

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

Pflanzenbiotechnologie-Verbundvorhaben: Nutzung von Genen zur Erhöhung der Resistenz und Toleranz der Getreidewurzel gegenüber biotischem und abiotischem Stress (CEREAL-ROOTS)<sup>1</sup>

**Förderkennzeichen: 0315956C**

**Zuwendungsempfänger:** Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

**Ausführende Stelle:** Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,  
Lehrstuhl für Biochemie, Department Biologie, 91058 Erlangen

**Projektleitung: Prof. Dr. Uwe Sonnewald**  
**PD Dr. Lars Voll**

**Projektlaufzeit:** 01.07.2011 bis 28.2.2015

„Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315956C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor“

## Inhaltsverzeichnis

### **I. Kurze Darstellung des Projektes**

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

### **II. Eingehende Darstellung**

- II.1. des erzielten Ergebnisses
- II.2. des voraussichtlichen Nutzens
- II.3. des während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts
- II.4. der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

### **III. Kurz gefasster Erfolgskontrollbericht des Projektes**

- III.1. Beitrag des Ergebnisses zu förderpolitischen Zielen
- III.2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis und Erfahrungen
- III.3. Fortschreibung des Verwertungsplans
- III.4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben
- III.5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer
- III.6. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

## I. Kurze Darstellung des Projektes

### I.1. Aufgabenstellung

Während der Befall mit Pathogenen und die Einwirkung von abiotischem Stress an oberirdischen Pflanzenorganen gut zu beobachten ist und wissenschaftlich leicht untersucht werden kann, ist das Studium der Wurzel in biotischen und abiotischen Stress-Situationen ungemein schwieriger und daher ist auch vergleichsweise wenig über die Bedeutung dieses Pflanzenorgans für Resistenz- und Toleranzreaktionen bekannt.

Ziel des Verbundvorhabens CEREAL ROOTS war es, Gene zu identifizieren, die die Toleranz von Gerstenpflanzen gegenüber biotischem, abiotischem, sowie kombiniertem biotischen und abiotischen Stress erhöhen. Das am Lehrstuhl für Biochemie der FAU durchgeführte Teilprojekt konzentrierte sich dabei auf die Identifizierung von Genen, die die Salzstress-Toleranz erhöhen und ggf. gleichzeitig auch die Resistenz gegenüber Pflanzenparasiten steigern.

### I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Forschungsarbeiten am Lehrstuhl für Biochemie der FAU Erlangen-Nürnberg drehen sich alle um die Regulation des pflanzlichen Primärstoffwechsels. Das Hauptaugenmerk liegt in einem Großteil der Arbeiten darauf, die Umsteuerung des Primärstoffwechsels unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen und die Rolle einzelner Stoffwechselprozesse für die Streßtoleranz zu verstehen.

Für die Stoffwechselanalyse von Pflanzenmaterial, einer Kernkompetenz des Lehrstuhls für Biochemie (z.B. Abbasi *et al.*, 2007; Doehlemann *et al.*, 2008; Horst *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Abbasi *et al.*, 2009; Voll *et al.*, 2009; Horst *et al.*, 2010), wird eine Metabolomics-Plattform betrieben, die aus mehreren Spektrophotometern, je einem Absorptions-, Fluoreszenz- und Lumineszenz *Plate Reader*, 3 HPLC-Anlagen mit Absorptions- Fluoreszenz und Diodenarray-Detektoren, einer zweisträngigen IC-Anlage mit einem gepulstem Amperometrischen und einem Massenspektrometrischen Detektor, sowie einer GC-MS-Gerät besteht. Über diese Analyse-Plattform können mehr

als 100 Metabolite des pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsels quantifiziert werden. Bei den im Rahmen des CEREAL ROOTS-Projektes durchgeführten Arbeiten sollte u.a. die Rolle von pflanzlichen Inhaltsstoffen für die Pathogenresistenz an den von den Projektpartnern untersuchten Gerstenlinien ermittelt werden.

Der Lehrstuhl für Biochemie betreibt ebenfalls ein pflanzliches Gewebekulturlabor, in dem die Erhaltung und Transformation von axensichen Kartoffel-, Tabak-, Tomate-, Gerste- und Maniok-Kulturen routinemäßig durchgeführt wird. Die Transformation von Gerste war zu Projektbeginn noch nicht etabliert, sollte aber aufgrund des von Projektpartner 1 (IPAZ Giessen) entwickelten STARTS-Systems (Imani et al., 2011) aufgebaut werden um transformierte Kallus-Kulturen als *in vitro*-Testsystem für den Einfluß von Kandidatengen auf die Salzstress-Toleranz zu erheben.

### I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

#### a) Projektplan:

#### **Tabelle 1 - Arbeitsplan aus dem Projektantrag** (auch nächste Seite)

Markierte Arbeitsschritte wurden vom Lehrstuhl für Biochemie der FAU im Rahmen des Forschungsvorhabens CEREAL ROOTS durchgeführt (gelb unterlegt) bzw. waren ursprünglich Teil der Planung gewesen (orange hinterlegt).

Project year	Year 1				Year 2				Year 3			
Quarter	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
<b>WP 1. Plant material and genotypes (all PIs)</b>												
Establishment of plant material with validated characteristics		M <sup>1</sup>										
DH population for RLN resistance				M <sup>1</sup>								
Generating backcrossing population					M <sup>1</sup>							
<b>WP 2. Plant cultivation and stress treatments; confirmation of condition (PI 1, 2, 3)</b>												
2.1. PAMP / Fungal treatments		M <sup>2</sup>										
2.2. Nematode treatment			M <sup>2</sup>									
2.3. NaCl and Boron			M <sup>2</sup>									
Selected stress combinations				M <sup>2</sup>								
<b>WP 3. Isolating genes conferring broad type resistance by candidate approaches (PI 1)</b>												
3.1. List of LysM domains containing PRR from Gramineae		M <sup>3</sup>										
3.2. List of HvCRT1 gene family members				M <sup>3</sup>								
<b>WP4: Genes conferring salt tolerance by a candidate approach (PI 3).</b>												
4.1. Engineering salt tolerance with known candidate genes						M <sup>15</sup>						

<b>WP5: QTL-mapping and transcriptional profiling to identify candidate genes for resistance to <i>Pratylenchus</i> (PI1, 2, 4)</b>										
5.1. QTL identification				M <sup>8</sup>						
5.2. Fine mapping of RLN locus in segregating DH populations					M <sup>9</sup>					
5.3. expression profiling of the phenotypic and genotypic bulks					M <sup>10</sup>					
5.4. Validation of QTLs									M <sub>13</sub>	
<b>WP6: Analysing stress-related gene expression profiles in a central experiment (CET) (PI1, 2, 3).</b>										
6.1. Transcriptome profiling*								M <sup>19</sup>		
6.2.1. Metabolome: Targeted analysis of primary metabolites and stress associated metabolites								M <sup>20</sup>		
6.2.2. Metabolome: Untargeted metabolite profiling								M <sup>21</sup>		
<b>WP7: Validation of candidate genes by STARTS and seedling assays (PI 1, 2,3)</b>										
7.1. Testing up to 150 PRR in STARTS with Fusarium and Cochliobolus					M <sup>4</sup>					
7.2. Testing HvCRT gene family members						M <sup>6</sup>				
7.3. Testing 30 salinity tolerance genes								M <sup>16</sup>		
7.4. Testing up to 500 genes identified during profiling experiments								M <sup>7</sup>		
<b>WP. 8 Bioinformatics development of response networks (PI 1, 2, 3)</b>										
Creation of the meta data repository and data import				M <sup>8</sup>						
eQTLs physical mapping									M <sub>11</sub>	
Analysis of co-response and model development									M <sub>11</sub>	
<b>WP 9. Molecular marker development for RLN resistance (PI 2)</b>										
Sequencing of target genomic regions for SNP identification									M <sub>12</sub>	
Development of molecular markers using the candidate genes identified based on expression results									M <sub>12</sub>	
Molecular marker validation in a crossing population										M <sub>14</sub>
Delivering base material for breeding										M <sub>15</sub>
<b>WP 10. Green house and field analysis of candidate plants generated in the above WPs (PI 4,5).</b>										
Greenhouse analysis									M <sub>18</sub>	
Initial validation										M <sub>18</sub>

\*sequential outcome in the course of the 3 years

## b) Projektablauf:

Die bei der Antragstellung veranschlagte Planung des Projektes wird anhand des in Tabelle 1 dargestellten, aus der Vorhabensbeschreibung übernommenen Arbeitsplanes deutlich, in dem alle Arbeitspakete gelb unterlegt sind, an dem der LS Biochemie der FAU beteiligt war. Im Folgenden wird auf die Arbeiten zu den einzelnen Arbeitspaketen eingegangen.

**Arbeitspaket 1:** Aqoise und Selektion von Pflanzenmaterial

Saatgut der NaCl- und Bor-toleranten Landrasse Sahara wurden auf Anfrage freundlicherweise von Torsten Schnurbusch (IPK Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Ansonsten hat der Lehrstuhl für Biochemie der FAU über die gesamte Projektlaufzeit hinweg Pflanzenmaterial von den beteiligten Partnern bezogen und hat mit diesem gearbeitet. Darunter fallen:

## a) Von der CAU Kiel:

13 Gerstenkultivare mit unterschiedlich ausgeprägter *Pratylenchus*-Resistenz

58 DH-Linien aus einer Kreuzungspopulation von *Valentina x Beysehir*

24 DH-Linien aus einer Kreuzungspopulation von *Uschi x HHOR3073* und

24 DH-Linien aus einer Kreuzungspopulation von *Igri x Franka*.

## b) Vom IPAZ Gießen:

3 *HvMORC2:RNAi*-Linien L11, L40 und L55

3 *HvMORC1:Ox*-Linien L5 und L13

Leerverktor-Transformante

Wildtyp *Golden Promise*

**Arbeitspaket 2:** Etablierung der Stressbedingungen

Die Etablierung eines Testsystems um die Salzstress-Toleranz von Gerstenpflanzen bei Anzucht auf Erde erheben zu können war vor Ablauf des ersten Projektjahres abgeschlossen. Die Validierung des *in vitro*-Testsystems für die Bestimmung der Salzstress-Toleranz von Kallus-Kulturen war nach der Hälfte des zweiten Projektjahres abgeschlossen.

**Arbeitspaket 4:** Verbesserung der Salzstress-Toleranz mit Hilfe von Kandidatengenen

Folgende Kandidatengene wurden aufgrund der Fachliteratur für die Erhebung der Salzstress-Toleranz von transgenen Kallus-Kulturen ausgewählt, die unter Verwendung des STARTS-Systems erzeugt werden sollten:

1) die SnRK2-Kinase *AtCIPK16* (Roy et al., 2012)

2) der vakuoläre H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Transporter *AtNHX1* (Brini et al., 2006)

- 3) der vakuoläre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Transporter AtHKT1 (Xue et al., 2011, Mian et al., 2011)
- 4) der vakuoläre Glucose-Transporter AtTMT1 (Wingenter et al., 2010)
- 5) der Saccharose-Transporter AtSWEET12 (Chen et al., 2012)

Die Erstellung der Expressionskonstrukte für diese fünf Kandidatengene war nach den ersten 6 Monaten der Projektlaufzeit abgeschlossen. Allerdings zeigte sich Anfang des zweiten Jahres der Förderperiode, dass die Daten aus dem Kallus-System keine zuverlässige Vorhersage der Salzstress-Toleranz zuließen. Daher wurde die Überprüfung von Kandidatengenen mit dem STARTS-System nicht weiter verfolgt.

#### **Arbeitspaket 6:** Transkriptom- und Metabolom-Profilierung

In Kooperation mit dem Projektpartner CAU wurde angestrebt, die biochemische Grundlage der Resistenz von Gerstenwurzeln gegenüber Wurzelläsionsnematoden (*root lesion nematodes*, RLN) der Gattung *Pratylenchus sp.* aufzuklären. Dazu waren drei unabhängige Kollektionen von Gerstenlinien (s. Arbeitspaket 1a) einem Metabolit-Profilierung unterzogen worden, bei dem insgesamt 112 phenolische Sekundärmetabolite und über 500 polare Metabolite detektiert wurden. Zusätzlich wurde die Monosaccharid-Zusammensetzung der Wurzel-Zellwände untersucht.

Die Arbeiten des CEREAL ROOTS-Konsortiums konzentrierten sich sehr zügig auf zwei Zielprozesse, zum einen die Resistenz von Gerstenpflanzen gegen RLN aufzuklären und zum anderen die kombinierte Stresstoleranz von Gerstenpflanzen mit veränderter Expression von MORC-Genen zu untersuchen. Ein Teil der beantragten Microarray-Analysen zur Identifizierung Stress-vermittelter Genexpression wurden daher nicht benötigt und die dafür bewilligten Mittel wurden mit Antrag vom 10. März 2014 umgewidmet.

#### **Arbeitspaket 7:** Validierung von Kandidatengenen in gezielten Untersuchungen

Die Salzstress-Toleranz von Gerstenpflanzen mit veränderter Expression von MORC-Genen wurde über die letzten zwei Jahre der Projektlaufzeit, inkl. Zuwendungsneutraler Laufzeitverlängerung, sehr intensiv untersucht. Da sich das STARTS-System nach eingehender Prüfung als ungeeignet für das Erreichen der Projektziele erwiesen hat, konnten keine weiteren Kandidatengene im *in vitro*-System untersucht werden.

#### I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde (aus dem Prohjektantrag entnommen)

Many studies have been conducted on the mechanisms of salt stress tolerance in cereals. However, the question on how combination of biotic and abiotic stress might alter defense status, physiology and yield parameters is widely unsolved (Federico et al. 2005, *Plant Mol Biol* 57:35-51). The tribe Triticeae, including wheat and barley, possesses tremendous potential for drought and salt tolerance that has been extensively transferred to wheat cultivars with proven expression of tolerance in experimental trials (Nevo & Chen 2010, *Plant Cell Environ.* 33:670-85. Advanced backcross QTL analysis, the introgression libraries based on wild wheat and wild barley as donors, and positional cloning of natural QTLs will play prevailing roles in elucidating the molecular control of salt tolerance. Combining tolerant genes and QTLs in crop breeding programs aimed at improving tolerance to salinity will be achieved within a multidisciplinary context.

On the physiological level, two virtually independent effects determine sodium tolerance of plants. In the initial phase, a rapid response towards the increase in external osmotic potential is required, while in the long term adaptation response, cellular  $\text{Na}^+$  toxicity has to be either prevented by  $\text{Na}^+$  extrusion or sequestration, or reduced by physiological adaptation (Munns and Tester, 2008 *Ann Rev Plant Biol* 59: 651-681).

A considerable number of  $\text{Na}^+$  uniporters,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  symporters and  $\text{Cl}^-$  transporters located in different plant organs and subcellular compartments have been associated with the sodium sequestration or extrusion in several plant species (as compiled by Munns and Tester, 2008). For two of these transporters, functional conservation across species was already shown in transgenic *Arabidopsis*. Overexpression of the wheat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter *TNHX1* and the barley  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase *TVP* was able to improve relative water content, water potential and  $\text{Na}^+$  as well as  $\text{K}^+$  in the transformants (Brini et al. 2007; *J. Exp. Bot.* 58:301-308). The genes coding for these and other ion transport functions will be included in the candidate gene approach of the current project. Moreover, Martínez-Atienza et al. (2007; *Plant Physiology* 143, 1001-1012) successfully characterized the *SOS1* gene and the *SOS2/SOS3* kinase complex genes that had been shown to be conserved in the Salt Overly Sensitive Pathway in rice. Very recently, the barley gene *HvCBL4* has been mapped to the salt tolerance locus *HvNAX4* locus on chromosome 1H and it could be shown that *HvCBL4* represents the homolog of rice *SOS3* (Rivandi et al., 2011).

In contrast to considerable knowledge gained on ion transporters involved in salinity tolerance, the physiological adaptation mechanisms to high sodium are not yet

completely unravelled and far from being fully understood. Intriguingly, the underlying metabolic functions provide the highest potential for increased and sustainable cross-tolerance towards both, abiotic and biotic stresses. In order to unravel the physiological mechanisms underlying salt stress tolerance, utilizing the natural genetic variation of barley accessions, a series of hydroponics-based salinity stress experiments were conducted using two genetic mapping parents, cvs Steptoe and Morex, which display contrasting levels of salinity tolerance (Witzel et al. 2009; J Exp Bot. 60:3545-57). In the proteome of salt-stressed roots two proteins involved in the glutathione-based detoxification of reactive oxygen species (ROS) were more abundant in the tolerant genotype Morex, while proteins involved in iron uptake were expressed at a higher level in the sensitive one. This study emphasizes the role of proteins involved in ROS detoxification during salinity stress and has identified potential candidates for increasing salt tolerance in barley.

In addition, the metabolic response to salt stress has been described for two other barley cultivars differing in salinity tolerance, Sahara and Clipper (Widodo et al. 2009; J Exp Bot. 60:4089-103). Compared with Clipper, Sahara had significantly higher leaf  $\text{Na}^+$  levels and less leaf necrosis, suggesting they are more tolerant to accumulated  $\text{Na}^+$ . While the more sensitive cultivar Clipper exhibited elevated levels of organic nitrogenous compounds, including the compatible solutes proline, GABA, and the polyamine putrescine in response to sodium, the more tolerant Sahara displayed increased contents of intermediates in primary carbon metabolism and metabolites involved in cellular protection. Nevertheless, the reported metabolic differences were observed after more than three weeks of salt stress, suggesting that the changes represent metabolic consequences of differing salt tolerance.

#### I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Kooperation im Rahmen des CEREAL ROOTS-Projektes war sehr gut und konstruktiv. Ein- bis zweimal jährlich fanden Projekttreffen statt, bei denen nicht nur der Fortschritt und der zukünftige Arbeitsplan der Teilprojekte intensiv diskutiert wurden, sondern auch die Inhalte der bilateralen Kooperationen ausführlich erörtert wurden. In der stets sehr kreativen Atmosphäre sind viele nützliche Ideen entstanden, die später in die Arbeitsprogramme der Projektpartner Einzug erhalten haben.

Darüberhinaus fand ein bilateraler Austausch per Telefon und Email statt, der für die konkrete Planung und den reibungslosen Ablauf gemeinsam durchgeführter Arbeitspakete essentiell war.

## II. Eingehende Darstellung

### II.1. des erzielten Ergebnisses

Im betreffenden Teilprojekt des *Plant 2030*-Verbundvorhabens CEREAL ROOTS wurden drei Ansätze verfolgt um Gene und damit verbundene physiologische Eigenschaften zu identifizieren, die gleichzeitig die abiotische und biotische Stresstoleranz von Gerstenwurzeln erhöhen.

#### 1) Identifizierung von Kandidatengenen für verbesserte Salzstresstoleranz im STARTS-System

Im ersten Ansatz sollte die Salzstresstoleranz der Gerstenwurzel auf molekular-biochemischem Wege verbessert werden. Aufgrund der Fachliteratur und auf Basis von Transkriptomuntersuchungen mit geeigneten Gerstenkultivaren wurden Kandidatengene ausgesucht. Die ausgewählten Kandidatengene sollten dann in transgenen Kalli mithilfe des STARTS-Systems (Imani et al., 2011) überexprimiert werden, um die Toleranz der transgenen Kalli gegenüber ionischem und osmotischem Stress zu überprüfen. Besonders geeignete Kallus-Linien sollten für weitere Untersuchungen zu transgenen Pflanzen regeneriert werden.

Zu Projektbeginn ausgewählte Kandidatengene für das STARTS-System:

Für ein *proof-of-concept*-Experiment wurden im STARTS-Vektorsystem Überexpressionskonstrukte für drei Gene erstellt, die berichtetermaßen der Akkumulation von NaCl im Gewebe und damit ionischem Stress entgegenwirken:

6) die SnRK2-Kinase AtCIPK16 (Roy et al., 2012)

7) den vakulären H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Transporter AtNHX1 (Brini et al., 2006)

8) den vakulären Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Transporter AtHKT1 (Xue et al., 2011, Mian et al., 2011)

Darüberhinaus wurden zwei Zuckertransporter in STARTS-Überexpressionskonstrukte kloniert, die eine Erhöhung der Salzstress-Toleranz durch eine erhöhte Akkumulation von löslichen Zuckern in der Vakuole erreichen sollen:

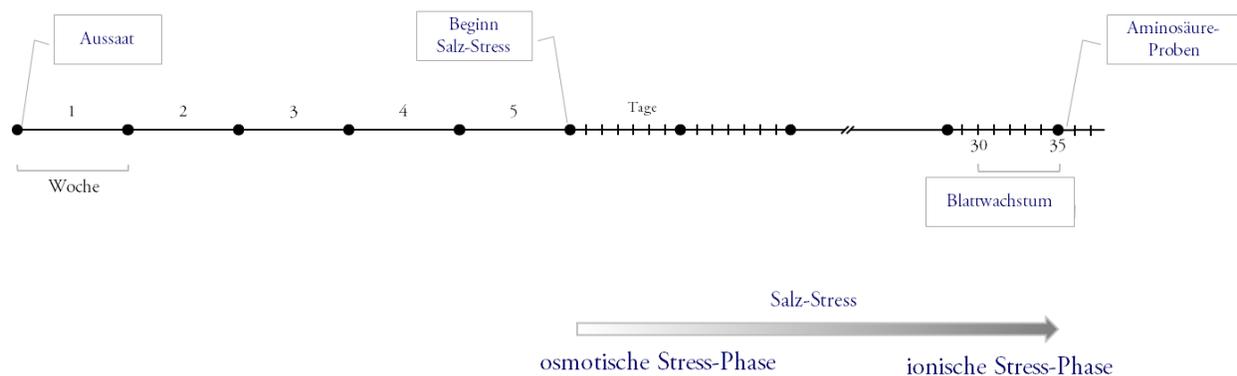
9) der vakuoläre Glucose-Transporter AtTMT1 (Wingenter et al., 2010)

10) der Saccharose-Transporter AtSWEET12 (Chen et al., 2012)

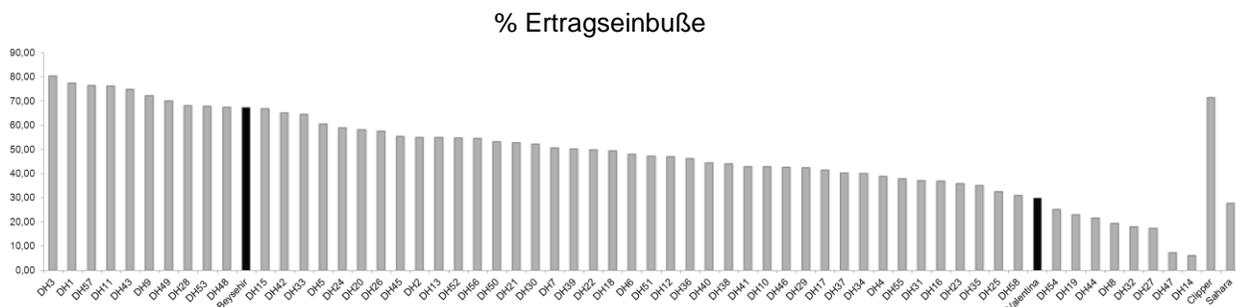
### Etablierung von Testsystemen zur Bestimmung der Salzstresstoleranz :

Im ersten Jahr der Förderung waren unterschiedlich starke Salzstress-Bedingungen für die Anzucht von Gersten-Pflanzen auf Erde etabliert worden. Dabei wurden die Pflanzen ab einem Alter von 5 Wochen mit 1% bzw. 2% NaCl-Lösung anstelle von Leitungswasser gegossen (Abbildung 1). Um die osmotische Komponente der Salzstresstoleranz erheben zu können wurde die Elongationsrate des jüngsten Blattes über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgt. Die ionische Komponente der Stresstoleranz wurde durch die Ertragsverminderung unter Salzstress bestimmt (Abbildung 1).

Die Toleranz gegenüber ionischem Stress wurde dann als %Ertragsminderung ausgedrückt, wie in Abbildung 2 für eine Population von 58 DH-Linien gezeigt. Aus dieser DH-Population wurden acht unterschiedlich Salzstress-tolerante DH-Linien ausgewählt, um von diesen DH-Linien Gersten—Kallus-Linien zu etablieren.



**Abbildung 1.** Anzuchtschema für die Bestimmung der Salzstresstoleranz während der osmotischen (Messung der Blattelongationsrate 0-14 Tage nach Etablierung des Stresses) und ionischen Stressphase (Messung des Korntrages nach der Abreife der Pflanzen) bei der Anzucht von Gerstenpflanzen auf Erde. Um zu überprüfen, dass das Blattwachstum in der ionischen Stressphase zum Erliegen kommt wurde die Blattelongationsrate nocheinmal ca. 30-35 Tage nach Beginn des Salzstresserhoben. Zu diesem Zeitpunkt wurden ggf. auch Proben für die Quantifizierung von Metabolitgehalten, z.B: Aminosäuren genommen.

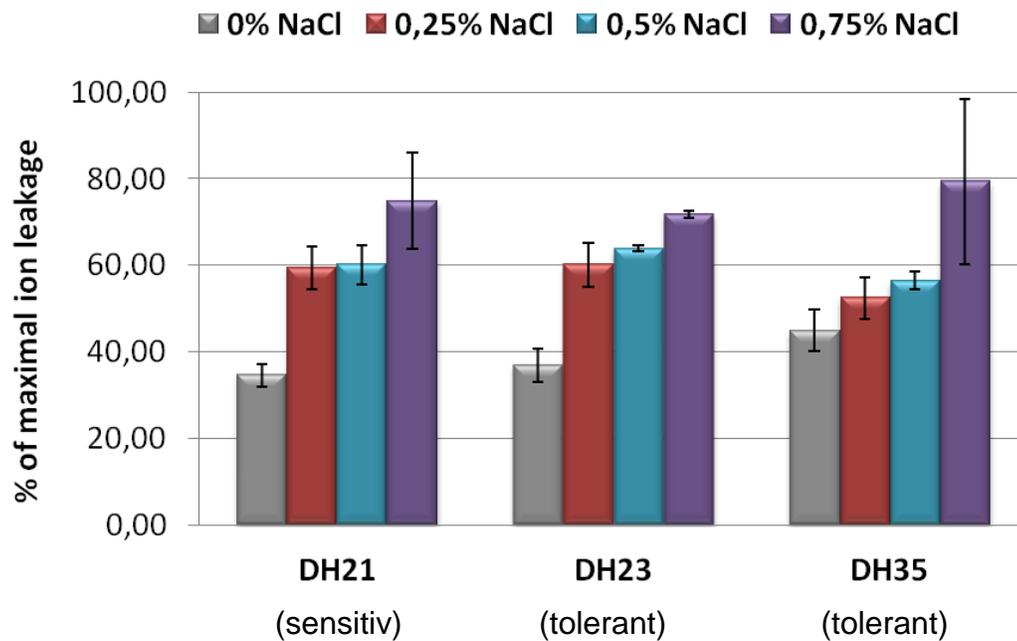


**Abbildung 2.** Prozentualer Ertragsausfall durch ionischen Stress in 58 DH-Linien der *Valentina* x *Beysehir*-Nachkommenschaft, von links (sensitiv) nach rechts (tolerant) absteigend geordnet. Als Referenz sind die ErtragseinbuÙen der Elternkultivare *Beysehir* (sensitiver) und *Valentina* (toleranter) in schwarz dargestellt. Am rechten Ende der Skala sind die Daten der Kultivare *Clipper* (sensitiv) und *Sahara* (tolerant) aufgeföhrt. N=3.

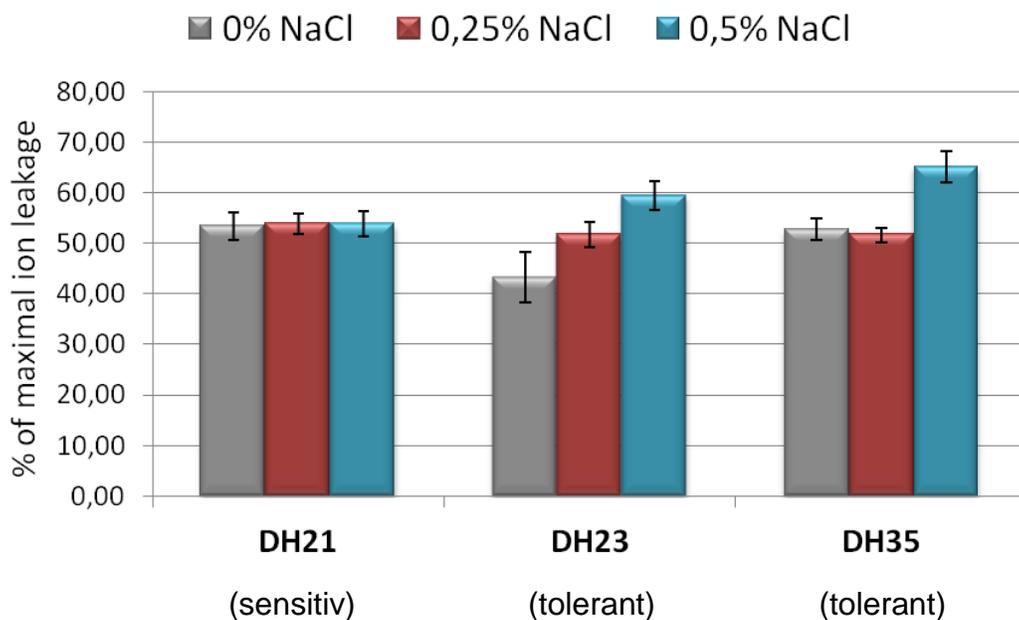
Im zweiten Jahr der Förderperiode wurden Techniken etabliert, um die osmotische und ionische Salzstresstoleranz von Kalluskulturen zu bestimmen. Im Kallusystem wurde die Ionenleckage eine Woche nach Transfer auf salzbelastetes Medium als Maß für die osmotische Stresstoleranz bestimmt, während die Ionenleckage von Kallusgewebe nach vier Wochen auf salzbelastetem Medium die ionische Salzstresstoleranz der Kalli widerspiegelte.

Die Quantifizierung der ionischen Komponente der Salzstresstoleranz erwies sich sowohl auf Erde als auch auf Medium als zu langwierig, um die Stresstoleranz von Gerstenkultivaren mit mittlerem bis hohem Durchsatz bewerkstelligen zu können. Daher wurde im weiteren Verlauf des Projektes stets nur die osmotische Stresstoleranz ermittelt.

### A – Ionenleckage von Kallusgewebe in der ionischen Stressphase

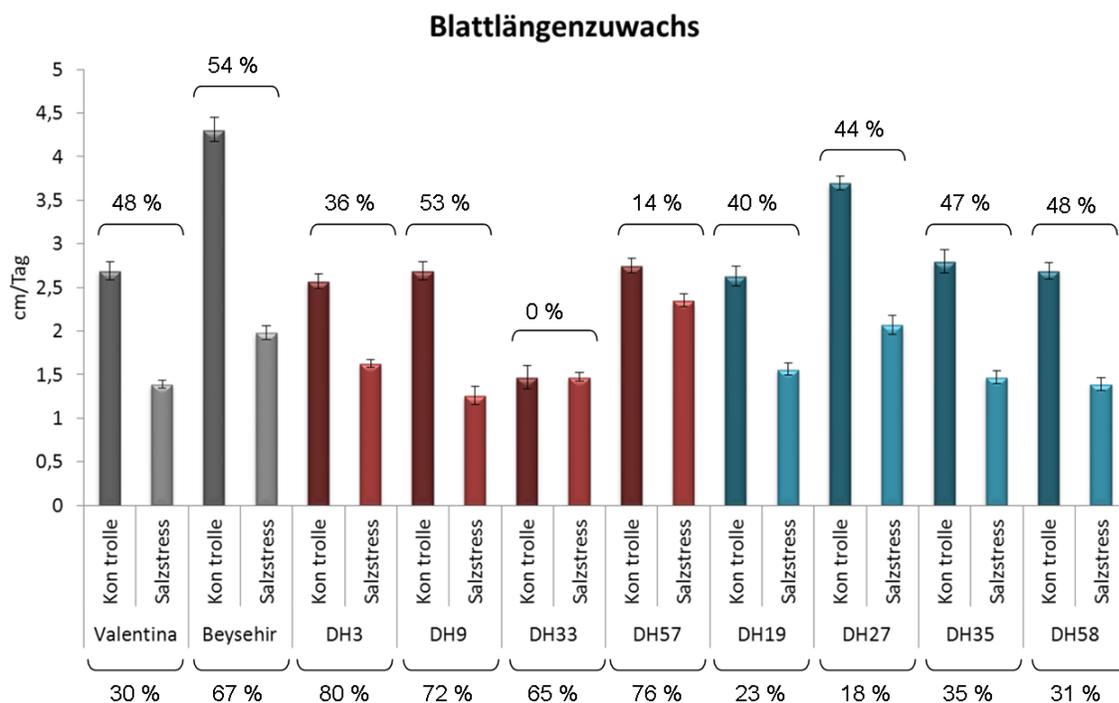


### B – Ionenleckage von Kallusgewebe in der osmotischen Stressphase



**Abbildung 3.** Grad der Ionenleckage in Kallusgewebe von drei DH-Linien, die bei der Anzucht auf Erde die in Klammern angegebene ionischen Stresstoleranz gezeigt hatten. A – Ionenleckage des erzeugten Kallusgewebes in der ionischen Stressphase (4 Wochen nach Transfer auf BCID-Medium (Imani et al., 2011) mit der angegebenen NaCl-Konzentration); B – Ionenleckage des erzeugten Kallusgewebes in der osmotischen Stressphase (eine Woche nach Transfer auf BCID-Medium mit der angegebenen NaCl-Konzentration). N=5.

Wie beim Vergleich von Abbildung 3A mit 3B ersichtlich ist, stimmte die ionische Salztoleranz der Kallus-Kulturen nicht mit der osmotischen Toleranz überein. Während die Ionenleckage der Kalluskulturen von Linie DH21 und DH23 in der ionischen Stressphase auf Medium mit 0,25% NaCl deutlich höher war im Vergleich zu Kontrollplatten, waren die durch NaCl-Zugabe verursachten Unterschiede in der Ionenleckage während der osmotischen Stressphase marginal. Ausserdem wurden keine deutlichen Unterschiede in der Sensitivität von Kalluskulturen beobachtet, deren Salzstresstoleranz sich bei der Anzucht auf Erde unterschieden hatte



**Abbildung 4:** Gegenüberstellung der osmotischen Stresstoleranz (Prozentwerte oberhalb der Balken) und der ionischen Stresstoleranz (Prozentwerte in der Fußzeile) von 10 ausgewählten DH-Linien aus der *Valentina* x *Beysehir*-Nachkommenschaft. Graue Balken: Parentalgenotypen *Valentina* und *Beysehir*; rote Balken: gegenüber ionischem Stress sensitive DH-Linien; blaue Balken: gegenüber ionischem Stress tolerante DH-Linien. Die osmotische Stresstoleranz wurde als prozentuale Verminderung der Blattelongationsrate innerhalb der ersten 9 Tage nach Gießen mit 2% NaCl bestimmt und wird durch den korrespondierenden %-Wert oberhalb der Balken angegeben. Zum Vergleich ist die prozentuale Ertragseinbuße auf salinem Boden als Maß für die ionische Stresstoleranz unterhalb der Liniennamen dargestellt (Daten aus Abbildung 1 abgeleitet). N=4.

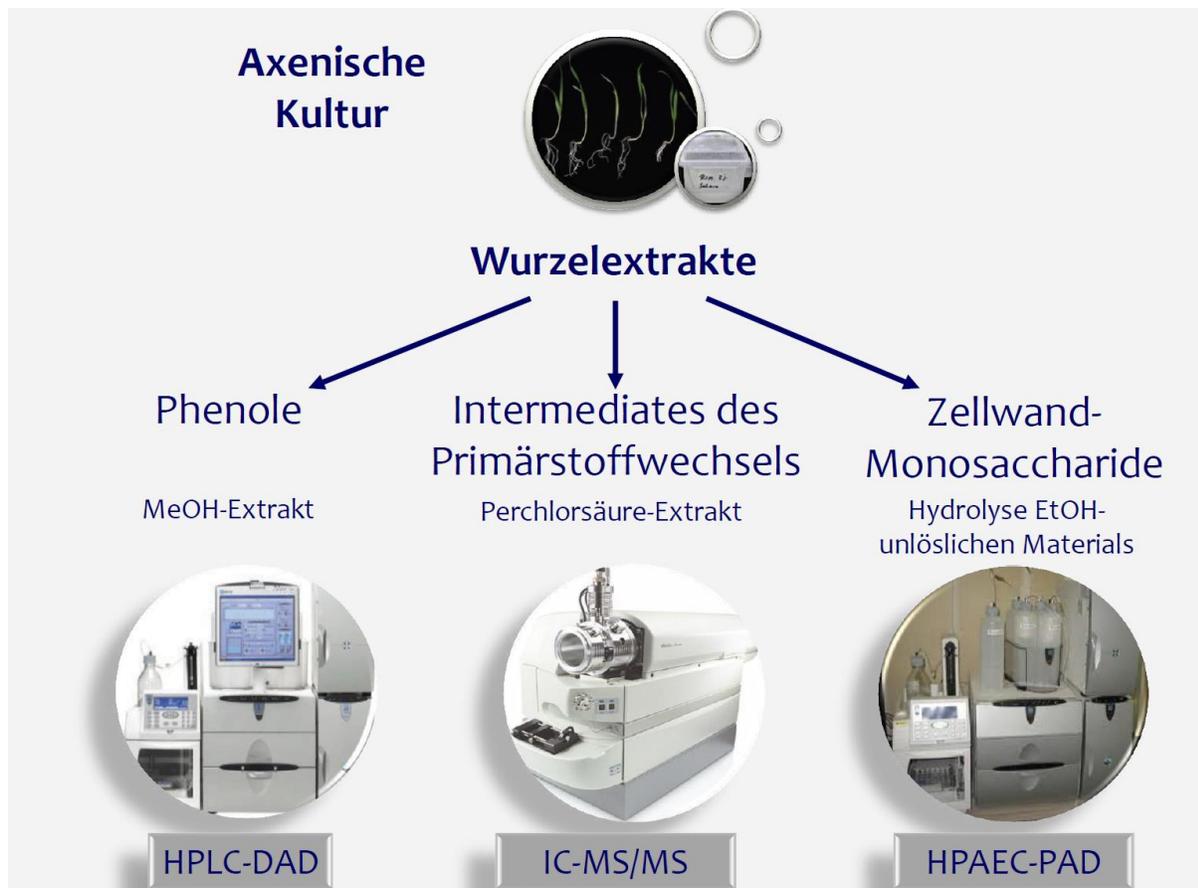
Auch die osmotische Stresstoleranz von 10 ausgewählten DH-Linien aus der *Valentina* x *Beysehir*-Nachkommenschaft stimmte bei Anzucht auf Erde nicht mit der zuvor erhobenen ionischen Stresstoleranz der Linien überein (Abbildung 4).

Aufgrund der erhobenen Daten wurde das Kallus-System als ungeeignet eingestuft, das Maß der ionischen oder osmotischen Stresstoleranz intakter Pflanzen bei der Anzucht auf Erde widerzuspiegeln. Die Verwendung von STARTS (Imani et al., 2011) für die Hochdurchsatz-Durchmusterung von Kandidatengenomen im Kallus-System wurde folglich nicht weitergeführt.

## 2) Biochemische Grundlage der Resistenz gegenüber *Pratylenchus* sp.

In enger Kooperation mit dem Projektpartner CAU wurde angestrebt, die biochemische Grundlage der Resistenz von Gerstenwurzeln gegenüber Wurzelläsionsnematoden (*root lesion nematodes*, RLN) der Gattung *Pratylenchus* sp. aufzuklären. Dazu waren drei unabhängige Kollektionen von Gerstenlinien einem Metabolit-Profilung unterzogen worden, bei denen sich die Linien in ihrer RLN-Resistenz unterschieden. Es wurden (i) 13 Gerstenkultivare mit unterschiedlich ausgeprägter *Pratylenchus*-Resistenz untersucht, und 48 unterschiedlich resistente DH-Linien aus Kreuzungspopulationen von (ii) *Uschi* x *HHOR3073* und (iii) *Igri* x *Franka*.

Ziel der Experimente war es, Inhaltsstoffe zu identifizieren, deren Gehalte mit dem Auftreten von Resistenz gegenüber *Pratylenchus* sp. korrelieren. Eine Übersicht über die Analysestrategie gibt Abbildung 5. Es konnten insgesamt 112 potentielle phenolische Sekundärmetabolite über HPLC-DAD (I, links) und über 500 polare Metabolite per IC-MS/MS detektiert werden (II, Mitte). Ausserdem wurde die Monosaccharid-Zusammensetzung der Wurzel-Zellwände untersucht (III, rechts).



**Abbildung 5:** Übersicht über die Analyse-Strategie an Gerstenwurzeln mit unterschiedlicher RLN-Resistenz.

HPLC-DAD: *high pressure liquid chromatography-diode array detection*

IC-MS/MS: *ion exchange chromatography-tandem mass spectrometry*

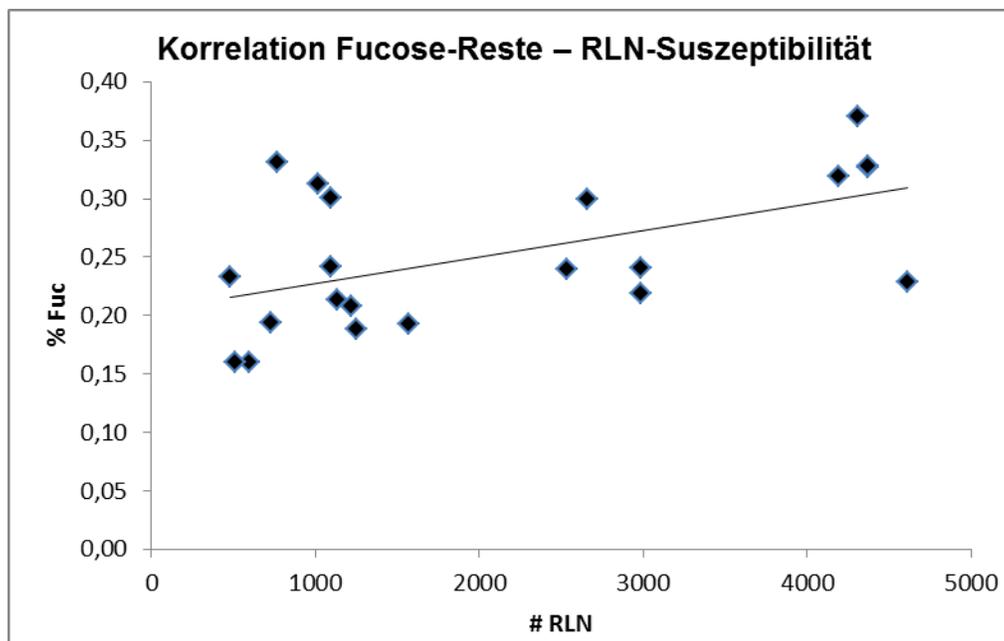
HPAEC-PAD: *high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection*

(I) Die in der Analyse der ersten Kollektion aufgetretenen Korrelationen zwischen dem Gehalt von phenolischen Verbindungen aus methanolischen Extrakten und RLN-Resistenz konnten in den beiden darauf untersuchten Gersten-Kollektionen nicht wiedergefunden werden.

(II) Von den in der ersten Kollektion ausgewerteten 437 Massensignalen korrelierten 20 positiv ( $R^2 > 0,6$ ) und 50 negativ ( $R^2 < -0,6$ ) mit RLN-Resistenz. Fünf dieser Korrelationen zwischen Massensignal (i.e. Metabolitgehalt) und RLN-Toleranz konnten in den beiden unabhängigen DH-Populationen bestätigt werden. Durch einen Vergleich mit den in einer Spektrendatenbank ([www.massbank.jp](http://www.massbank.jp)) abgelegten Massenübergängen

wurden diesen fünf Massensignalen 21 mögliche Metabolite zugeordnet (Tabelle 2). Eine mögliche Übereinstimmung zwischen den mit RLN-Resistenz-korrelierenden Massensignalen und den 21 Kandidaten wurde durch Tuning der Metabolite und/oder Co-Chromatographie überprüft. Dabei konnte jedoch keiner der 21 Metabolite einem der Massensignale zugeordnet werden.

(III) Die Analyse der Zellwand-Monosaccharid-Zusammensetzung der untersuchten Gerstenkultivare ergab keine deutliche Korrelation zwischen den Gehalten einzelner Monosaccharide in der Zellwandfraktion und der RLN-Resistenz. Die beste Korrelation zeigte der Gehalt von Fucose-Resten (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Korrelation zwischen dem Gehalt an Fucose-Resten in der Zellwand von Gerstenwurzeln der drei o.g. Kollektionen (in % aller neutralen Monosaccharid-Reste) und der Suszeptibilität gegenüber *Pratylenchus sp.* (# RLN - Anzahl der Nematoden/ Wurzelsegment; Daten von Partner 2, CAU Kiel).  $R^2 = 0,294$ .

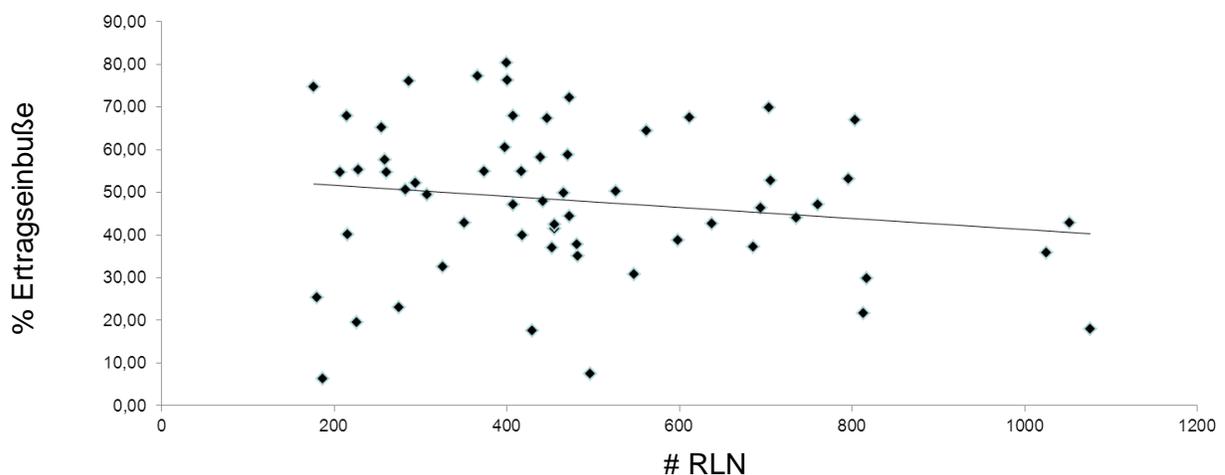
<b>Metabolit</b>	<b>m/z<sub>1</sub></b>	<b>m/z<sub>2</sub></b>	<b>m/z<sub>3</sub></b>	<b>m/z<sub>4</sub></b>
Phenylalanin	91,9	79,6		
Hydroxylysin	125,5	97,1	83,9	78,9
Prolin	68,1			
Leucin	83,9	68,1		
Hydroxyprolin	83,9	68,1		
γ-Aminobutyrat (GABA)	83,9			
Glutamin	83,9			
Maltotriose	119,1	119	97,1	
Glucose	119,1	119	97,1	
Saccharose	119,1	119		
Shikimat	119,1	119	83,9	
Hydroxyphenylpyruvat	119,1	97,1	91,9	78,9
Anthranilat	91,9			
Coumarsäure	119,1	119		
Kaempferol	188,6	119,1	91,9	
Inosin	91,9			
Adenin	91,9			
Uridin	91,9			
Hypoxanthin	97,1	91,9	76,9	68,1
Aminoadipinsäure	68,1			
Zeatin	188,6	119,1	91,9	

**Tabelle 2.** Auflistung der per Co-Chromatographie und Tuning überprüften Metabolite. Die möglichen Zuordnungen zu bestimmten Massensignalen (m/z) aus dem Metabolit-Profilings-Ansatz sind ebenfalls aufgeführt. Zur weiteren Erläuterung s. Text.

### 3) Identifizierung von Gerstengenotypen mit kombinierter Toleranz gegen biotischen und abiotischen Stress

#### a) Salzstresstoleranz von DH-Linien mit erhöhter Resistenz gegen *Pratylenchus sp.*

Die innerhalb des Konsortiums zur Verfügung stehenden Gerstengenotypen wurden systematisch auf eine kombinierte Salz- und Pathogentoleranz hin untersucht. Dabei wurde zuerst auf Pflanzenmaterial zurückgegriffen, an dem die beiden Projektpartner IPAZ und CAU bereits eine erhöhte Toleranz gegenüber Pathogenen beobachtet hatten. Zum einen wurden RLN-resistente DH-Linien von Projektpartner 2 (CAU Kiel) auf Salzstress-Toleranz hin untersucht. Es konnte keine Korrelation zwischen der RLN-Resistenz und der Toleranz gegenüber der ionischen Komponente von Salzstress in den 56 DH-Linien aus der *Valentina x Beysehir*-Nachkommenschaft beobachtet werden (Abbildung 7). Daher wurden die beiden anderen verfügbaren, für RLN-Resistenz segregierenden DH-Populationen nicht weiter auf Salzstresstoleranz untersucht.



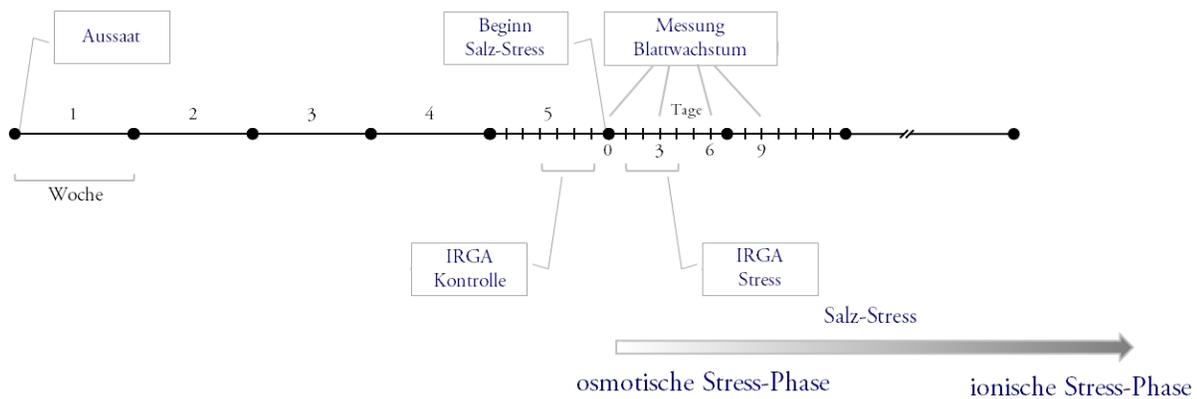
**Abbildung 7.** Korrelation zwischen Ertragseinbuße unter ionischem Stress (Daten aus Abbildung 2) und der Suszeptibilität gegenüber *Pratylenchus sp.* (# RLN - Anzahl der Nematoden pro Wurzelsegment; Daten von Partner 2, CAU Kiel) von 56 DH-Linien aus der *Valentina x Beysehir* Nachkommenschaft.

## b) Salzstresstoleranz von Gerstenpflanzen mit veränderter Expression von MORC ATPasen

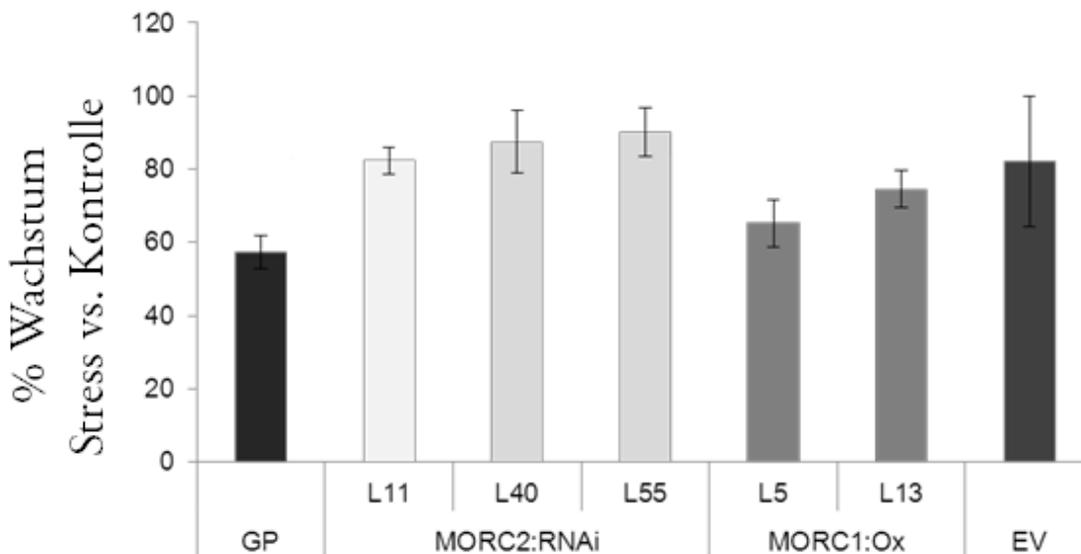
Im Rahmen des Projektes waren von Projektpartner IPAZ ausserdem transgene Gerstenpflanzen eingehender untersucht worden, die eine 50%ige Suppression der MORC ATPase *HvMORC2* (*HvCRH1*) bzw. eine Überexpression von *HvMORC1* (*HvCRT1*) aufwiesen (Langen et al., 2014). Sowohl im Modellorganismus Arabidopsis (Kang et al., 2012), wie auch in Gerste spielt die cytosolische Aktivität von MORC ATPasen eine Rolle in der Abwehrantwort gegenüber mikrobiellen Pathogenen. Gerstenpflanzen mit verringerter *HvMORC2*-Transkriptmenge zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber Mehltau und gegenüber Wurzelinfektionen mit *Fusarium graminearum* (Langen et al., 2014). Für die Arabidopsis MORC ATPasen *AtMORC1* und *AtMORC6* konnte darüber hinaus eine Funktion im Nukleus gezeigt werden. Diese beiden MORC-Isoformen spielen eine Rolle bei der Methylierung von Heterochromatin und haben damit eine Bedeutung für die transkriptionelle Stilllegung von Genen (Moissard et al., 2012). Es ist nun denkbar, dass bei Misexpression von MORC-Homologen in Gerste durch eine veränderte epigenetische Kontrolle der Genexpression auch solche Gene differentiell reguliert werden, die Toleranz gegenüber abiotischem Stress vermitteln - auch wenn die stabile transkriptionelle Unterdrückung von transposablen Elementen in *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen nicht verändert war (Langen et al., 2014).

Aufgrund der von Projektpartner IPAZ erzielten Ergebnisse erwiesen sich die *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen als besonders vielversprechend im Hinblick auf das Projektziel, Gerstenpflanzen mit einer erhöhten Toleranz gegenüber biotischem und abiotischem Stress zu identifizieren.

Die osmotische Komponente der Salzstress-Toleranz von *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen und *HvMORC1*-Überexpressionspflanzen wurde nach dem in Abbildung 8 dargestellten Anzucht- und Beprobungsschema ermittelt. Die Elongationsrate des jüngsten Blattes wurde 0-9 Tage nach Stressbeginn verfolgt, während Gaswechselformen am Infrarot-Gasanalysator (IRGA) 3 Tage vor Stressbeginn (Kontrolle) und 3 Tage nach Stressbeginn durchgeführt wurden.



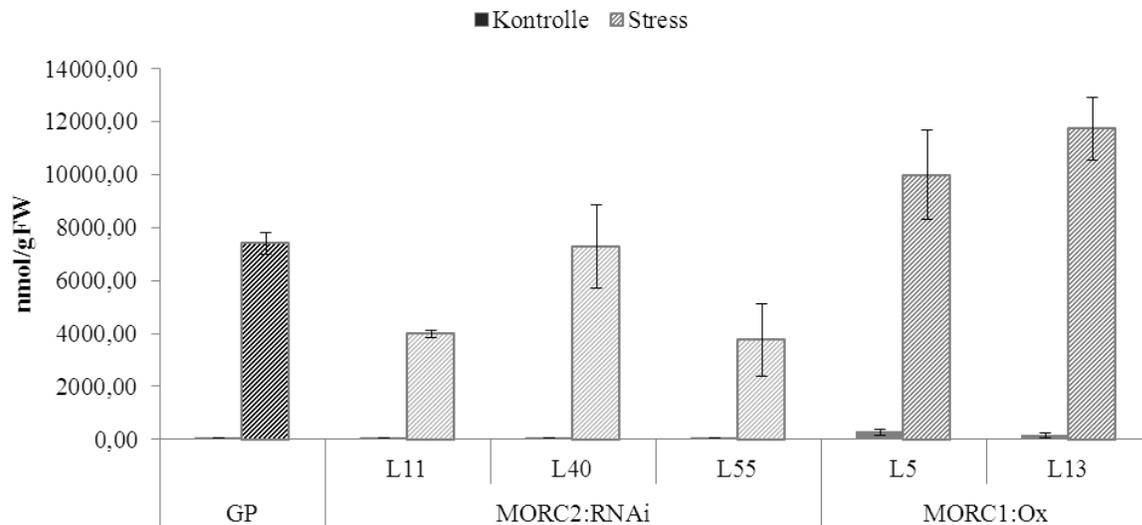
**Abbildung 8.** Anzucht- und Beprobungsschema für die Messung der osmotischen Salzstresstoleranz von Gerstenpflanzen mit veränderter Expression von *HvMORC2:RNAi*- und *MORC1*-Überexpressionspflanzen. Erläuterungen s. Text. IRGA – Infrarot-Gaswechsellanalysator.



**Abbildung 9.** Verminderung der Blattelongationsraten im Vergleich zur Kontrollbedingung während der ersten sechs Tage nach Gießen mit 2% NaCl.

Schwarz: (GP) *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; grau: *MORC1:Ox* – zwei unabhängige Linien L5 und L13; dunkelgrau: EV - Leervektorkontrolle zu *MORC1:Ox*. N=12. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

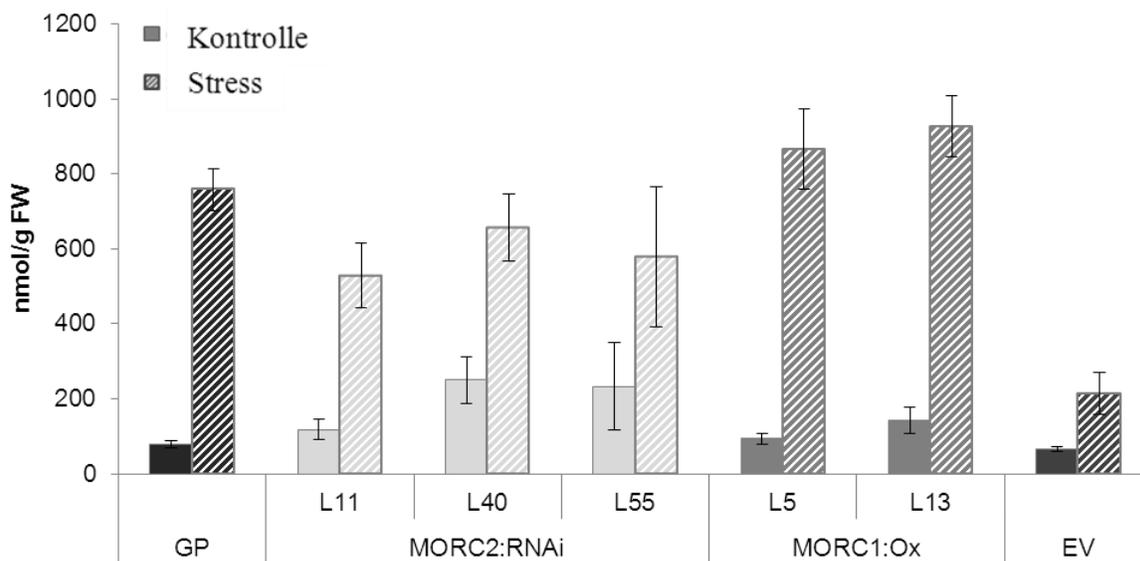
Die *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen hatten in einem ersten Experiment eine erhöhte Toleranz gegenüber der osmotischen Komponente von Salzstress gezeigt, was anhand einer geringeren Einbuße der Blattelongationsrate innerhalb der ersten sechs Tage nach Applikation von 2% NaCl relativ zum Wildtyp *Golden Promise* zu erkennen ist (Abbildung 9).



**Abbildung 10.** Prolingehalte nach neun Tagen Bewässerung mit 2% NaCl.

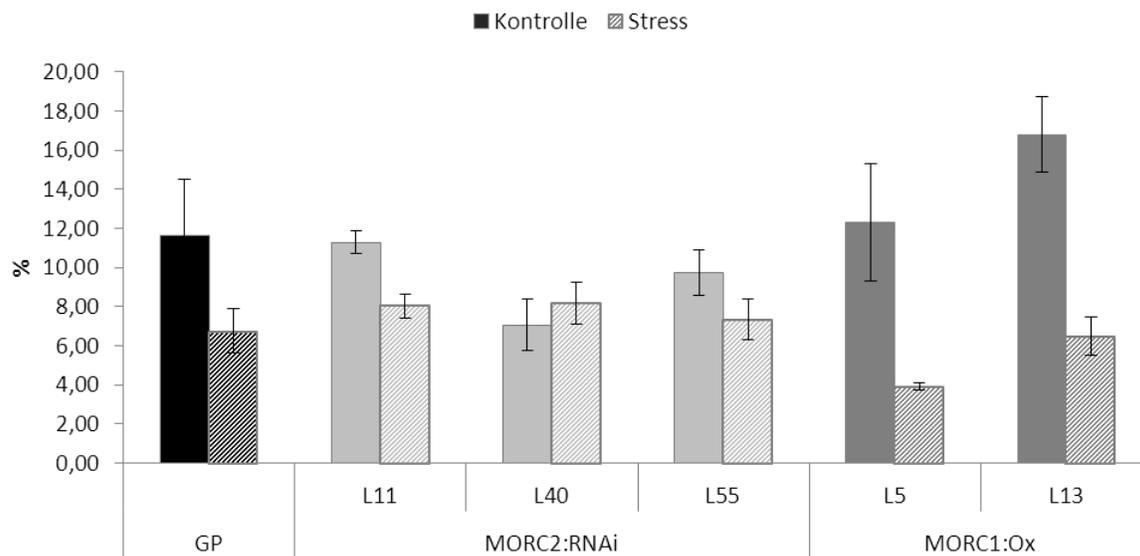
Kontrolle – gefüllte Balken; 9d Salzstress – gestrichelte Balken. Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; dunkelgrau: MORC1-Ox – zwei unabhängige Linien L5 und L13. N=4. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Um die physiologische Grundlage der erhöhten osmotischen Stresstoleranz zu ergründen wurden gestresste und ungestresste Pflanzen aller Genotypen einem Metabolit-Profilung 9 Tage nach Beginn der Stressapplikation unterzogen. Unter initialem Salzstress zeigten die *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen einen geringeren Gehalt der osmoprotektiven Aminosäure Prolin (Abbildung 10) und eine geringere Erhöhung des Asparagingehalts, einem Zeiger für Zuckermangel (Abbildung 11). Beide Metabolite deuteten auf einen geringeren Grad an osmotischem Stress in den *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen hin. Ebenso ließ der geringere Abfall des Glycin/Serin-Verhältnisses in gestressten *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen auf eine Beibehaltung der Photosyntheserate unter osmotischem Stress schliessen (Abbildung 12).



**Abbildung 11.** Asparagingehalte nach neun Tagen Bewässerung mit 2% NaCl.

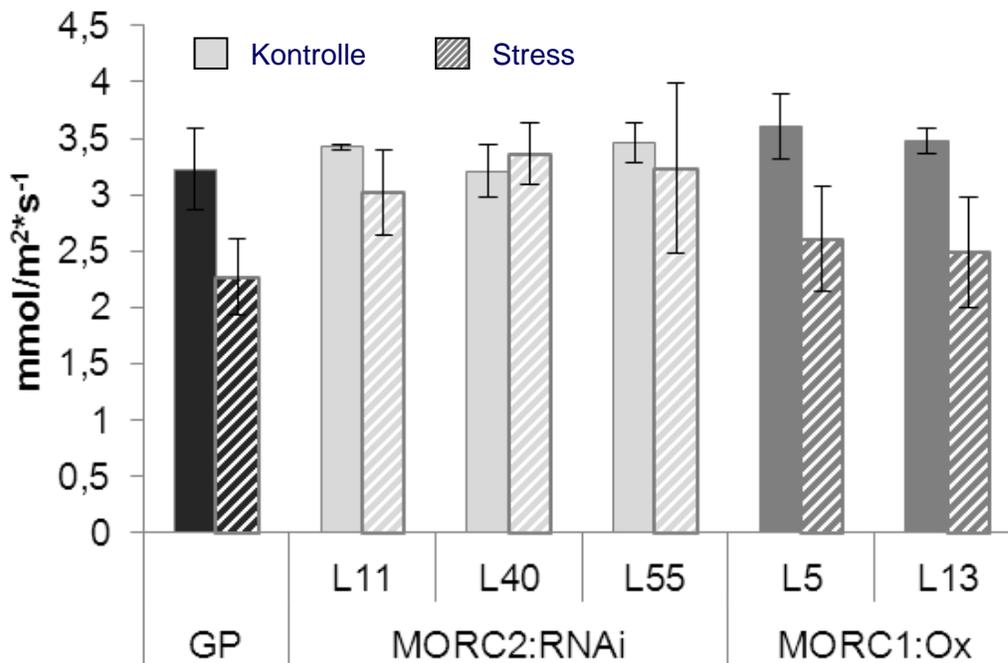
Kontrolle – gefüllte Balken; 9d Salzstress – gestrichelte Balken. Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; dunkelgrau: *MORC1-Ox* – zwei unabhängige Linien L5 und L13. N=4. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.



**Abbildung 12.** Glycin/ Serin-Verhältnis in % nach neun Tagen Bewässerung mit 2% NaCl.

Kontrolle – gefüllte Balken; 9d Salzstress – gestrichelte Balken. Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; dunkelgrau: *MORC1-Ox* – zwei unabhängige Linien L5 und L13. N=4. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Tatsächlich war die Transpirationsrate in den *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen im Vergleich zu allen anderen Genotypen unter Salzstress nicht abfällt (Abbildung 13). Diese Beobachtung untermauert die oben geäußerte Vermutung, dass sich die Photosynthese salzgestresster *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen von denen der anderen Genotypen unterscheidet.

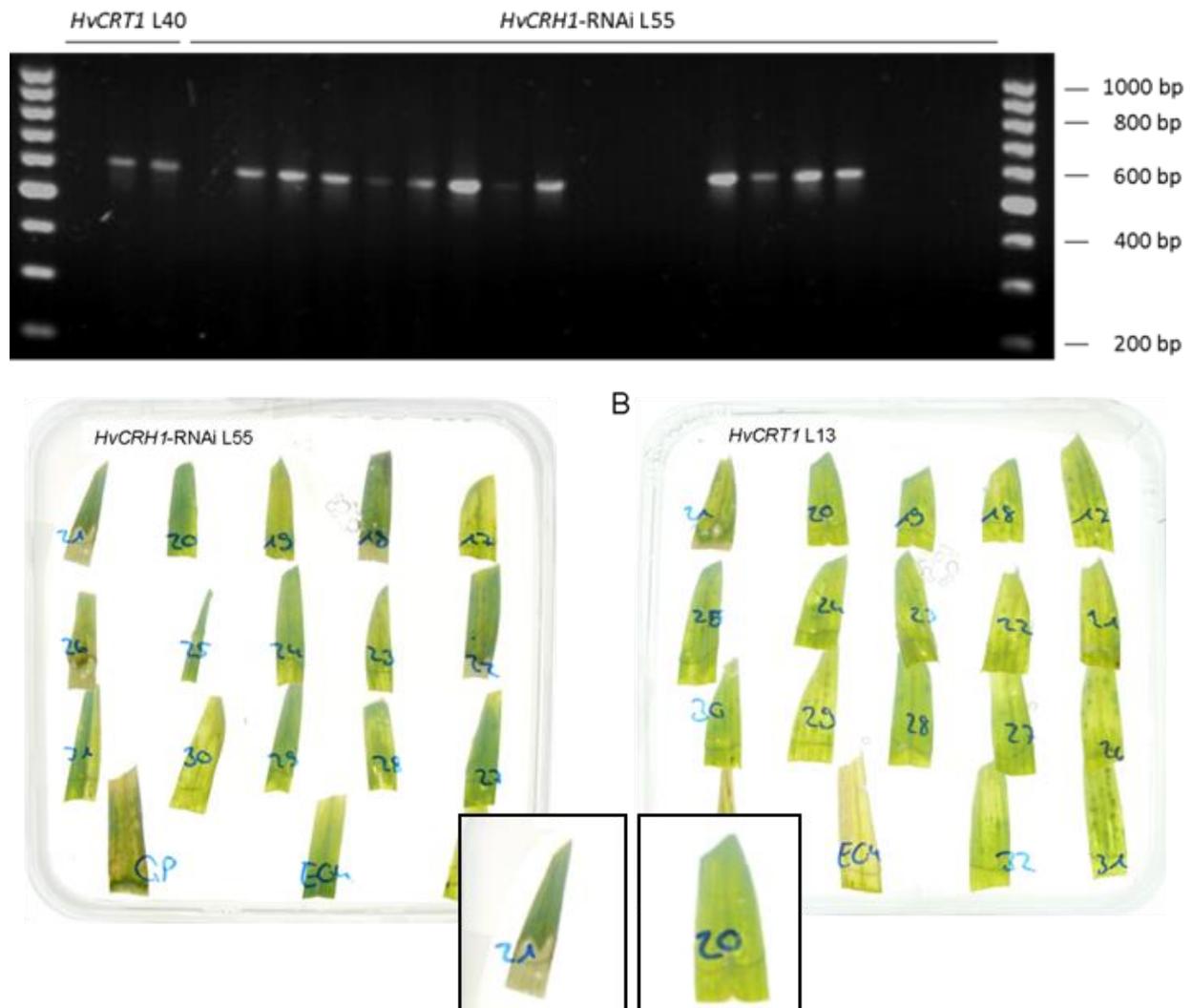


**Abbildung 13.** Transpirationsrate  $E$  (in  $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) von Gerstenblättern nach 9 Tagen Bewässerung mit 2% NaCl.

Kontrolle – gefüllte Balken; 9d Salzstress – gestrichelte Balken. Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; dunkelgrau: *MORC1:Ox* – zwei unabhängige Linien L5 und L13.  $N=4$ . Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

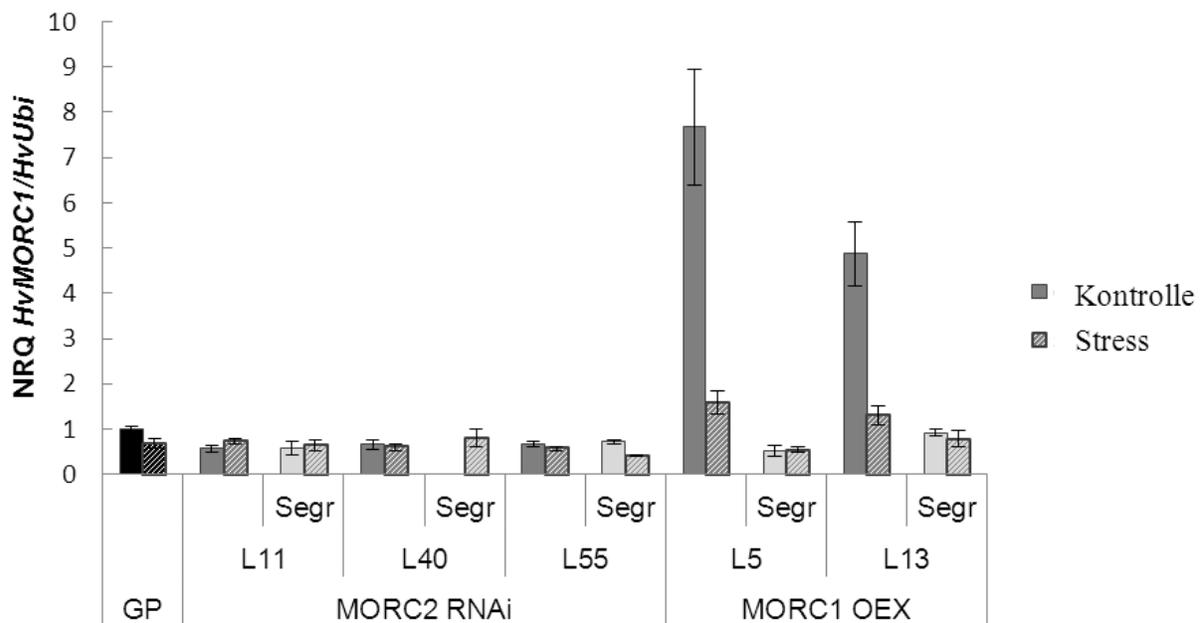
Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse zielten die Arbeiten im letzten Jahr der Förderung darauf ab, die Beobachtungen an den *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen zu verifizieren und die physiologische und molekulare Grundlage der möglicherweise erhöhten osmotischen Stresstoleranz der Transgenen aufzuklären. Da es bekannt ist, dass Mutterpflanzen über epigenetische Mechanismen stress-vermittelte Genexpressionsmuster an die Filialgeneration weitergeben war es wichtig, für die nächsten Experimente noch bessere Kontrollen als den *Golden Promise* Wildtyp zu verwenden. Daher wurden nachfolgend Wildtyp-Segreganten der *HvMORC2:RNAi*-

Transgenen als Kontrollen verwendet, die an denselben Mutterpflanzen gereift waren und sich nur durch die Abwesenheit des *HvMORC2:RNAi*-Konstruktes von den *HvMORC2:RNAi*-Transgenen unterschieden. Die Selektion dieser Segreganten erfolgte doppelt abgesichert: sowohl die Ergebnisse von Hygromycin-Blatt-Resistenz-Tests als auch die Genotypisierung der Individuen per PCR wurden hinzugezogen (Abbildung 14).

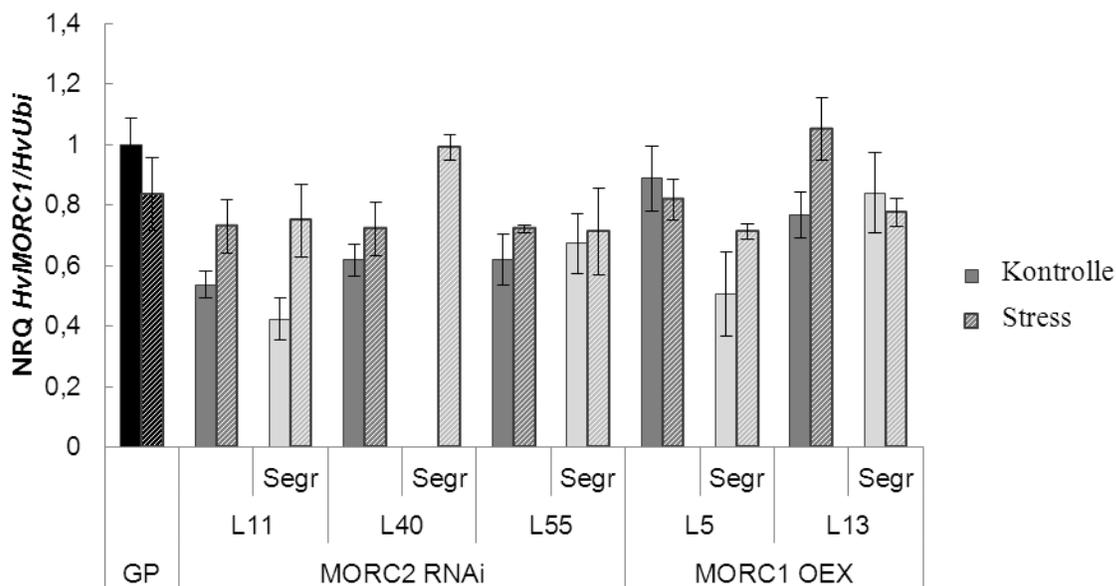


**Abbildung 14.** Screening der *HvMORC2:RNAi* (*HvCRH1-RNAi*) und MORC1-Ox (*HvCRT1-Ox*) Nachkommen per PCR auf den Hygromycin-Resistenz-Marker (A) und über den Hygromycin-Blatttest (B). (A) Das amplifizierte PCR-Fragment hat eine Größe von ca. 600 bp. (B) Blattsegmente suszeptibler Individuen zeigen Nekrosen am Blattansatz (vergrößertes Ausschnitt von Pflanze Nr. 20), die bei Hygromycin-resistenten Individuen ausbleiben (vergrößertes Ausschnitt von Pflanze Nr. 21).

Die Untersuchungen wurden an Individuen aus der T3-Generation durchgeführt, die sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach 9 Tagen Salzstress (2% NaCl im Gießwasser) beprobt worden waren. Im Vergleich zu allen Kontrollen, inkl. der Wildtyp-Segreganten, zeigten die *HvMORC1*-Überexprimierer etwa 5- bis 8-fach höhere Transkriptmengen von *HvMORC1* unter Kontrollbedingungen (Abbildung 15). Dies ist halbwegs konsistent mit den Beobachtungen an *HvMORC1*-OEX-Pflanzen aus der T1- und T2-Generation (Langen et al., 2014), die eine 10-fach erhöhte *HvMORC1*-Transkriptmenge in den Transgenen berichteten. Die *HvMORC1*-Transkriptmenge in den Überexprimierern war unter Salzstress jedoch nur noch doppelt so hoch wie in den Kontrollen (Abbildung 15).

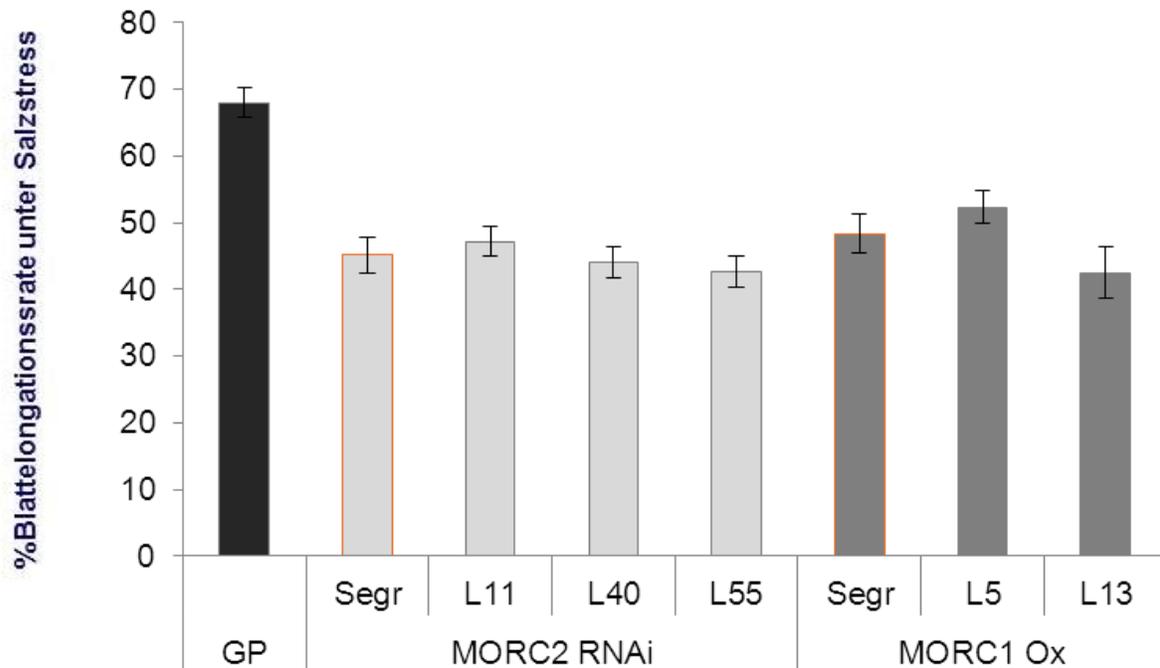


**Abbildung 15. Transkriptmenge von *HvMORC1* in Blättern von Gerstenpflanzen am Ende der vegetativen Phase.** Kontrolle – gefüllte Balken; 9d Salzstress – gestrichelte Balken. Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; dunkelgrau: *MORC1-OEX* – zwei unabhängige Linien L5 und L13. Die *HvMORC1*-Transkriptmenge ist auf Ubiquitin (*HvUbi*) normiert und für die Segreganten (Segr) immer rechts des Trennstriches angegeben. N=4-6. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.



**Abbildung 16. Transkriptmenge von *HvMORC2* in Blättern von Gerstenpflanzen am Ende der vegetativen Phase.** Kontrolle – gefüllte Balken; 9d Salzstress – gestrichelte Balken. Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55. Die *HvMORC2*-Transkriptmenge ist auf Ubiquitin (*HvUbi*) normiert und für die Segreganten (Segr) immer rechts des Trennstriches angegeben. N=4-6. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

In den *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen war erstaunlicherweise die *HvMORC2*-Transkriptmenge nicht signifikant verschieden von den jeweiligen Segreganten (Abbildung 16). Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass die posttranskriptionelle Stilllegung von *HvMORC2* in den untersuchten T3-Pflanzen im Vergleich zu den Vorgenerationen verloren gegangen ist (Langen et al., 2014). Leider war nicht mehr ausreichend Saatgut von T1- und T2-Pflanzen am IPAZ Gießen verfügbar, so dass das Experiment nicht noch einmal mit geeignetem Pflanzenmaterial wiederholt werden konnte. Interessanterweise war die *HvMORC2*-Transkriptmenge in allen T3-Pflanzen, also auch den Wildtyp-Segreganten, signifikant geringer als im Wildtyp *Golden Promise* (Abbildung 16), der unabhängig angezogen wurde. Dies unterstützt die eingangs getätigte Aussage, dass die Genexpression auch durch Umweltfaktoren beeinflusst wird, die auf die Mutterpflanze eingewirkt haben.



**Abbildung 17. Verminderung der Blattelongationsrate von Gerstenblättern in den ersten 6 Tagen unter Salzstress** (Gießen mit 2% NaCl). Schwarz: *Golden Promise* – Wildtyp; hellgrau: *HvMORC2:RNAi* – drei unabhängige Linien L11, L40 und L55; Segr – gemittelte Daten über alle *HvMORC2:RNAi*-Segreganten. Dunkelgrau: *MORC1-Ox* – zwei unabhängige Linien L5 und L13. Segr – gemittelte Daten über alle *MORC1-Ox*-Segreganten. N=6-12. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Dieses Experiment stellt eine Wiederholung des in Abbildung 1 gezeigten Experimentes dar.

Parallel zur Analyse der Transkriptmengen (s. Abbildungen 15 und 16) waren bereits Messungen der Blattelongationsraten erfolgt, um die in Abbildung 9 dargestellten Daten zu reproduzieren, die eine erhöhte Toleranz der *HvMORC2:RNAi*-Pflanzen gegenüber osmotischem Stress suggeriert hatten. Da zwischen den Wildtyp-Segreganten und den *HvMORC2:RNAi*-Transgenen in dieser zweiten Anzucht keine Unterschiede in den *HvMORC2*-Transkriptmengen gemessen werden konnten (s. Abbildung 16), unterschieden sich die Blattelongationsraten zwischen den jeweiligen Wildtyp-Segreganten und den Transgenen erwartungsgemäß nicht (Abbildung 17). Auch die *HvMORC1*-Überexpressionslinien zeigten keine veränderte Blattelongationsrate im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Segreganten (Abbildung 17).

Die Untersuchung der Salzstresstoleranz von Gerstenpflanzen mit veränderter Expression von *HvMORC*-Genen wurde daraufhin eingestellt, da die Suppression der *HvMORC2*-Expression auch in den am IPAZ Gießen vorhandenen T3-Linien beobachtet

wurde (Gregor Langen, persönliche Mitteilung während eines Projekttreffens). Die Selektion neuer T3-Linien am IPAZ Gießen war innerhalb der Projektlaufzeit nicht mehr möglich.

### Zitierte Literatur

- Abbasi AR, Saur A, Hennig P, Tschiersch H, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2009) Tocopherol deficiency in transgenic tobacco plants leads to accelerated senescence. *Plant Cell Environ.* 32: 144-157
- Doehlemann G, Wahl R, Horst R, Voll LM, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kühnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, Kaemper J. (2008) Reprogramming a maize plant: Transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J.* 56: 181-195
- Horst RJ, Doehlemann G, Wahl R, Kahmann R, Kämper J, Sonnewald U, Voll LM (2010) *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. *Plant Physiol.* 152: 293-308
- Imani J, Li L, Schäfer P, Kogel KH (2011) STARTS – a stable root transformation system for rapid functional analysis of proteins of the monocot model plant barley. *Plant J.* 67: 726
- Kang HG, Choi HW, von Einem S, Manosalva P, Ehlers K, Liu PP, Buxa SV, Moreau M, Mang HG, Kachroo P, Kogel KH, Klessig DF (2012) CRT1 is a nuclear-translocated MORC endonuclease that participates in multiple levels of plant immunity. *Nature Comm.* 3: 1297
- Langen G, von Einem S, Koch A, Imani J, Pai SB, Manohar M, Ehlers K, Choi HW, Claar M, Schmit R, Mang HG, Bordiya Y, Kang HG, Klessig DF, Kogel KH (2014) The Compromised Recognition of Turnip Crinkle Virus1 subfamily of Microorchidia ATPases regulates disease resistance in barley to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant Physiol.* 164: 866
- Lee SK, Jeon JS, Börnke F, Voll LM, Cho JI, Goh CH, Jeong SW, Park YI, Kim SJ, Choi SB, Miyao A, Hirochika H, An G, Cho MH, Bhoo SH, Sonnewald U, Hahn TR (2008) Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Environ.* 31: 1851–1863
- Moissard G, Cokus SJ, Cary J, Feng S, Billi AC, Stroud H, Husman D, Zhan Y, Lajoie BR, McCord RP, Hale CJ, Feng W, Michaelis SD, Frand AR, Pellegrini M, Dekker J, Kim JK, Jacobsen SE (2012) MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing. *Science* 336: 1448
- Voll LM, Hajirezaei MR, Czogalla-Peter C, Lein W, Stitt M, Sonnewald U, Börnke F (2009) Antisense inhibition of enolase strongly limits metabolism of aromatic amino acids but has only minor effects on respiration in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *New Phytol.* 184: 607-618

## II.2. des voraussichtlichen Nutzens und der Verwertbarkeit des Ergebnisses

Gerstenpflanzen mit veränderter Expression von *HvMORC2*-Genen bergen ein hohes Potential eine gesteigerte Resistenz gegenüber mikrobiellen Pathogenen mit einer erhöhten Toleranz gegenüber abiotischem Stress wie Salzstress zu vereinen. Partner 1 (IPAZ Gießen) hat bereits im Rahmen des CEREAL ROOTS-Projektes begonnen, neue *HvMORC2:RNAi*-Linien zu selektieren, um deren Nachkommen in der T2- und T3-Generation auf eine stabile Suppression von *HvMORC2* zu untersuchen. Dieser Vorgang war bis zum Laufzeitende des Projektes jedoch noch nicht abgeschlossen. Die eingehende physiologische und phytopathologische Untersuchung neuer *HvMORC2:RNAi*-Linien wird notwendigerweise außerhalb des CEREAL ROOTS-Projektes erfolgen müssen; der Ansatz hat jedoch von seinem Verwertungspotential nichts eingebüßt.

## II.3. des während der Durchführung bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Vorhabensgebiet

Es sind unseres Wissens nach keine Ergebnisse bekannt geworden, die einen direkten Bezug zu den drei verfolgten Ansätzen haben.

## II.4. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichung des Ergebnisses

Da über die im Rahmen von CEREAL ROOTS erzielten Ergebnisse keine Gene identifiziert werden konnten, die eine erhöhte Salzstresstoleranz bzw. kombinierte Stresstoleranz in Gerste vermitteln, können die erzielten Daten nicht in Fachjournalen veröffentlicht werden. Es jedoch gut denkbar, dass weitere Arbeiten an *HvMORC2:RNAi*-Linien zügig Publikationsfähigkeit erreichen.