

Schlussbericht

ZE: GenXPro GmbH

Förderkennzeichen: 0313997A

Vorhabenbezeichnung: **ERA-Net Plant Genomics – Verbundvorhaben: Nutzung genetischer Vielfalt in Resistenzgenen der wichtigsten essbaren Hülsenfrüchte zur Verbesserung von Sorten für die nachhaltige Landwirtschaft (LEGRESIST)**

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2007 – 30.04.2010 (Verlängerung bis 30.10.2010)

I. Kurze Darstellung zu

1 Aufgabenstellung

Das generelle Ziel des Projekts orientierte sich an den Vorgaben des EA-PG-Calls (s.u.) und zielte darauf ab, die in der EU sträflich vernachlässigten Leguminosen gegenüber den importierten Sojaprodukten wirtschaftlich konkurrenzfähiger zu machen. Das Projekt widmete sich dabei insbesondere der Anfälligkeit der Leguminosen gegen Pilzpathogene als ein wichtiger Grund für die unbefriedigende Nutzung dieser ansonsten so landwirtschaftlich so nützlichen Pflanzenfamilie.

Die Ziele des Teilprojekts der GenXPro im Rahmen des LEGRESIST-Projekts sind im Antrag wie folgt beschrieben:

- Objective 2: Understanding quantitative tolerance to pathogens:
Hier sollten minimal 100 bis 200 bei allen Leguminosen gleichermaßen durch Pathogen-Befall regulierte Gene identifiziert und werden. Diese sollten dann die Grundlage für einen für alle Leguminosen verwendbaren „LEGU-Biotic-Stress-Array“ (Objective 3) bilden
- Objective 3: Advanced tools for molecular resistance breeding:
Neben dem erwähnten Stress-spezifischen Genexpressions-Array sollte für jede Leguminosen ein *polydimensionaler* SNP-Array produziert werden. Grundlage des Arrays sollte die allelische Diversität aller exprimierten potentiellen Resistenzgene bilden. Diese allelische Diversität sollte durch Sequenzierung von Resistenzgen-Kandidaten ermittelt werden, die durch PCR aus dem cDNA-Gemisch infizierter Pflanzen gewonnen werden sollten. Die SNP-Arrays sollten dann von den im Projekt beteiligten Züchtern für die genetische Kartierung von Resistenzgenen genutzt und so evaluiert werden.
- Objective 4: Applicants trained in use of advanced molecular tools for breeding
Ein weiteres wichtiges Ziel war es, die Züchter mit den von den Technologie-Providern angebotenen Technologien vertraut zu machen, sie in deren Nutzung für die wissenschaftsbasierte Züchtung zu schulen und sie so als potentielle Kunden für den Einsatz molekularbiologischer Methoden in der Pflanzenzüchtung zu gewinnen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Um die Objectives des Vorhabens erreichen zu können waren eine Reihe wissenschaftlicher, logistischer und technologischer Voraussetzungen nötig und vorhanden:

- Literaturvorgaben und eigene Vorarbeiten:
 - Eine Reihe von Publikationen anderer sowie Publikationen der Partner, die zeigten, dass
 - 1) viele Resistenzgene eine gemeinsame, konservierte Struktur haben

- 2) diese konservierten Strukturen zur Amplifikation von bestimmten, konservierten Bereichen aus den potentiellen Resistenzgenen genutzt werden können
- 3) die Resistenzgene genetisch kartiert werden können, wenn denn Polymorphismen in den amplifizierten Bereichen gefunden werden können
- 4) die kartierten Resistenzgene häufig mit den Resistenzen ko-segregieren und damit Resistenzgenandidaten darstellen bzw. als Marker für die Züchtung verwendet werden können.
- 5) durch SuperSAGE die differentielle Expression von Genen, die von Wirt als auch Pathogen stammen, gemessen werden kann (Arbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Kahl)
- 6) SuperSAGE-Ergebnisse sofort für die Herstellung eines sog. SuperSAGE-Genexpressions-Arrays genutzt werden können

- Bei den beteiligten Züchtern waren vorhanden:
 - Gut charakterisierte Isolate der verschiedenen, für die fragliche Leguminose relevanten Pathogene, insbesondere Isolate der allen gemeinsamen Pilzpathogene aus der Familie Ascochyta
 - gut auf ihre Resistenz bzw. Anfälligkeit auf verschiedene Pathogene charakterisierte Linien der verschiedenen Leguminosen
 - Gut charakterisierte Populationen, die für die Resistenz segregieren
- Bei den Technologie-Providern Array-On und GenXPro GmbH waren verfügbar:
 - langjährige Erfahrung mit der Herstellung von Genexpressions- und SNP-Arrays
 - langjährige Erfahrung mit der Amplifikation ausgehend von spezifischen und unspezifischen Primern
 - Erfahrung mit der Handhabung von next-generation sequencing (454 Technologie) und Auswertung der Ergebnisse

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde von allen Partnern gemeinsam geplant. Der Ablauf allerdings wurde dadurch erschwert, dass nicht für alle Partner die beantragten Summen von den jeweiligen, nationalen Projektträgern zur Verfügung gestellt wurden. Insbesondere die französischen und spanischen Partner hatten darunter zu leiden. Als eine der Folgen davon, von denen auch die GenXPro betroffen war, konnten die im Projekt hergestellten Genexpressionsarrays lediglich in Pilotstudien an einer kleinen Zahl von Proben getestet werden.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- *Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden*

Die GenXpro stellte der Arbeitsgruppe Kahl die von ihr patentierte SuperSAGE-Technologie kostenlos für die Durchführung des Projekts zur Verfügung.

- *Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste*

Für die Literaturarbeit wurden die üblichen, öffentlich zugänglichen on-line Bibliotheken wie etwa die PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=pubmed>) des NCBI genutzt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Die notwendigen Sequenzierungen wurden bei der Firma SeqIt, Kaiserslautern, in Auftrag gegeben.

1. Eingehende Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit

Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele mit den erreichten Ergebnissen

Planziel	Erreichtes Ziel
<p>WP1:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anreicherung potentieller Resistenzgene durch semispezifische Amplifikation ausgehend von konservierten Regionen bekannter Resistenzgene - Identifikation der allelischen Diversität in allen potentiellen Resistenzgenen der verschiedenen Leguminosen durch „next-generation sequencing“ 	<p>WP1:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anreicherung nur partiell gelungen, stattdessen Anreicherung von „pathogenesis-related“ Transkripten - Wegen Problemen in 1. wurde hauptsächlich die allelische Diversität in „pathogenesis-related“ Transkripten erfasst. Dennoch erfolgreich, weil damit eine große Zahl neuer SNPs/Indels identifiziert wurde.
<p>WP2:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Selektion von SNPs für Array-On-SNP-Array - Herstellung des Arrays und Test - Verwendung des Arrays für die genetische Kartierung 	<p>WP2:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Selektion von SNPs erfolgreich. Verspätung durch Probleme bei der Auswahl einer geeigneten Software - Wurde nicht durchgeführt, weil Array-On insolvent wurde - Genetische Kartierung der Allele durch die Züchter jetzt auf konventionellem Wege als CAPS/dCAPS-Marker
<p>WP 3:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SuperSAGE-Analyse der Transkriptome der verschiedenen Leguminosen nach Infektion mit Pilzpathogenen des Genus Ascochyta (AG Kahl) - Identifikation von allgemeinen und Spezies-spezifischen Antworten auf den Pathogenbefall (AG Kahl, GenXPro) 	<p>WP3:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SuperSAGE-Analyse ausgesprochen erfolgreich. - Hunderte von allgemein- und Spezies-spezifische reagierenden, z.T vollständig unbekanntem Transkripten identifiziert und Gene Ontology-Kategorien zugeordnet
<p>WP4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Selektion von informativen SuperTags und Herstellung von LEGU-Biotic-Genexpressions-Arrays (GenXPro, Array-On). - Test der Arrays für dieselben Linien, die für die SuperSAGE-Experimente verwendet worden waren. (GenXPro, Array-On) - Verwendung der Arrays für eQTL-Kartierung 	<p>WP4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Für Vicia, Kichererbse und Linse Pilot-Genexpressionsarrays mit ca. 5000 informativen und Kontroll-Transkripten hergestellt. - Test der Arrays sehr erfolgreich: Übereinstimmung mit den SuperSAGE-Daten Kichererbse: ca. 80% Linse und Vicia ca. 60% - Nicht durchgeführt, da Streichung der Mittel für die spanischen Partner
<p>WP5:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vergleichende Kartierung von SNPs in potentiellen Resistenzgenen durch Verwendung der Array-On SNP-Arrays 	<p>WP5:</p> <ul style="list-style-type: none"> - nicht durchgeführt, weil die Arrays in WP2 nicht hergestellt werden konnten.

der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises und Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wie aus der unten gelisteten Tabelle ersichtlich ist, überstiegen die Gesamtkosten des Vorhabens die geplanten Kosten um 7,3%, i.e. um 32.701, 00€.

Posten	Vorkalkulation	Nachkalkulation	Abweichung (€)	Abweichung (%)
Material	22.925,00	35.075,00	+12.150,00	+52,9
Personalkosten	360.106,00	387.334,00	+27.228,00	+7,5
Reisekosten	15.300,00	13.838,00	#1.462,00	#9,6

Sonstige unmittelbare Vorhabenskosten (Sequenzierdienstleistungen)	48.040,00	42.824,00	#5.216,00	#10,9
Summe	446.371,00	479.072,00		
Abweichung (Fehlbetrag)			#32.701,00	#7,3

Die größte Abweichung von der Planung zeigen dabei die Personalkosten, die bedingt durch die notwendige Verlängerung des Projekts sowie durch die in den Zwischenberichten dargelegten Schwierigkeiten bei der spezifischen Amplifikation potentieller Resistenzgene, die auch nicht vollständig gelöst werden konnten, etwa 27.000€ über dem Ansatz liegen. Die prozentual höchste Abweichung von mehr als 50% ergab sich bei den Materialkosten, die ca. 12.000€ über der Planung lagen. Auch hier schlagen die vielen Fehlversuche zur Produktion spezifischer Resistenzgen-Amplifikate zu Buche. Die übrigen Abweichungen vom Plan liegen mit etwa 10% im Rahmen eines wissenschaftlichen Projekts, in dem auch unvorhergesehene Ereignisse und Ergebnisse auftreten können.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Das wichtigste Ergebnis des Projekt war sicherlich die erstmalige Nutzung von Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken der zweiten Generation für die Züchtung von Leguminosen. Die als direkte Anwender der Ergebnisse am Projekt beteiligten Züchter haben bereits begonnen, auf eigene Kosten und in Kooperation mit der GenXPro diese Methoden für weitere Fragestellungen einzusetzen und damit zur Steigerung des Umsatze der Firma beigetragen. Durch die geplanten Publikationen wird das Projekt die Kompetenz der GenXPro in diesem Bereich weltweit werbewirksam demonstrieren, so dass sie ihre Fähigkeiten in der Pflanzenzüchtung zum Nutzen der Züchter auch anderweitig einsetzen und daraus wirtschaftlichen Nutzen ziehen kann.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Angeregt durch das LEGRESIST-Projekt haben wir ein Konzept zur Next-Generation-Sequencing basierten gleichzeitigen und schnellen Identifikation von mehreren tausend Polymorphismen (SNPs, InDels) in Kulturarten entwickelt. Das Konzept, wurde inzwischen durch die amerikanische Firma Floragenex unter dem Namen „Restriction-site Associated DNA Sequencing (RAD-Seq) publiziert. In dem vom BMELV geförderten RETROLO-Projekt verwenden wir es für die schnelle Einkreuzung von pyramidierten Resistenzgenen aus Wildarten in Kultivare der Gattung *Lolium*. Neben der schnellen Erstellung von hochdichten genetischen Karten und der Bestimmung der genetischen Diversität bei allen Organismen eignet es sich weiterhin für alle Anwendungen, bei der die Identifikation einer großen Zahl von Polymorphismen eine Rolle spielt. Die Technik wird bereits jetzt von Züchtern stark nachgefragt.

Außerdem haben wir, unter anderem bedingt durch die Erfahrungen, die wir im LEGRESIST-Projekt gesammelt haben, ein weiteres, neues Konzept entwickelt, dass sich auch zur schnellen Isolation von Pathogen-Resistenzgenen eignen sollte. Getestet wird das Verfahren, das noch den Arbeitsnahmen „Bulked Extrêmes Digital Gene Expression Profiling“ (BE-STDGE) trägt, zurzeit mit den spanischen Partnern von ITACyL. Dabei sollen dem QTL für züchterisch weit schwieriger zu bearbeitende abiotische Stressoren (Trockenheit/Kälte) identifiziert werden. Das Konzept wurde bereits international (Plant GEM, Lissabon, 2009; Green Breeding, Wien 2010) und national (GABI Statusseminar 2010, ohne Abstract) und auf der GPZ-Tagung in Weihenstephan im März 2010 vorgestellt und fand dort viel Beachtung. Das Konzept wird zurzeit in einem von der IGSTC geförderten Kooperationsprojekt mit indischen Partner für die Identifikation von wesentlichen genetischen Faktoren der Trockenresistenz bei der Kichererbse verwendet. Weiterhin wird das Konzept in dem vom BMELV-Innovationsförderungsprogramm teilfinanzierten Projekt „RETROLO: Integration innovativer Methoden zur Resistenzpyramidierung und Charakterisierung von Trockentoleranz in der Gattung *Lolium* mit dem Ziel der Entwicklung klimaangepasster Futterpflanzensorten“ angewandt.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11.

Es sind insgesamt 6 Publikationen geplant. Die Publikation der Ergebnisse obliegt den einzelnen Partnern, die dafür z.T. bereits Verantwortliche benannt haben (siehe dazu der Bericht über den finalen LEGRESIST-Workshop am 12 und 13. Juli in Frankfurt, in Anlage beigefügt)

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN entfällt	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel ERA-Net Plant Genomics – Verbundvorhaben: Nutzung genetischer Vielfalt in Resistenzgenen der wichtigsten essbaren Hülsenfrüchte zur Verbesserung von Sorten für die nachhaltige Landwirtschaft (LEGRESIST)	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Winter, Peter	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.10.2010
	6. Veröffentlichungsdatum entfällt
	7. Form der Publikation Bericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) GenXPro GmbH, Altenhöferallee 3 60438 Frankfurt am Main	9. Ber. Nr. Durchführende Institution entfällt
	10. Förderkennzeichen 0313997A
	11. Seitenzahl 9
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 0
	14. Tabellen 2
	15. Abbildungen 0
16. Zusätzliche Angaben entfällt	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Projektträger Jülich, Fr. Dr. Saeglitz, via e-mail vom 28.04.2011	
18. Kurzfassung Das generelle Ziel des Projekts war es, die in der EU sträflich vernachlässigten Leguminosen gegenüber den importierten Sojaprodukten wirtschaftlich konkurrenzfähiger zu machen. Das Projekt widmete sich dabei insbesondere der Anfälligkeit der Leguminosen gegen Pilzpathogene als ein wichtiger Grund für die unbefriedigende Nutzung dieser ansonsten landwirtschaftlich so nützlichen Pflanzenfamilie. Die Ziele des Teilprojekts der GenXPro im Rahmen des LEGRESIST-Projekts sind im Antrag detailliert beschrieben. Im Projekt wurden folgende Ziele erreicht: 1) Es wurden von jeder Europa-weit wichtigen Leguminose mehrere hundert verschiedene potentielle Resistenz- und „Pathogenese-responsive“ Gene erhalten und deren genetische Variabilität in züchterisch relevanten resistenten und anfälligen Linien durch NGS-basierte Methoden bestimmt. 2) Die Korrelation dieser Gene mit der Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber einer Familie von für alle Leguminosen wichtigen Pilzpathogene wurde durch genomweite Transkriptomprofilierung mit dem SuperSAGE-Verfahren (AG Kahl, Universität Frankfurt) bewiesen. 3) Die Sequenzen dieser und mehrerer Tausend anderer Stress-responsiver und invariabel exprimierter Gene wurde für die Herstellung von Spezies-spezifischen Genexpressionsarrays verwendet und diese evaluiert. Die mit den besten Arrays erzielten Ergebnisse zeigten mehr als 80% Übereinstimmung mit den SuperSAGE-Daten. 4) Die Arrays sowie die in den potentiellen Resistenzgenen detektierten Polymorphismen, die zurzeit von den verschiedenen Projektpartnern genetisch kartiert werden, stehen nun für die züchterische Verbesserung der Leguminosen zur Verfügung. 5) Durch das Projekt wurden die am Projekt beteiligten Leguminosenzüchter mit modernen Methoden der Pflanzenzüchtung vertraut und arbeiten weiterhin eng mit der GenXPro zusammen. Das Projekt leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Pathogenese-Mechanismen bei Leguminosen und erleichtert ihre Züchtung im Rahmen einer nachhaltigen Landwirtschaft.	

19. Schlagwörter Leguminosen, Resistenzgene, Genetische Diversität, Genexpressions-Array	
20. Verlag entfällt	21. Preis entfällt