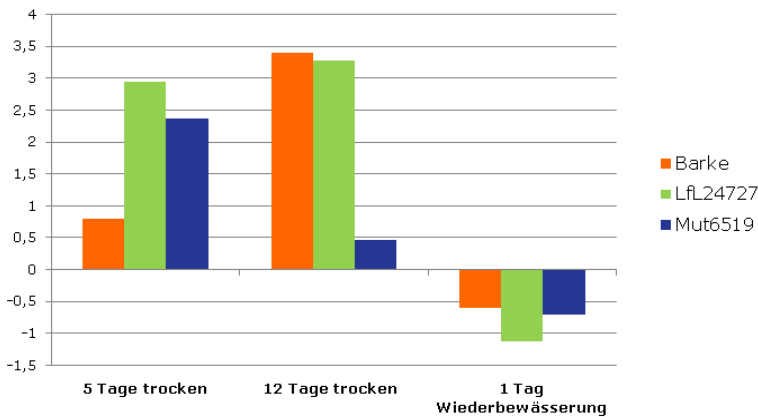


Abb. 10: Relative Genexpression der P5C-Synthase, einem Enzym des Prolinstoffwechsels aus Glutamat.

Kurzzusammenfassung der beispielhaft genannten 3 Kandidatengene: Sowohl für das NADP-malic enzyme, die NCE-Dioxygenase als auch für die P5C-Synthase konnten für anstehende Assoziationsstudien bereits entsprechende Selektionsmarker entwickelt werden.

Generell: Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsdaten des vorliegenden Versuchsansatzes trockenstress regulierte Kandidaten- und Schlüsselgene für die relevanten Stoffwechselwege anzeigen. In weiteren Schritten werden diese und oben genannte Gene und Genorte (Tab.1) mit Hilfe von Assoziationsstudien an diversem Sortenmaterial z. B. im Rainout-Shelter (Abb. 11) und weiteren Umwelten auf ihren Einfluss auf Trockenstress zur Steigerung der Ertragssicherheit überprüft.



*Abb. 11: Rainout-Shelter der LfL. Ein ausgewähltes Gerstensortiment von hoher genetischer Diversität wird unter „Feldbedingungen“ auf ihre Reaktion auf Trockenstress geprüft*

## **Zusammenfassung**

Neue Techniken der Genomanalyse ermöglichen, einer Momentaufnahme oder einem Blitzlicht gleich, die synchrone Analyse aller aktiven Gene eines Gewebes, um sie dann mit einer zweiten Aufnahme vergleichen zu können. Wird das Transkriptom (Gesamtheit aller exprimierten Gene) einer unter Trockenstress belasteten Pflanze mit dem Transkriptom einer gut bewässerten Kontrollpflanze verglichen, so können all die Gene erfasst werden, die unter dem Faktor „Trockenstress“ eine züchtungsrelevante Rolle spielen. Herkunft, Funktion und genetische Diversität dieser Gene lassen sich nach weiteren Analysen nutzen, um sie dann gezielt in markergestützte Züchtungsprogramme einsetzen zu können.

Im vorgestellten Projekt konnten basierend auf einem Klimakammerversuch am Helmholtz-Zentrum München ein Trockenstressversuch zum Zeitpunkt der Kornfüllungsphase durchgeführt werden. Dieser Zeitpunkt ist insbesondere für die Kornausbildung und damit für Ertrag und Kornqualität von höchster Bedeutung.

Im Versuch wurden das Transkriptom der ausgewählten Gersten „Barke“, „LfL24727“ und „Mut6519“ zu definierten Zeitpunkten jeweils unter Stress und Normalbedingungen in unabhängigen Wiederholungen analysiert.

Pro Zeitpunkt und Variante konnten hierbei jeweils 36.000 Genfragmente der Gerste mit über 12.000 SNP-Markerpositionen erfasst und analysiert werden. Zum agronomisch sehr wichtigen Zeitpunkt der Kornfüllungsphase zeigten hierbei 2.800 Genfragmente ein Trockenstress spezifisches Reaktionsmuster. Sie konnten mit Hilfe von „MapMan“ jeweils speziellen Stoffwechselwegen mit Verbindung zu Trockenstress zugeordnet werden. Insbesondere fielen 252 dieser Gene durch ihr auffälliges Reaktionsmuster zum Zeitpunkt „Trockenstress“ auf. Von 50 dieser Gene konnten bereits deren Allele über Sequenzanalysen an weiteren 15 ausgewählten Gerstensorten analysiert und deren genetische Diversität (Haplotypen) beschrieben werden. Für jeden Haplotyp dieser 50 Gene liegen bereits entsprechende SNP-Marker u.a. für die noch ausstehend Assoziationsstudien mit Daten aus dem LfL-Rainout-Shelter vor. Die Marker können aber auch schon über einen schnellen SNP-Chip Ansatz in die erste Praxisprüfung übertragen werden.

Die Arbeiten werden in einem Folgeprojekt weitergeführt.

## **Kooperationen**

IPZ2b/AG: Dr. M. Herz, G. Reichenberger.

Helmholtz-Zentrum München: A. Albert, B. Winkler, Werner, D. Ernst.

VertisAG: Dr. F. Thümmler

IMGM-Laboratories: Dr. C. Wagner

GATC-Biotec

Bioinformatik des Max-Planck Instituts für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm/Potsdam:

Prof. B. Usedal, Dr. B. Kersten, Dr. M. Lohse, S. Kleeßen

## Literaturverzeichnis

- Comadran J, Russel JR, van Eeuwijk FA, Cecacarelli S, Grando S, Baum M, Stanca AM, Peccioni N, Mastrangelo AM, Akar T, Al Yassin A, Benbelkacem A, Choumane W, Ouabbou H, Dahan R, Bort J, Araus JL, Pswarayi A, Romagosa I, Hackett C A and Thomas WTB (2008) Mapping adaptation of barley to droughted environments. *Euphytica* 161: 35-45.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM and Lee IJ (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126: 1109-1120
- Nambara E and Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 56: 165-185
- Schweizer G (2008). High-Tech – Smart Breeding. Neue Züchtungsverfahren mit Biotechnologie. Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt, Nr. 17 (25. 4. 2008) S. 44–47
- Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, Scheible WR, Gibon Y, Morcuende R, Weicht D, Meyer S and Stitt M (2005) Extension of the visualization Tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, displaying of corresponding genes and comparison with known responses. *Plant Pysiol* 138: 1195-1204
- Vaahtera L and Brosche M (2011) Review: More than the sum of its parts – How to achieve a specific transcriptional response to abiotic stress. *Plant science* 180: 421-430

## Veröffentlichungen und Vorträge

2009:

Klimatoleranz bei Gerste – von der Induktion zur Genfunktion. Internetseite: 2008

[http://www.lfl.bayern.de/ipz/gerste/33081/index.php?context=/lfl/ipz/forschung\\_und\\_zuechtung/](http://www.lfl.bayern.de/ipz/gerste/33081/index.php?context=/lfl/ipz/forschung_und_zuechtung/)

Hofmann K, Diethelm M, Herz M, Albert A, Winkler JB, Ernst D, Schmidhalter U, Kersten B, Wagner C, Thümmeler F, Schweizer G (2009): Mining for genes related to climatic stress tolerance in barley by comprehensive quantitative expression analysis. Poster-Abstract ITMI 2009\_016. S. 140. 19th International Triticeae Mapping Initiative, 3rd COST Tritigen, Clermont-Ferrand, France, August 31st – September 4th 2009

Schweizer G. (21.04.2009): Klimatoleranz bei Gerste – Expressionsanalyse zur Identifikation von Kandidatengenen. Vortrag: V105-Projektreffen, Helmholtz Zentrum München.

Hofmann K, Diethelm M, Herz M, Albert A, Winkler JB, Ernst D, Schmidhalter U, Wagner C, Thümmeler F, Riano-Pachon D, Kleeßen S, Lohse M, Kersten B, Schweizer G (2009): Klimastress-Toleranz in Gerste - Identifizierung assoziierter Gene durch umfassende quantitative Expressionsanalyse. 60. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2009, S. 167-170.

Schweizer, G. (04.11.2009): „Marker für Klimastress bei Gerste – von der Genfunktion zum SNP“ Vortrag GFP-Tagung 4.-5.11.2009, Bonn.

Schweizer G. (2009): Klimatoleranz bei Gerste – von der Induktion zur Genfunktion. Vortrag zum LFL Arbeitsschwerpunkt Klimaänderung am 17.07.2009 im StMELF in München.

2010:

Diethelm, M., Hofmann, K., Winkler, B., Lohse, M., Kersten, B. und Schweizer, G. (2010): Identification of genes associated with drought and UV radiation tolerance in barley by global gene expression analysis. Abstract Session 5/P18, Seite 57; 10. GPZ Haupttagung „Innovations in Breeding Methodology“, 15.-17.03.2010, Freising

Diethelm, M., Hofmann, K., Herz, M., Albert, A., Winkler, JB., Ernst, D., Schmidhalter, U., Wagner, C., Thümmeler, F., Pachon, DR., Kleeßen, S., Lohse, M., Kersten, B. und Schweizer, G. (2010): Drought and UV-radiation stress in barley - Identification of associated genes by a comprehensive gene expression analysis. Internationale Tagung: Plant Research in the Light of Climate Change (14.-16. April 2010 am Helmholtzzentrum München), Vortrag und Abstract: Seite 11

Diethelm, M., Hofmann, K., Herz, M., Albert, A., Winkler, JB., Schmidhalter, U., Riano-Pachon, D., Kleeßen, S., Lohse, M., Kersten, B. und Schweizer, G. (2010): Expression analysis of barley during drought stress at the grain filling stage. Poster-Abstract P8 der GPZ-Tagung „Genomics-based breeding“, 26/28.10.2010, Gießen

Schweizer, G, Diethelm, M., Hofmann, K., Albert, A., Winkler, JB., Schmidhalter, U., Riano-Pachon, D., Kleeßen, S., Lohse, M., Kersten, B. und Herz, M. (2010): Analysis of drought stress in barley by expression analysis at grain filling stage. Abstract P10-017, Seite 140, FESPB-Tagung 04/90.07.2010, Valencia, Spanien

Kleeßen, S., Lohse, M., Riano-Pachon, DM., Schweizer, G. und Kersten, B (2010): Towards transcriptomic markers for drought tolerance in Barley. Poster-Abstract German Conference on Bioinformatics (GCB2010), 20/22.09.2010 in Braunschweig

2011:

Brigitte Halaweh, Manuela Diethelm, Kerstin Hofmann, Markus Herz, Andreas Albert, Jana Barbro Winkler, Diego Riano-Pachon, Sabrina Kleeßen, Marc Lohse, Birgit Kersten, Björn Usadel, Jens Leon, Frank Ordon und Günther Schweizer (2011): Haplotyping and marker development of barley genes involved in terminal drought stress. Poster und Abstract 9. PlantGEM 2011 Istanbul.

Schweizer G, Diethelm M, Halaweh B, Reichenberger G, Herz M (2011): Klimatoleranz bei Gerste – ein biotechnologischer Ansatz zur Ertragssicherung. Schriftenreihe der LfL 6\_2011 S. 17-36, ISSN 1611-4159, Klimaänderung in Bayern, LfL Jahrestagung.

Schweizer G, Diethelm M, Halaweh B, Reichenberger G, Herz M (2011): Klimatoleranz bei Gerste – ein biotechnologischer Ansatz zur Ertragssicherung. Vortrag 19.10.2011: LfL Jahrestagung/Schafhof: Klimaänderung in Bayern,.

Freising, den 17.04.2012

Dr. Günther Schweizer  
Projektleiter

Dr. Peter Doleschel  
Institutsleiter IPZ