

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

B I O L O G I E

Forschungsvorhaben: GABI-FUTURE-Verbundvorhaben: „GABI-TILL: Expansion and use of the GABI-TILLING platform for crop gene function analysis (GABI-TILL)“
(Teilprojekt Roggen)

Förderkennzeichen: 0315052 F

Zuwendungsempfänger: Technische Universität München

Ausführende Stelle: Technische Universität München - Wissenschaftszentrum Weihenstephan -
Forschungsdepartment für Pflanzenwissenschaften – Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, 85354 Freising

Projektleitung: Dr. Eva Bauer

Laufzeit: 01.10.2007 – 30.09.2011

„Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315063A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor“.

I. KURZDARSTELLUNG

1. Aufgabenstellung
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
3. Planung und Ablauf des Vorhabens
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

II. EINGEHENDE DARSTELLUNG

1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse
2. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit
4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse
5. Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen
6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

III. ERFOLGSKONTROLLBERICHT

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen
2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen
3. Fortschreibung des Verwertungsplans
4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben
5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer - z.B. Anwenderkonferenzen
6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

I. KURZDARSTELLUNG

1. Aufgabenstellung

Das GABI-TILL Konsortium setzte sich zum Ziel, die TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) Technologie (McCallum et al. 2000) im Hinblick auf ein vertieftes Verständnis der Funktion wichtiger Gene in ausgewählten Kulturpflanzenarten Deutschlands und Europas zu nutzen und weiter zu entwickeln. ‚Reverse genetics‘ Verfahren kombinieren chemische Mutagenese mit einem PCR gestützten Screening auf Mutationen in relevanten Genen, um schließlich neue, mutante Allele identifizieren zu können. Anhand dieser Allele lässt sich die Bedeutung der Kandidatengene für Merkmale von agronomischer und kommerzieller Bedeutung bemessen. Im Projekt waren TILLING-Arbeitsgruppen miteinander vernetzt, die (i) über sehr große Erfahrung mit der Referenz-Spezies Arabidopsis verfügen, (ii) die Expertise mit den landwirtschaftlichen Modell-Arten Gerste und Zuckerrübe einbringen und schließlich solchen, die (iii) neue, agronomisch bedeutende Arten für die TILLING-Technologie erschließen. Die gemeinsam erarbeitete TILLING-Plattform soll der am Pflanzen-Genom forschenden Wissenschaftsgemeinde in breiter Form zugänglich gemacht werden.

Die Hauptaufgabe für den Projektpartner der Technischen Universität München (TUM) im Teilprojekt Roggen war die molekulare Charakterisierung einer TILLING-Population bei Winterroggen. Da sich die Erzeugung einer solchen Population in Roggen als äußerst schwierig erwies wurde parallel ein Eco-TILLING Ansatz verfolgt.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Verbundprojekt integriert die umfangreiche Expertise von Projektpartnern aus akademischen Forschungseinrichtungen und der Industrie. Jeder Partner verfügt über eine spezielle Kompetenz und Erfahrung, die zur Durchführung der jeweiligen Projektaufgaben notwendig ist. Die unmittelbare Übertragung aller Forschungserkenntnisse für die praktische Anwendung wurde durch die Einbindung der Wirtschaftspartner in allen Projektphasen garantiert. Der Projektfortschritt wurde in regelmäßigen Projektmeetings und Berichten dokumentiert. Im Teilprojekt Roggen haben insbesondere die Partner von KWS-LOCHOW, IPK Gatersleben und TUM zusammengearbeitet. Methodisch erfolgte ein intensiver Austausch mit allen Projektpartnern des Verbundes.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Innerhalb des Projektes sind Planung und Ablauf durch einen Balkenplan beschrieben, aus dem die Aufgaben der Projektpartner IPK (P2), TUM (P6) und KWS-LOCHOW (P7) während des Bewilligungszeitraums hervorgehen (Tab 1).

Tabelle 1: Ursprüngliche Planung des Projektablaufs. Arbeiten während des Bewilligungszeitraums sind in gelb (IPK), blau (TUM) und grün (KWS-LOCHOW), Arbeiten außerhalb des ursprünglichen Bewilligungszeitraums in hellen Farben dargestellt.

	2007						2008				2009				2010				2011		
	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	
P2-WP5	Yellow				Yellow					Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow					
P6-WP1		Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue												
P6-WP2									Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue							
P6-WP3						Blue	Blue	Blue	Blue												
P6-WP4									Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
P6-WP5											Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
P7-WP1		Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green												
P7-WP2									Green	Green	Green	Green	Green	Green							
P7-WP3													Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

Legend:
 P2, IPK Gatersleben = funding phase
 P6, TUM = pre-/post-project phase
 P7, KWS LOCHOW

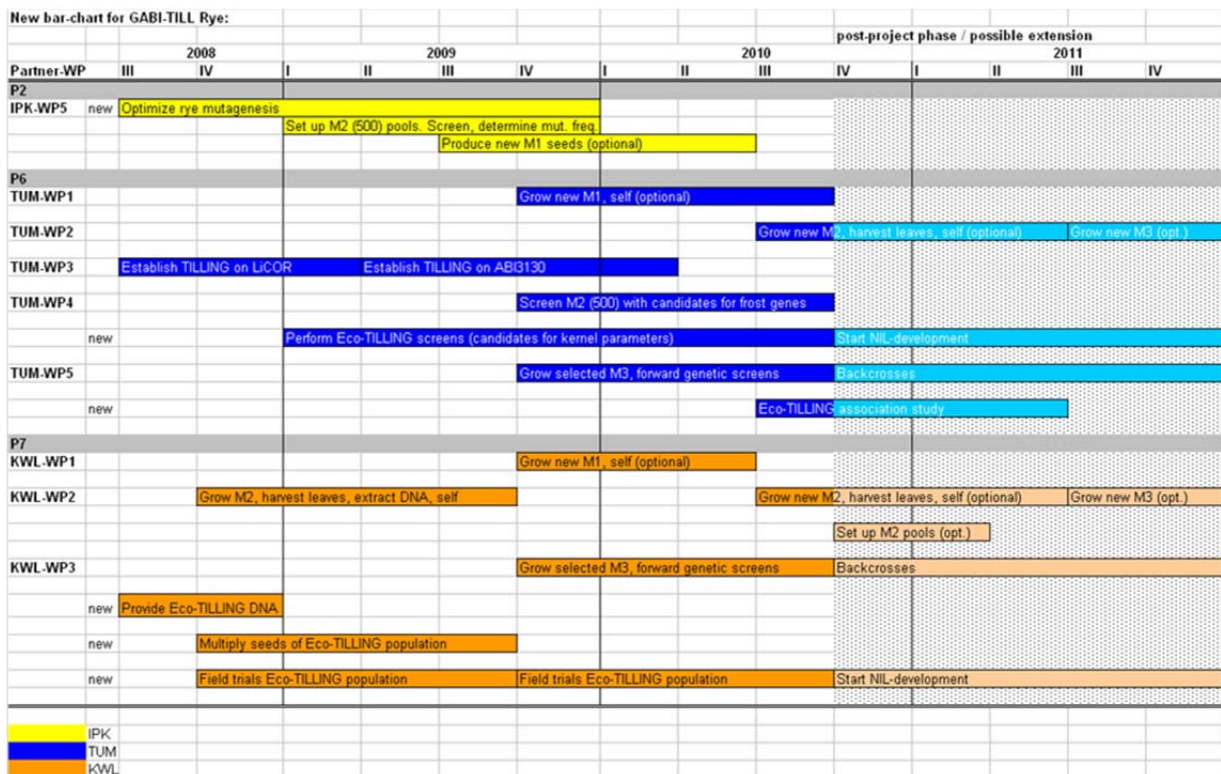
Der ursprünglich eingereichte Balkenplan wurde durch Änderungen im Projektablauf (siehe geänderte Vorhabenbeschreibung) modifiziert (Tab. 2). In allen WP musste die ursprünglich geplante Vorgehensweise in erheblichem Umfang geändert werden, da nicht vorhersehbare Probleme bei der Erstellung der umfangreichen TILLING-Population eintraten. Mutagenese-Protokolle mit EMS, die sich bei Gerste als sehr erfolgreich erwiesen hatten, führten bei den Roggen-Inzuchtlinien zu einer sehr hohen Mortalität und bei den überlebenden Pflanzen zu drastischen Reduzierung der weiblichen und männlichen Fertilität.

Der geplante Umfang der TILLING-Population von ca. 10.000 M2-Pflanzen konnte daher trotz intensivster Bemühungen auch in wiederholten Mutagenese-Experimenten nicht erreicht werden. Infolgedessen konnten auch die in WP2 und WP3 avisierten Ziele nicht realisiert werden.

In Absprache mit dem Projektträger haben die Projektpartner daher eine Änderung der Vorhabensbeschreibung vorgeschlagen. Wesentliche Änderungen ergaben sich insbesondere in den WP1, 2, 4 und 5 (Tab. 2). Teilweise entfielen vorgesehene Arbeiten bzw. die Arbeiten fanden in nur reduziertem Umfang statt. Im Gegenzug wurden jedoch in erheblichem Umfang zusätzliche, ursprünglich nicht vorgesehene Arbeiten auf genetischer

Ebene (Eco-TILLING Ansatz) durchgeführt. Für den Eco-TILLING Ansatz wurden die in GABI RYE-FROST entwickelten Populationen verwendet. Die hier entwickelten Inzuchtlinien wurden in den Jahren 2009 und 2010 von KWS-LOCHOW an den beiden Standorten Bergen (Niedersachsen) und Petkus (Brandenburg) mit jeweils 2 Wiederholungen angebaut. Erfasst wurden an den Parzellen agronomische Merkmale wie z. B. Standfestigkeit und Tausendkornmasse bzw. Qualitätseigenschaften wie die für die Eignung als Brotroggen relevante Fallzahl. Durch den Projektpartner TUM sollte im Rahmen des Eco-TILLING die Variabilität von Genen untersucht werden, die Kornmerkmale und andere agronomisch wichtige Eigenschaften in Roggen beeinflussen.

Tabelle 2: Neue Planung des Projektablaufs. Arbeiten während des Bewilligungszeitraums sind in gelb (IPK), blau (TUM) und orange (TUM), Arbeiten während der Projektverlängerung in hellen Farben dargestellt.



Aufgrund der Verzögerungen zur Entwicklung einer TILLING Population und durch Schwierigkeiten beim Eco-TILLING konnten die ursprünglichen Ziele jedoch nur teilweise erreicht werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das GABI-TILL Projekt war als zentrale Plattform konzipiert, auf der existierendes Wissen aus Untersuchungen an Modell-Spezies auf agronomisch wichtige Pflanzenarten angewendet und weiterentwickelt werden kann. Basis-Elemente der Technologie, die zunächst an *A. thaliana* experimentell erprobt worden sind, sind z.B. Pooling-Strategie, Detektion von Mismatches oder Hochdurchsatz-Prozeduren. Diese konnten damit direkt für die Arten verfügbar gemacht werden, die Gegenstand des Projektes waren.

So strebte z. B. die TILLING-Gruppe bei Zuckerrübe an, Mutationen in einer größeren Anzahl von Genen zu identifizieren, die als wesentliche genetische Faktoren im Hinblick auf Merkmale wie Krankheitsresistenz, Vernalisationsbedarf und Schoß- bzw. Blühinduktion gelten können. Bei Gerste waren 16 Gene Gegenstand der Untersuchungen, die in der Samenbildung bzw. an deren Metabolismus beteiligt sind. In analoger Weise konnte auch aus den TILLING-Aktivitäten bei Roggen erwartet werden, dass diese Auswirkungen auf die praktische Züchtungsarbeit zeitigen und Anstoß zu weiteren Forschungsarbeiten geben werden. Bei Kartoffel können neue durch die TILLING-Technologie eingeführte Allele, wie z.B. solche die den Gehalt an antinutritiven Glycoalkaloiden absenken, wesentlich zur Erweiterung der genetischen Diversität beitragen. Im Gegensatz zur Nutzung von Wildformen kann diese Erweiterung auf dem Niveau von adaptierten und hochleistungsfähigen Geniteuren aufsetzen und damit den Züchtungsprozess erheblich beschleunigen.

Dank der Unterstützung durch PLA für GABI konnte ein umfassender Überblick zur aktuellen Patentsituation gewonnen werden. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, die im Projekt erarbeiteten Ergebnisse sowie die hier erstellten pflanzengenetischen Ressourcen rasch und effizient kommerziell nutzen zu können. Teil des Konsortiums sind drei pflanzenzüchterische KMU und ein Biotechnologie-Unternehmen. Damit ist gewährleistet, dass die industriellen Partner Ressourcen und Ergebnisse für die Identifikation nützlicher Mutationen nutzen und diese unmittelbar in ihre Züchtungsprogramme einfließen lassen können. Im Rahmen von Workshops, Status-Seminaren und anderen Veranstaltungen wird das erarbeitete TILLING Know-how breiten Kreisen von Academia, WPG Mitgliedern und Wirtschaft zugänglich gemacht.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zur Realisierung des Gesamtzieles umfasste das Verbundprojekt ein Netzwerk von Arbeitsgruppen und Einrichtungen mit komplementärer Expertise in der Genomforschung sowie der praktischen Züchtung der wichtigsten Kulturarten. Während des gesamten Projektzeitraumes war eine sehr enge Zusammenarbeit zwischen den Teilprojekten gewährleistet, z.B. durch regelmäßige Treffen und stetigen Kontakt wurden Arbeitsprogramme aufeinander abgestimmt. Zwischen den Verbundpartnern gab es alternierende halbjährliche Projekttreffen. Sie dienten zu Kooperationsabsprachen und -entscheidungen, dem Erfahrungs- und Datenaustausch sowie der gemeinsamen Vorbereitung von Publikationen.

Kooperation zwischen GABI-TILL Partnern:

Der Verlauf des Projektes GABI-TILL zeichnete sich durch eine enge Zusammenarbeit der Konsortiumspartner bei der Entwicklung und Etablierung der jeweiligen TILLING Plattformen aus. Dies manifestierte sich in regelmäßigen Projekttreffen sowie in der Durchführung eines internationalen Workshops zum aktuellen Stand der Technologie sowie der Entwicklung internationaler TILLING-Plattformen in Modell- und Kulturpflanzenarten. Ein sehr effizienter Know-how Transfer hat von der Modellpflanze *Arabidopsis* zu den Kulturarten stattgefunden – in Gerste wurde u.a. sehr effizient das 2D Pooling-System übernommen, das in Potsdam für die Analysen in *Arabidopsis* entwickelt worden war. Diese Form der Zusammenarbeit wurde in GABI-FUTURE fortgeführt und intensiviert. Im Bereich der Getreide fungierte nunmehr die Gerste als Modellplattform für die Neu-Etablierung bzw. Weiterentwicklung vergleichbarer Ressourcen in Roggen und Weizen. In dem Teilprojekt Roggen kam es zu einer direkten Vernetzung mit dem Gerste-Projekt, weil wichtige Aspekte (Mutagenese, Heteroduplex-Analyse) direkt durch die Gerste-Plattform (P2) bearbeitet, die Spezies-spezifischen Besonderheiten bei der Bearbeitung des Pflanzenmaterials aber durch die Projektpartner (P6, P7) mit der höchsten Erfahrung im Umgang mit Roggen abgedeckt werden. Das GABI-FUTURE Projekt diente im Bereich der Triticeae zur direkten Vernetzung bereits geförderter Projekte. Dies bezieht sich auf die Arbeiten zur Entwicklung einer Weizen TILLING Ressource (P8), die im Rahmen des Projektes GABI-Kanada erstellt und finanziert wurde. Die thematische Vernetzung der drei Plattformen für Gerste, Roggen und Weizen unter dem Dach von GABI Future gewährleistet den effizienten wissenschaftlichen Austausch sowie die Erkennung von Synergien. Die Vernetzung der Arbeiten zu diesen drei wichtigen Kulturarten hat dazu beigetragen, das Interesse seitens der Züchtungsindustrie zu vergrößern, die sich in Teilprojekten (Roggen) bereits direkt beteiligt hat, was langfristig zu einer intensivierten Nutzung der Ressourcen führen wird.

Innerhalb des gesamten Konsortiums arbeiten Gruppen zusammen, die sich einerseits der Verbesserung von Methoden verschrieben haben und die zum anderen spezifische Expertise für die jeweilig bearbeiteten Kulturpflanzen besitzen. Dies hat sehr stark befördert, dass neue Entwicklungen schnell in den verschiedenen Teilprojekten aufgegriffen und angewendet werden konnten.

Alle GABI-TILL Partner konnten für das Management von TILLING-Aufträgen, die Internet-Präsentation des Konsortiums, die Verwaltung von Ressourcen und die Darstellung von Resultaten auf eine gemeinsame IT-Plattform zurückgreifen, die im Rahmen des laufenden GABI Projektes erstellt und vorbereitet worden ist (GABI-TILL-DB, <http://www.gabi-till.de/>).

Die Koordination des Verbundprojekts GABI RYE-EXPRESS durch TUM gewährleistete die enge Vernetzung mit anderen Roggenprojekten im Rahmen von GABI-FUTURE (GABI RYE-FROST, GABI-TILL / Teilprojekt Roggen). Im Bewilligungszeitraum konnte die gewonnene Sequenzinformation für den Fortgang der Projekte GABI-TILL und GABI RYE-FROST genutzt werden.

II. EINGEHENDE DARSTELLUNG

1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse

TILLING in Roggen:

Ziel des Vorhabens war die Identifizierung vorteilhafter Allele für agronomisch wichtige Merkmale in Roggen unter Verwendung eines TILLING-Ansatzes. Ausgangspunkt für die Mutagenese von Roggen mithilfe von Ethylmethansulfonat (EMS) war die Roggeninzuchtlinie HOH-IL2035. Wie im Bericht des Projektpartners KWS-LOCHOW dargestellt, waren erste Versuche unter Verwendung der für Gerste etablierten Mutageneseprotokolle auch mit weiteren Inzuchtlinien nicht erfolgreich, da zum einen die Mortalitätsrate der M1 Pflanzen sehr hoch war und zum anderen bei den überlebenden Pflanzen die weibliche und männliche Fertilität sehr stark gestört war, so dass kaum M2 Körner für weitere Analysen geerntet werden konnten. In weiteren Versuchen bei den Projektpartnern IPK Gatersleben und KWS LOCHOW wurden die Mutageneseprotokolle optimiert. Die Mutationsrate der erhaltenen M2 Linien sollte beim Projektpartner IPK Gatersleben bestimmt werden, um die Effizienz der Mutageneseprotokolle zu bestimmen.

Im Rahmen der von TILLING-Analysen an der TUM wurde ein Protokoll zum Nachweis von Mutationen auf einem LiCOR DNA Sequencer etabliert. Hierzu wurde ein Panel von 45 Roggen Inzuchtlinien verwendet. Die DNA aller Inzuchtlinien wurde im Verhältnis 1:1 mit der DNA der Linie Lo152 (Referenzlinie) gemischt, um im Falle von heterozygoten Mutationen DNA-Mismatches detektieren zu können. Es zeigte sich, dass in den Gelbildern mit einem sehr hohen unspezifischen Hintergrund zu kämpfen war. Teilweise lässt sich dies dadurch erklären, dass die verwendeten Inzuchtlinien nicht komplett homozygote reine Linien waren und dadurch im Hintergrund weitere Mutationen detektiert wurden. Da im Laufe des Projektes die Strategie hin zum Eco-TILLING geändert wurde, wurden die Protokolle nicht mehr weiter optimiert.

Eco-TILLING in Roggen:

Material:

Aufgrund der Probleme mit der klassischen EMS Mutagenese wurde alternativ von den Projektpartnern TUM und KWS LOCHOW ein Eco-TILLING Ansatz verfolgt. Zur Verfügung standen 20 1 S₀-/S₁-Linien aus dem Projekt GABI RYE-FROST. Diese Pflanzen repräsentieren jeweils einen Gameten aus einer von fünf sehr diversen ost- bzw. mitteleuropäischen Roggenpopulationen, jeweils kombiniert mit der Linie Lo152. Für molekulare Untersuchungen wurde die DNA der S₀ Pflanzen verwendet. Zur Erfassung der Phänotypen durch den Projektpartner KWS LOCHOW wurden S₁-Linien bzw. daraus durch

weitere Selbstung erhaltene S_2 -Linien verwendet, die auf jeweils einen Gameten der ost- bzw. mitteleuropäischen Populationen in Kombination mit der Linie Lo152 zurückgehen.

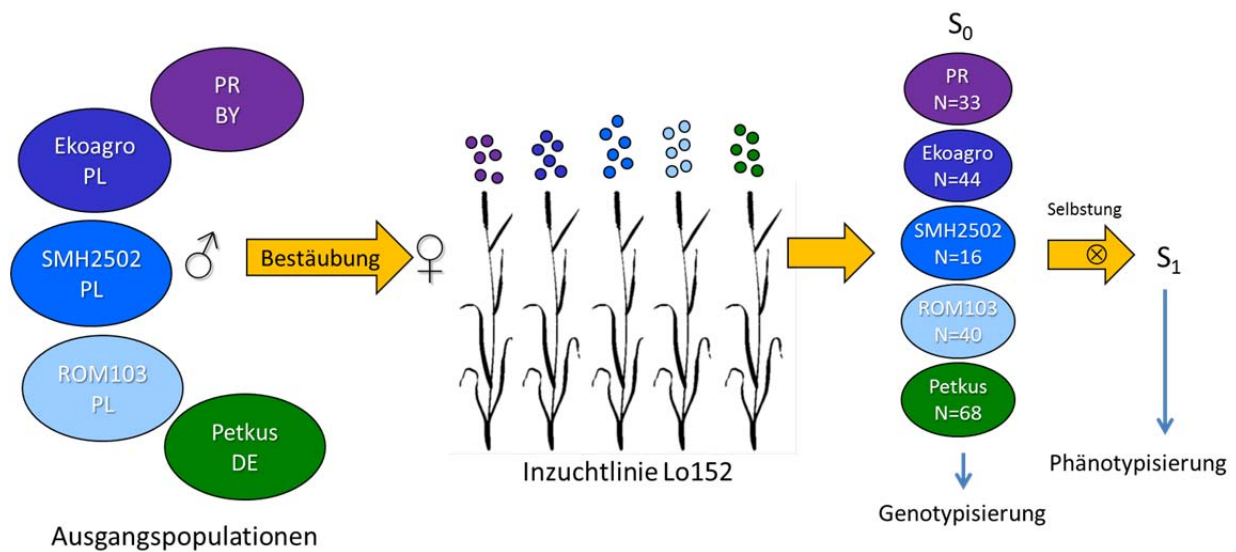


Abb. 1: Roggenpopulationen aus GABI RYE-FROST für Eco-TILLING Analysen. Fünf Ausgangspopulationen PR, Ekoagro, SMH2502, ROM103 und Petkus aus Weißrussland, Polen und Deutschland wurden zur Bestäubung der Inzuchtlinie 152 verwendet. Es wurden verschiedene Anzahlen von S_0 -Pflanzen erhalten, die weiter geselbstet wurden zu S_1 -Linien.

Auswahl von Kandidatengen:

Die Eco-TILLING-Strategie liefert Informationen über die natürliche allelische Variation für ausgewählte Kandidatengene. Als Kandidatengene sollten Gene untersucht werden, die z.B. in Reis, Gerste und Weizen wichtige agronomische Merkmale wie z.B. Ertragskomponenten (Tausendkorngewicht, Kornzahl, Korngröße) oder Auswuchstoleranz beeinflussen. In Tab. 3 sind die intensiver bearbeiteten Kandidatengene aufgelistet. Ausgangsbasis für das Design von Primersequenzen für die PCR waren jeweils die Sequenzen aus Reis oder, so weit vorhanden, Gerste und Weizen. Sofern in öffentlichen Datenbanken oder im Projekt GABI RYE-EXPRESS cDNA Sequenzen mit Homologie zu den Reisgenen gefunden wurde, wurde auch diese Information für das Primerdesign genutzt. In den meisten Fällen standen für Roggen jedoch keine oder nur sehr kurze roggen-spezifische Sequenzinformationen für die Entwicklung von Primerpaaren zur Verfügung.

Tabelle 3: Kandidatengene aus Reis, Gerste und Weizen für Eco-TILLING Analysen

Kandidatengen ^a	Referenz ^b	Mögliche Funktion in Reis	Amplifikation in Roggen	Hit in RYE-EXPRESS cDNA Sequenzen	Längstes Alignment (bp)
OsGIF1 / Hv_cwinv1	1	Kornfüllung und Kornertrag	Ja	Ja	614/688
OsGhd7	2	Kornzahl pro Rispe, Blühzeitpunkt, Wuchshöhe	Unspezifisch	Nein	-
OsGn1	3	Kornzahl	Nein	Nein	-
OsGS3	4	Korndicke und Korngewicht	Nein	Nein	-
OsGW2 / TaGW2	5,6	Korndicke und Korngewicht	Unspezifisch	Ja	381/400
OsDEP1	7	Kornzahl je Rispe und Kornertrag	Unspezifisch	Ja	85/90
TaVp1-B3	8	Auswuchstoleranz	Ja	n.d.	n.d.

a) Os: Sequenz aus Reis (*Oryza sativa*), Hv: Sequenz aus Gerste (*Hordeum vulgare*), Ta: Sequenz aus Weizen (*Triticum aestivum*)

b) Referenzen: 1) Wang et al. 2008, Nat Genet 40: 1370-1374; 2) Xue et al. 2008, Nat Genet 40: 761-767; 3) Ashikari et al. 2005, Science 309: 741-745; 4) Fan et al. 2006 Theor Appl Genet 112: 1164-1171; 5) Song et al. 2007, Nat Genet 39: 623-630; 6) Su et al. 2011, Theor Appl Genet 122:211-223; 7) Huang et al. 2009, Nat Genet 41: 494-497, 8) Xia et al. 2009, Euphytica 168:385-394

Ergebnisse zu Kandidatengenen:

Für alle untersuchten Gene wurden meist mehrere Primerpaare getestet und die PCR-Bedingungen optimiert. Erhaltene Amplifikationsprodukte wurden sequenziert, um zu prüfen, ob die Sequenz mit der des Kandidatengens aus Reis, Gerste oder Weizen übereinstimmte. In einigen Fällen war trotz Verwendung verschiedener Primersequenzen und Variation der PCR-Bedingungen kein spezifisches Produkt zu erhalten (*OsGn1*, *OsGS3*) oder die erhaltene Sequenz stimmte nicht mit der Zielsequenz überein (*OsGhd7*, *OsDEP1*). In anderen Fällen, wie *OsGW2* wurden in den erhaltenen Amplifikaten vor allem Ähnlichkeiten zu repetitiven Elementen festgestellt.

Für das Gen *OsGIF1* bzw. das entsprechende Homologe aus Gerste *Hv_cwinv1* wurde die komplette RYE-FROST Kollektion untersucht und auswertbare Sequenzinformation von 183 Linien über eine Länge von 695 bp erhalten. An sechs Positionen wurden Basenaustausche (SNPs) beobachtet sowie in einigen Linien eine Insertion von 10 bp. Insgesamt waren 16 unterschiedliche Haplotypen zu verzeichnen. Das Kopplungsphasenungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) in der untersuchten Sequenz war gering (Abb. 2).

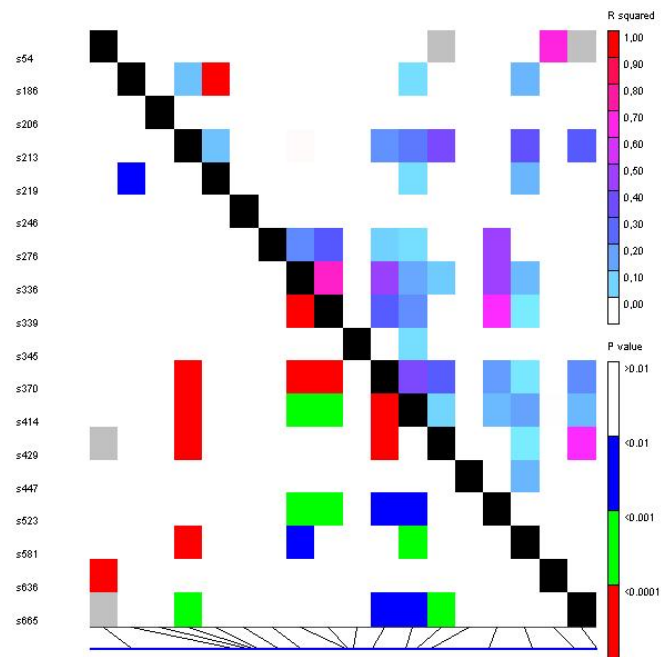


Abb. 2: Darstellung des Kopplungsphasenungleichgewichts (LD) für das Roggenhomologe zu *Hv_cwinw1*. Die schematisierte Sequenz mit Angabe polymorpher Basen ist unten dargestellt. Oberhalb der Diagonale ist als Maß für das LD der Wert für R^2 angegeben, unterhalb der Diagonale der entsprechende P-Wert.

Der Tajima D Wert lag bei -1,92505 und war signifikant ($P < 0,05$). Der negative Wert könnte auf positive Selektion in diesem Gen hindeuten. Zwei der SNPs an Position 414 und 636 traten mit einer Minorallelfrequenz (MAF) $> 0,05$ auf und wurden in einer genomweiten Assoziationsstudie auf Assoziation mit den phänotypisch erfassten Merkmalen Ährenschieben, Fallzahl, Tausendkorngewicht und Wuchshöhe untersucht (siehe unten).

Für das Roggenhomologe zum Gen *TaVp1-B3* aus Weizen wurden Primer entwickelt, die Längenpolymorphismen in der Kollektion detektierten. Insgesamt wurden drei Allele mit etwa 600 bp, 900 bp und 1200 bp beobachtet. Diese Polymorphismen wurden ebenfalls in die genomweite Assoziationsstudie einbezogen.

Beide Kandidatengene konnten in Roggen kartiert werden. Das Homologe zu *Hv_cwinw1* liegt auf Chromosom 2R, das Homologe zu *TaVp1-B3* auf Chromosom 3L.

Genomweite Assoziationsstudie:

Um festzustellen, inwieweit die untersuchten Kandidatengene mit den beobachteten Phänotypen korreliert sind wurde eine genomweite Assoziationsstudie mit der Software Tassel 3.0 (Bradbury et al. 2007) durchgeführt. Die Linien der RYE-FROST Kollektion

standen im den Jahren 2009 und 2010 an zwei Standorten mit zwei Wiederholungen im Beobachtungsanbau beim Partner KWS LOCHOW (siehe Bericht Projektpartner). Die Felddaten für die Merkmale Ährenschieben, Fallzahl, Tausendkorngewicht und Wuchshöhe wurden verrechnet und adjustierte Mittelwerte errechnet, die für die Assoziationsstudie verwendet wurden. Insgesamt gingen die Phänotypen von 204 Linien ein.

Weiterhin wurden 2177 genomweite SNPs des Rye5k SNP Arrays einbezogen, die im Rahmen des Projekts GABI RYE-EXPRESS entwickelt wurden (Haseneyer et al. 2011). Diese Auswahl an SNPs besteht aus vorgefilterten SNPs mit einer MAF > 0,05, einer maximalen Anzahl an Fehlwerten von 10% und bekannter Position in der genetischen Karte des Roggengenoms. Dazu kamen zwei SNPs aus dem Roggenhomologen zu *Hv_cwinw1* mit einer MAF > 0,05 sowie die Längenpolymorphismen aus dem Homologen zu *TaVp1-B3*. In einem generalisierten linearen Modell (GLM) mit fixen Effekten wurde neben Genotypen und Phänotypen noch die Populationsstruktur berücksichtigt, die basierend auf den genomweiten SNP-Markern eine wahrscheinliche Anzahl von K=4 Gruppen ergab. Die Berücksichtigung der Gruppen dient vor allem dem Ausschluss von falsch-positiven Assoziationen, die auf die Substruktur des Materials zurückzuführen sind.

In Abb. 3 sind Manhattan-Plots für die Merkmale Ährenschieben, Fallzahl, Tausendkorngewicht und Wuchshöhe dargestellt. Für einige Marker sind zwar bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$ Assoziationen mit dem jeweiligen Merkmal zu verzeichnen. Aufgrund der Vielzahl der Tests wurde jedoch eine Anhebung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni durchgeführt.

Für die Merkmale Fallzahl, Tausendkorngewicht und Wuchshöhe wurden weder für die genomweiten SNPs noch für die beiden Kandidatengene Assoziationen beobachtet, die die Signifikanzwerte nach Bonferroni-Korrektur von 4,6 ($P < 0,05$ Bonferroni korrigiert für 2180 Tests) bzw. 5,3 ($P < 0,01$ Bonferroni korrigiert für 2180 Tests) übersteigen. Für das Merkmal Ährenschieben wurde eine signifikante Assoziation auf Chromosom 4R beobachtet. *Vp1-B3* zeigt jedoch für Fallzahl zumindest bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,01$ eine mögliche Assoziation. Dies bietet einen Ausgangspunkt für weitere Studien um Marker für Auswuchstoleranz in Roggen zu entwickeln. In der gleichen Genomregion wurde von Myskow et al. (2010) ein QTL für Auswuchstoleranz in Roggen kartiert, was trotz des vergleichsweise niedrigen Signifikanzniveaus die Assoziation unterstützt.

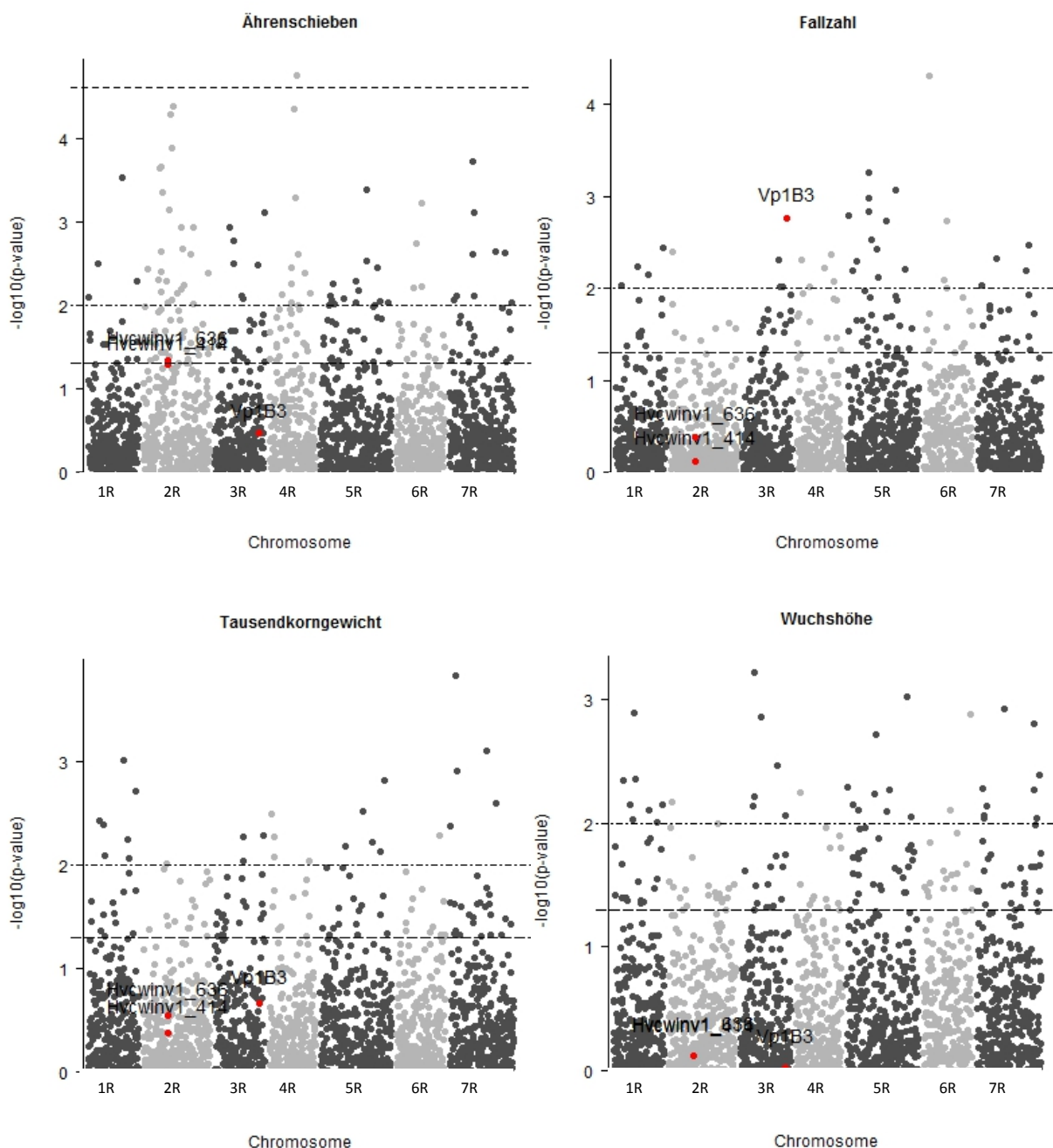


Abb. 3: Manhattan-Plots für Assoziationen der genomweiten SNP-Marker und der rot hervorgehobenen Kandidatengene *Hv_cwinv1* (2 SNPs) und *Vp1B3* in der RYE-FROST Kollektion mit den Merkmalen Ährenschieben, Fallzahl, Tausendkorngewicht und Wuchshöhe. Die mit gestrichelten Linien gekennzeichneten kritischen Werte für die auf der y-Achse dargestellten $-\log(P)$ Werte liegen bei 1,30 ($P < 0,05$), 2,0 ($P < 0,01$) und 4,6 ($P < 0,05$ Bonferroni korrigiert für 2180 Tests).

Ein ähnliches Bild für die genomweite Assoziationsstudie zeigte sich im Projekt GABI RYE-FROST, in dem Assoziationen mit Kandidatengenen für Frosttoleranz in der gleichen Kollektion untersucht wurden. Aufgrund der ausgeprägten Populationsstruktur wurden auch dort keine signifikanten Assoziationen zwischen Frosttoleranz und den untersuchten Kandidatengenen aufgedeckt.

Zusammenfassung und Ausblick:

Aufgrund der im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen immer noch limitierten Ressourcen für die Genomanalyse ist Roggen nach wie vor ein schwieriges Objekt. Aufgrund der hohen intraspezifischen Variation und der (noch) fehlenden umfangreichen Sequenzressourcen in Roggen ist die Entwicklung von spezifischen Primern für Kandidatengene nicht trivial. Die Ausgangssituation verbessert sich aber zunehmend, da im aktuellen Projekt RYE-SELECT weitere Ressourcen für genomische Sequenzen in Roggen geschaffen werden. Dies sollte in Zukunft auch kandidatengen-basierte Ansätze deutlich erleichtern.

Der TILLING-Ansatz in Roggen erwies sich als schwierig, da etablierte Protokolle aus Gerste wider Erwarten nicht ohne größere Optimierungsversuche übernommen werden konnten. Die alternative Eco-TILLING Strategie ist grundsätzlich geeignet, um die natürliche Variation in Roggen zu charakterisieren und Assoziationen zwischen Kandidatengenen und phänotypischen Merkmalen aufzudecken. Aufgrund der ausgeprägten Populationsstruktur im untersuchten Material waren nur wenige signifikante Assoziationen zu finden. Zukünftige Eco-TILLING Studien sollten sich daher auf Material mit geringerer Substruktur und idealerweise einer größeren Anzahl Linien konzentrieren. Für genomweite Assoziationsstudien ist außerdem eine größere Anzahl SNPs wünschenswert, gerade in einer Fruchtart wie Roggen, die sich durch hohe Diversität und ein geringes LD auszeichnet.

Literatur:

- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309:741-745
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635
- Fan C, Xing Y, Mao H, Lu T, Han B, Xu C, Li X, Zhang Q (2006) GS3 , a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet* 112:1164-1171
- Haseneyer G, Schmutzer T, Seidel M, Zhou R, Mascher M, Schon C-C, Taudien S, Scholz U, Stein N, Mayer K, Bauer E (2011) From RNA-seq to large-scale genotyping - genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). *BMC Plant Biology* 11:131
- Huang X, Qian Q, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, Xia G, Chu C, Li J, Fu X (2009) Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics* 41:494-497
- Myskow B, Stojalowski S, Milczarski P, Masojc P (2010) Mapping of sequence-specific markers and loci controlling preharvest sprouting and alpha-amylase activity in rye (*Secale cereale* L.) on the genetic map of an F-2 (S120xS76) population. *J Appl Genet* 51:283-287
- Song X-J, Huang W, Shi M, Zhu M-Z, Lin H-X (2007) A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics* 39:623-630
- Su Z, Hao C, Wang L, Dong Y, Zhang X (2011) Identification and development of a functional marker of *TaGW2* associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 122:211-223
- Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G, He Z (2008) Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics* 40:1370-1374
- Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G, He Z (2008) Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics* 40:1370-1374

Xia LQ, Yang Y, Ma YZ, Chen XM, He ZH, Roder MS, Jones HD, Shewry PR (2009) What can the *Viviparous-1* gene tell us about wheat pre-harvest sprouting? *Euphytica* 168:385-394

2. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Siehe Anlage „Verwendungsnachweis Mittel“

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die von der Technischen Universität München durchgeführten methodischen Untersuchungen zum TILLING und molekularen Analysen zum Eco-TILLING in Roggen konnten nur über die beantragten und bewilligten Projektmittel bewältigt werden. Die geleisteten Arbeiten waren notwendig und angemessen und haben zu verwertbaren Erkenntnissen und Ergebnissen geführt.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Der klassische TILLING Ansatz war in Roggen nicht wie geplant durchführbar. Die durchgeführten Experimente haben sehr deutlich die sensitive Reaktion von Roggen-Inzuchtlinien auf die Mutagenese gezeigt. Protokolle mit einer reduzierten Mortalitätsrate konnten in der letzten Projektphase beim Projektpartner IPK Gatersleben etabliert werden und befinden sich in der Auswertung in einer dem Projekt nachgelagerten Phase. Der Eco-TILLING Ansatz hat beim Projektpartner KWS-LOCHOW zu einer umfangreichen Phänotypisierung von genetisch hochgradig diversen mittel- und osteuropäischen Populationen geführt. Die Analyse von Kandidatengenen für Kornmerkmale in Roggen war für zwei Kandidatengene erfolgreich. Zwar wurden keine hochsignifikanten Assoziationen festgestellt, zumindest für das Gen Vp1-B3 bieten sich weitere Untersuchungen zur Verifikation der Ergebnisse an, die auch durch QTL-Studien anderer Arbeitsgruppen gestützt werden.

5. Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

- McKibbin RS, Wilkinson MD, Bailey PC, Flintham JE, Andrew LM, Lazzeri PA, Gale MD, Lenton JR, Holdsworth MJ (2002) Transcripts of *Vp-1* homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. PNAS 99:10203-10208
- Su Z, Hao C, Wang L, Dong Y, & Zhang X (2011) Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 122(1):211-223
- Xia LQ, Yang Y, Ma YZ, Chen XM, He ZH, Roder MS, Jones HD, Shewry PR (2009) What can the *Viviparous-1* gene tell us about wheat pre-harvest sprouting? Euphytica 168:385-394
- Yang Y, Ma YZ, Xu ZS, Chen XM, He ZH, Yu Z, Wilkinson M, Jones HD, Shewry PR, Xia LQ (2007) Isolation and characterization of *Viviparous-1* genes in wheat cultivars with distinct ABA sensitivity and pre-harvest sprouting tolerance. J Exp Botany 58:2863-2871

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Erfolgt:

- Altmann T, Bauer E, Breuer F, Gottwald S, Holtgräwe D, Jung C, Korzun V, Kraft T, Kugelmann E, Kumlehn J, Leckband G, Prüfer D, Schmolke M, Stein N, Stelling D, Tacke E, Weisshaar B (2009) TILL – bridge between model and crop plants. 9th GABI Statusseminar, March 3-5 2009, Berlin-Potsdam, Germany, L34
- Bauer E, Stein N, Scholz U, Mayer K, Haseneyer G, Li Y, Wilde P, Korzun V, Schön C-C (2008) The GABI RYE-Genomics Network. 8th GABI Statusseminar, March 4-6 2008, Berlin-Potsdam, Germany, P30
- Bauer E, Gottwald S, Haseneyer G, Korzun V, Li Y, Mayer K, Pietsch C, Scholz U, Schön C-C, Stein N, Wilde P (2008) The GABI RYE Genomics Network. Proceedings of the 2nd Workshop TritiGen COST Action FA0604. Sept 22-24 2008, Albena, Bulgaria, S04.1, p.93
- Bauer E, Gottwald S, Kalb O, Korzun V, Wilde P, Schmolke M, Stein N (2009) Recent and future TILLING activities in cereals / Triticeae. 9th GABI Statusseminar, March 3-5 2009, Berlin-Potsdam, Germany, P67
- Bauer E, Gottwald S, Kalb O, Korzun V, Wilde P, B. Saal Schmolke M, Stein N (2010) GABI-TILL – Current activities in barley, wheat and rye, 10th GABI Statusseminar, March 9-11 2010, Berlin-Potsdam, Germany, P90

Geplant:

- Auinger HJ, Bauer E, Li Y, Haseneyer G, Schön CC (in Vorbereitung) First genome-wide association study in rye and the comparison to genomic selection.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel des Berichts: Forschungsvorhaben "GABI-TILL: Expansion and use of the GABI-TILLING platform for crop gene function analysis (GABI-TILL)" - Teilprojekt Roggen	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Dr. Bauer, Eva	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.09.2011
	6. Veröffentlichungsdatum Juni 2012
	7. Form der Publikation -
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Technische Universität München Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung Emil-Ramann-Str. 4 85354 Freising	9. Ber. Nr. Durchführende Institution keine
	10. Förderkennzeichen 0315052 F
	11. Seitenzahl 19
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 11
	14. Tabellen 3
	15. Abbildungen 3
16. Zusätzliche Angaben keine	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -	
18. Kurzfassung Der TILLING-Ansatz in Roggen erwies sich als schwierig, da etablierte Protokolle aus Gerste wider Erwarten nicht ohne größere Optimierungsversuche übernommen werden konnten. In den ersten Versuchen wurde eine hohe Mortalität und ausgeprägte Sterilität beobachtet. Alternativ wurde ein Eco-TILLING Ansatz verfolgt, um die natürliche Variation in Roggen in Kandidatengenen zu untersuchen und auf Assoziation mit agronomisch relevanten Merkmalen zu prüfen. Für zwei Kandidatengene wurden Assoziationen mit den Merkmalen Ährenschieben, Fallzahl, Tausendkorngewicht und Wuchshöhe untersucht. Die Eco-TILLING Strategie ist grundsätzlich geeignet, um die natürliche Variation in Roggen zu charakterisieren und Assoziationen zwischen Kandidatengenen und phänotypischen Merkmalen aufzudecken. Aufgrund der ausgeprägten Populationsstruktur im untersuchten Material waren nur wenige signifikante Assoziationen zu finden. Zukünftige Eco-TILLING Studien sollten sich auf Material mit geringerer Substruktur und idealerweise einer größeren Anzahl Linien konzentrieren.	
19. Schlagwörter Roggen, TILLING, Eco-TILLING, Kandidatengene, Genomweite Assoziationsstudie	
20. Verlag -	21. Preis -