



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Schlussbericht gemäß Nr. 8.2 NKBF  
Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

Pflanzenbiotechnologie – Verbundvorhaben:  
**Precision Breeding for Yield Gain in Oilseed Rape (Pre-BreedYield)**  
Teilprojekt J

**Förderkennzeichen:** 0315964J

**Zuwendungsempfänger:** Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung  
(IPK) Gatersleben, Corrensstraße 3, 06466 Stadt Seeland

**Ausführende Stelle:** IPK Gatersleben

**Projektleiter:** Prof. Dr. Nicolaus von Wirén, Dr. Uwe Scholz

**Projektlaufzeit:** 01.09.2011 bis 31.05.2015 (zuwendungsneutrale Verlängerung)

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315964J gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.“

## **I. Kurzdarstellung**

### **1. Aufgabenstellung**

Das zentrale Ziel dieses Projekts war die Entwicklung und Implementierung einer diversitären Kollektion von Rapslinien, welche passend zu den einzelnen Projektzielen, „omics“-Technologien und präzisen Phänotypisierungsstrategien zusammengestellt wurde. Dadurch sollte die Entwicklung neuer kommerzieller Elite-Sorten unterstützt werden. Am IPK wurden dazu folgende pflanzenphysiologische (AG von Wirén) und bioinformatische (AG Scholz) Projektziele verfolgt:

#### **AG von Wirén:**

1. Einfluss von N-Formen auf Ertragsbildung in Pre-Breeding Linien und deren Reaktionsfähigkeit auf N-regulierte Pflanzenentwicklung sowie Charakterisierung von N-Pools zum Erntezeitpunkt
2. Einfluss von N-Formen auf Ertragsbildung in Elitelinien und deren Reaktionsfähigkeit auf N-regulierte Pflanzenentwicklung sowie Charakterisierung von N-Pools zum Erntezeitpunkt
3. Beschreibung der N-abhängigen Regulation der Wurzelaktivität durch Cytokinine und deren Einfluss auf die N-Allokation im Sproß
4. N-düngungsabhängige Ertragsbildung in Elitelinien und der Einfluss der Wurzelaktivität auf die Größe von pflanzlichen N-Pools

#### **AG Scholz:**

1. Analyse von Resequenzierungsdaten der Pre-Breeding Kollektion
2. Mapping auf das *B. napus* Referenzgenom und Reassemblierung von potentiell neu arrangierten Genomen von 50 ausgewählten exotischen/resynthetisierten Zuchtlinien
3. Daten-Sammlung sowie –Import in operative Datenbanken beziehungsweise in ein spezifisches Data Warehouse
4. Management eines Metadaten-Repositories

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

Für eine effiziente Stickstoff (N)-Aufnahme und Ertragsbildung bei Winterraps (AG von Wirén) spielt die N-Aufnahme nach der Blüte eine wichtige Rolle. In diesem Entwicklungszeitraum nimmt allerdings die Wurzelaktivität stark ab, wodurch die N-Aufnahme erschwert wird. In genetisch diversen Pre-Breeding- und Elitelinien sollte die genotypische Variabilität in der Wurzelaktivität zu verschiedenen Entwicklungsstadien vor, während und nach der Blüte bewertet werden. Als Marker für die Wurzelaktivität sollte die Translokationsrate der Cytokinine im Xylemsaft genutzt werden. Zwei verschiedene N-Formen wurden zur Düngung eingesetzt, wobei Nitrat die Cytokininbildung in der Wurzel stimuliert und Harnstoff eher diese unterdrückt und beschleunigend auf die Pflanzenseneszenz wirkt. Dabei wurde auf die in der AG von Wirén etablierte Phytohormon- und Metabolitplattform sowie auf Erfahrungen im Feldversuchswesen zurückgegriffen. Die genetisch diversen Rapslinien wurden von den Wirtschaftspartnern zusammengestellt und umfassten neben den Elitelinien auch alte Landrassen, Resynthesen und adaptiertes Material.

Für die Entwicklung der Datenbank (AG Scholz) wurde auf Arbeiten aus dem GABI-GENOBAR Projekt zurückgegriffen, in dessen Rahmen ein Data Warehouse entwickelt wurde.

Während der gesamten Projektphase bestand eine enge Zusammenarbeit zwischen den akademischen Partnern und Züchtungsunternehmen.

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

Das Gesamtprojekt wurde in 5 Arbeitspakete unterteilt. Das IPK war an der Bearbeitung der Arbeitspakete WP2, WP3 und WP5 beteiligt.

Im Arbeitspaket WP2 (AG von Wirén) wurden alle im Projektplan vorgesehenen Feldversuche in den Jahren 2011/2012, 2012/2013 und 2013/2014 durchgeführt. Alle Feldversuche wurden zweifach angelegt, wobei jeweils eine Versuchsanlage bis zur Samenernte unberührt blieb und die andere für die destruktive Probenahme von Xylemsaft und oberirdischem Pflanzenmaterial genutzt wurde. Analysen des geernteten Pflanzenmaterials wurden in den Wintermonaten durchgeführt. Diese umfassten Cytokininextraktionen aus Xylemsaft und anschließende Analyse mittels UPLC-MS/MS, Bestimmung verschiedener N-Formen im Xylemsaft (Ammonium und Aminosäuren mittels UPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion des an die zu trennenden Moleküle derivatisierten Farbstoffs ACQ; Nitrat und Harnstoff mittels spektrophotometrischem Nachweis; Gesamt-N mittels Elementaranalyse), Kalium-Bestimmung im Xylemsaft mittels ICP-OES, N-Verteilung in den oberirdischen Pflanzenorganen durch N-Bestimmung in getrockneten, gemahlten Proben mittels Elementaranalyse, Ertragsanalyse durch Wiegen des geernteten Saatgutes.

Im Arbeitspaket WP3 arbeitete die AG Scholz vorwiegend mit der AG Snowdon (Universität Gießen) zusammen. Hier wurden folgende Meilensteine für die AG Scholz definiert:

- Durchführung der Sequenzanalyse
- In-silico SNP-Erkennung und Validierung

Das Arbeitspaket WP5 wurde in Zusammenarbeit der AG Scholz mit der German Seed Alliance (GSA) bearbeitet. Dabei wurden folgende Meilensteine definiert:

- Anpassung eines Datenmanagementsystems
- Entwicklung einer Datenimport-Pipeline und Testen der entwickelten Anwendungen
- Datenanfrage sowie Datenablage in die Datenbank

### **4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Alle durchgeführten Arbeiten der AG von Wirén bauten auf ihren langjährigen Erfahrungen in der Charakterisierung des Einflusses von Nährstoffen auf die Physiologie von Nutzpflanzen auf. Zur Verwendung kamen selbst entwickelte Methoden und Messverfahren in der Elementanalytik oder kommerziell erhältliche bzw. frei zugängliche Software- und Freeware-Dienste wie z.B. PubMed, SigmaPlot, EndNote, etc. sowie die wissenschaftlichen Publikationen im Bereich der pflanzenphysiologischen Forschung.

In der AG Scholz wurde in den letzten zehn Jahren eine umfangreiche Expertise sowohl auf dem Gebiet der Sequenzanalyse als auch auf dem Gebiet der Datenbankentwicklung aufgebaut.

Im Bereich Datenbanken wurden im Laufe der Jahre verschiedene Anwendungen entwickelt und kontinuierlich publiziert (vgl. Kuenne et al. 2005, Schreiber et al. 2012 und Colmsee et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeiten flossen unter anderem in die Entwicklung im Pre-BreedYield-Projekt ein. Das IPK setzt bei all diesen Entwicklungen auf das kommerzielle Datenbankmanagementsystem von ORACLE. Zur Entwicklung von Benutzungsoberflächen wurde am IPK ORACLE Application Express (APEX) eingesetzt. Der Einsatz dieser Software sowie die Wartung und Aktualisierung dieses Systems durch IPK-finanziertes Personal stellt eine langfristige Wartbarkeit der am IPK entwickelten Anwendungen sicher. Ferner wurde durch den Einsatz dieser standardisierten Technik eine Inhouse-Expertise bei den Mitarbeitern aufgebaut, welche die Umsetzung zukünftiger Projekte dieser Art erleichtert. Dies trägt auch zur Nachhaltigkeit der im Pre-BreedYield-Projekt entwickelten Lösungen bei.

Die Integration heterogener Daten stellt einen besonderen Schwerpunkt in der Arbeitsgruppe dar. Hier wurden unter anderem Techniken zum Handling von verschiedenen Datendomänen (z.B. Marker, Traits) und zum Aufbau von Data Warehouses entwickelt (vgl. Weise et al. 2009). Während der Laufzeit des Pre-BreedYield-Vorhabens wurden weitere webbasierte Benutzungsoberflächen und Datenbanken neu- beziehungsweise weiterentwickelt. Mit der oben beschriebenen Technologie wurden weitere Systeme aufgebaut und publiziert (Schreiber et al. 2012 und Colmsee et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in Pre-BreedYield berücksichtigt.

Im Bereich der Sequenzanalyse hat die AG Scholz in den vergangenen Jahren in verschiedenen Projekten Expertise aufgebaut. So wurden Sequenzdaten sowohl für verschiedene Nutzpflanzen als auch für verschiedene Technologieplattformen analysiert. Im GABI-BARLEX Projekt wurden beispielsweise Assemblies von 454 und Illumina Daten in Gerste durchgeführt (Taudien et al 2011). Basierend auf den Illumina-Daten wurden verschiedene Mapping-Strategien verwendet und entsprechend angepasst, um Polymorphismen zwischen verschiedenen Genotypen zu entdecken. In nachfolgenden Projekten wurden die Arbeiten an der Gerstensequenzierung fortgesetzt, in der das IPK und die AG Scholz weiterhin involviert sind (International Barley Genome Sequencing Consortium 2012, Ariyadasa et al. 2014). Ferner besteht auch Erfahrung mit der Assemblierung von Transkriptdaten (cDNA) für Roggen, welche im GABI-RyeEXPRESS durchgeführt wurde. Hier wurden basierend auf verschiedenen Assemblierungsstrategien eine in-silico Marker-Vorhersage zum Entwurf eines SNP-Arrays sowie die Definition eines Unigene Sets für Roggen implementiert (Haseneyer et al. 2011).

#### **Referenzen:**

- Ariyadasa R, Mascher M, Nussbaumer T, Schulte D, Frenkel Z, Poursarebani N, Zhou R, Steuernagel B, Gundlach H, Taudien S et al. (2014) A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms. *Plant Physiol.* 164(1), 412-423.
- Colmsee C, Beier S, Himmelbach A, Schmutzer T, Stein N, Scholz U, Mascher M (2015) BARLEX - the barley draft genome explorer. *Mol. Plant* 8:964-966.
- Colmsee C, Mascher M, Czauderna T, Hartmann A, Schlüter U, Zellerhoff N, Schmitz J, Bräutigam A, Pick T R, Alter P, Gahrtz M, Witt S, Fernie A R, Börnke F, Fahnenstich H, Bucher M, Dresselhaus T, Weber A P, Schreiber F, Scholz U, Sonnewald U (2012) OPTIMAS-DW: A comprehensive transcriptomics, metabolomics, ionomics, proteomics and phenomics data resource for maize. *BMC Plant Biol.* 12: 245.
- Haseneyer G, Schmutzer T, Seidel M, Zhou R, Mascher M, Schön 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 Biol.* 11:131.
- International Barley Genome Sequencing Consortium. (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711-716.

- Kuenne C, Lange M, Funke T, Miede H, Grosse I, Scholz U (2005) CR-EST: a resource for crop ESTs. *Nucleic Acids Research* 33(Database issue):D619–D621.
- Schreiber F, Colmsee C, Czauderna T, Grafahrend-Belau E, Hartmann A, Junker A, Junker B H, Klapperstück M, Scholz U, Weise S (2012) MetaCrop 2.0: managing and exploring information about crop plant metabolism. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue):D1173-D1177.
- Taudien S, Steuernagel B, Ariyadasa R, Schulte D, Schmutzer T, Groth M, Felder M, Petzold A, Scholz U, Mayer K, Stein N, Platzer M (2011) Sequencing of BAC pools by different next generation sequencing platforms and strategies. *BMC Research Notes* 4:411.
- Weise S, Colmsee C, Grafahrend-Belau E, Junker BH, Klukas C, Lange M, Scholz U, Schreiber F (2009) An integration and analysis pipeline for systems biology in crop plant metabolism. In: *Data Integration in the Life Sciences, 6th International Workshop, DILS 2009, Manchester, UK, vol. 5647 of Lecture Notes in Bioinformatics, Springer, pp. 196-203.*

## **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Im Rahmen des Projektes arbeitete das IPK mit folgenden Institutionen oder Wirtschaftspartnern zusammen: German Seed Alliance GmbH (GSA), Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ), Deutsche Saatveredelung AG (DSV), KWS SAAT SE (KWS), Limagrain GmbH, Syngenta Seeds GmbH, Bayer CropScience Raps GmbH, Justus-Liebig-Universität Gießen (UGI), Georg-August-Universität Göttingen (UGö), Forschungszentrum Jülich GmbH (FZJ), Max Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ), Köln, Universität Bonn, Julius Kühn-Institut Quedlinburg (JKI). Die Projektkoordination hatte der Industriepartner German Seed Alliance (GSA).

Darüber hinaus erfolgte im Arbeitspaket WP5 eine Zusammenarbeit mit dem ebenfalls im Rahmen des Programms „Biotechnologie“ vom BMBF geförderten Vorhaben BARSELECT (FKZ 031569D). In beiden Projekten wurden Informationssysteme zum Management von Daten aus verschiedenen Datendomänen vom Partner IPK (AG Scholz) entwickelt. Um Synergieeffekte zu nutzen und Doppelentwicklungen zu vermeiden, erfolgte eine Abstimmung bezüglich der verwendeten Templates zum Datenimport, bei der Entwicklung der Datenbankstrukturen sowie bei der Entwicklung der webbasierten Benutzeroberfläche. Zusätzlich wurden die Erkenntnisse aus den anderen Aktivitäten der AG Scholz, wie im Abschnitt I.4 beschrieben, berücksichtigt.

## II. Eingehende Darstellung

### **1. Verwendung der Zuwendung und die erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele**

#### **Arbeitspaket WP2: Phenotyping**

##### *1. Einfluss von N-Formen auf Ertragsbildung in Pre-Breeding Linien und deren Reaktionsfähigkeit auf N-regulierte Pflanzenentwicklung sowie Charakterisierung von N-Pools zum Erntezeitpunkt*

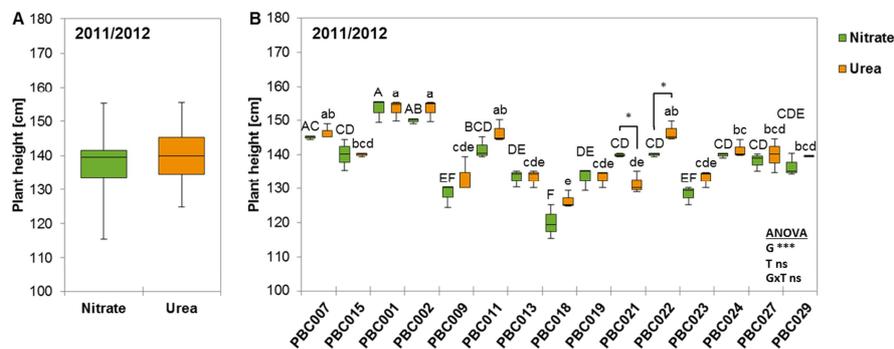
Für diesen Versuch wurden 15 Linien aus der Pre-BreedYield Basiskollektion im Feldversuch 2011/2012 angebaut. Gedüngt wurden alle Parzellen im Herbst 2011 mit Ammoniumsulfat in einer Aufwandmenge von 20 kg N ha<sup>-1</sup>. Zu den Frühjahrsdüngungen 2012 wurden dann Ammoniumnitrat bzw. Harnstoff mit Ureaseinhibitor als kontrastierende N-Düngevarianten appliziert. Dabei stellt Ammoniumnitrat (im Folgenden „Nitrat“) eine Nitrat-lastige Form der N-Ernährung dar, da das Nitrat dieser Düngeform direkt von Wurzeln aufgenommen wird und das Ammonium entweder an den negativ geladenen Bodenpartikeln sorbiert und/oder rasch zu Nitrat nitrifiziert wird (Jensen, 2006). Harnstoffdünger wird durch den Zusatz eines Ureaseinhibitors für einige Tage vor schnellem Abbau durch im Boden allgegenwärtige Ureasen geschützt und wirkt daher als Harnstoff-lastige Ernährung. Da beide Düngevarianten in der gleichen N-Aufwandmenge appliziert wurden (1. Frühjahrsgabe mit 40 kg N ha<sup>-1</sup>, 2. Frühjahrsgabe mit 60 kg N ha<sup>-1</sup>), ist ein direkter Vergleich der Wirkung beider N-Formen auf die Pflanzenentwicklung und Ertragsbildung möglich.

Innerhalb der 15 Genotypen gab es deutliche phänotypische Unterschiede im Feldaufgang, in der Winterhärte, in der Wuchshöhe sowie in Blühbeginn und -dauer, die in regelmäßigen Bonituren erfasst wurden. Da Feldaufgang und Winterhärte vor Beginn der Behandlung mit verschiedenen N-Formen aufgenommen wurden, wurde hier kein Einfluss der Düngung beschrieben. Die Blühperiode wurde in einzelnen Genotypen nur tendenziell durch die applizierte N-Form beeinflusst, jedoch verkürzte Harnstoff im Mittel die Blühdauer um einen Tag (t-Test; p<0,05; n=45), was für eine Seneszenz-fördernde Wirkung von Harnstoff im Vergleich zu Nitrat spricht (Schildhauer *et al.*, 2008). Die Wuchshöhe der Pflanzen war im Mittel ca. 0,1 m höher unter Harnstoffbedingungen im Vergleich zu Nitrat (Abbildung 1), wobei im Gegenzug nitratbehandelte Pflanzen durchschnittlich einen Seitentrieb und 28 Schoten pro Pflanze mehr ausbildeten (Abbildung 2A, B, Daten für Schotenzahl pro Pflanze nicht gezeigt). Diese Verschiebung in der Pflanzenarchitektur könnte darauf zurückzuführen sein, dass Nitrat die Cytokinbildung in den Wurzeln stimulierte (Takei *et al.*, 2004) und in den Sproß exportierte Cytokine dort die Seitentriebabbildung anregten (Ongaro and Leyser, 2008). In der Tat führte Nitratdüngung zum Entwicklungsstadium BBCH59 im Populationsmittel zu einer signifikant höheren trans-Zeatinribosid (ZR)-Transportrate im Xylemsaft im Vergleich zur Harnstoffvariante (Abbildung 4 C, D). Da beide N-Formen nicht die Gesamt-N-Aufnahme in die oberirdischen Pflanzenorgane beeinflussten (Abbildung 3), scheinen harnstoffgedüngte Pflanzen den Stickstoff eher in Höhenwachstum als in Seitentriebabbildung investiert zu haben.

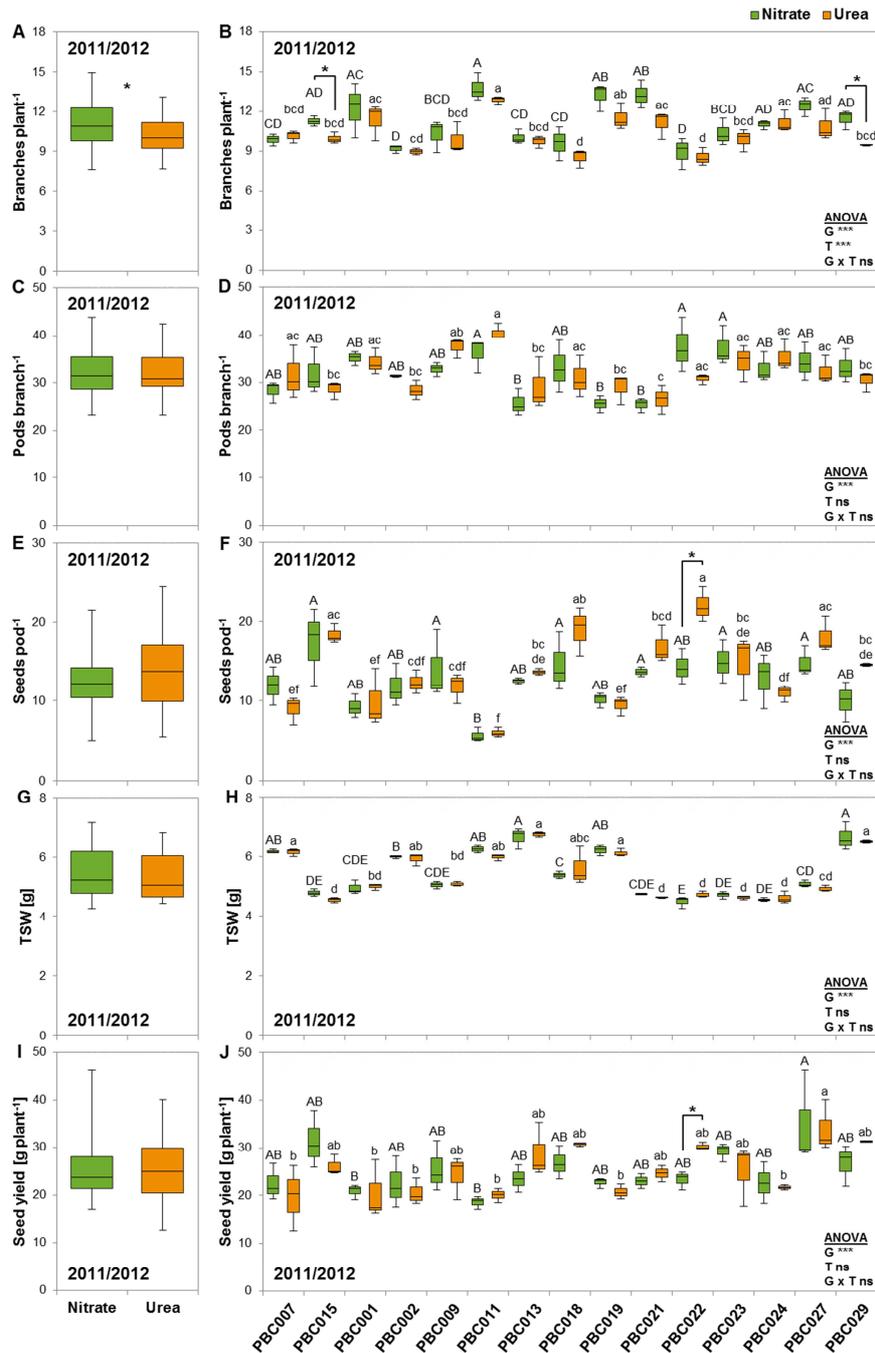
Auch die N-Verteilung im Sproß (Abbildung 3), gemessen zum Ende der Schotenentwicklung, wurde nicht durch die applizierte N-Form beeinflusst, obwohl im Populationsmittel harnstoffgedüngte Pflanzen tendenziell eine größere N-Menge in den

generativen Schoten aufwiesen und weniger N in den vegetativen Blättern, was auf einen Trend zu früherer N-Retranslokation aus vegetativen in generative Organe und damit früherer Seneszenz hinweist. Generell waren gegen Ende der Schotenentwicklung in beiden N-Varianten im Mittel 2/3 des Pflanzenstickstoffs in den Schoten zu finden.

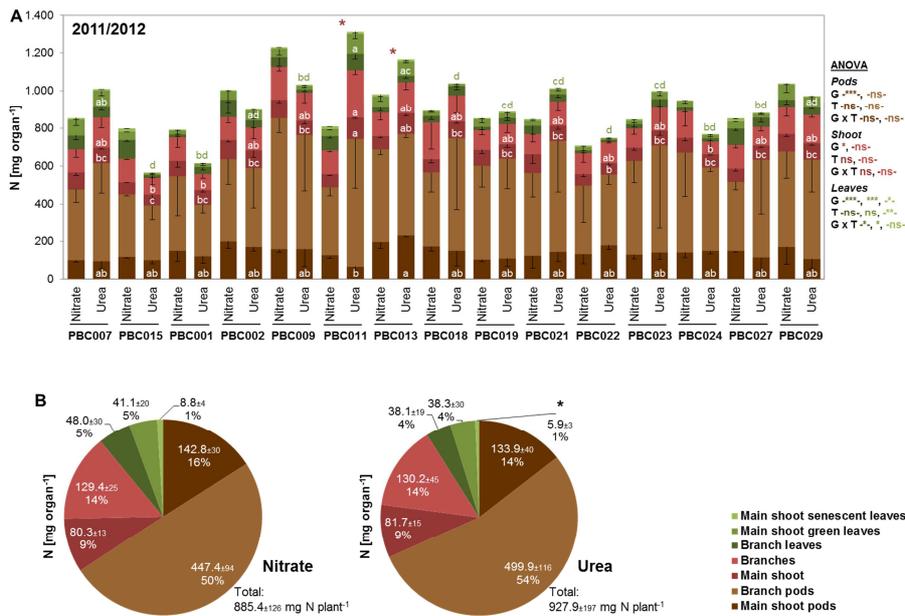
Wie aus Abbildung 2 (I, J) ersichtlich, wurde der Samenertrag pro Pflanze in der Pre-BreedYield Kollektion nicht durch die gedüngte N-Form beeinflusst. Lediglich ein Genotyp bildete einen höheren Ertrag unter Harnstoff im Vergleich zu Nitrat aus, wobei bei diesem Genotyp (unabhängig von der N-Form) in den später nitratgedüngten Parzellen signifikant mehr Pflanzen pro m<sup>2</sup> den Winter überlebten (Daten nicht gezeigt) und der niedrigere Samenertrag pro Pflanze auch auf Konkurrenzeffekte zurückzuführen sein könnte. Auch der Flächenertrag wurde nicht durch die N-Form beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Obwohl die pflanzenarchitektonischen Voraussetzungen unter Nitrat (mehr Seitentriebe und Schoten pro Pflanze) die potentielle Ertragsbildung erhöhen, stellte sich heraus, dass vor allem die Füllung der angelegten Schoten mit Samen (Abbildung 2 E, F) unter Nitrat niedriger war.



**Abbildung 1: Pflanzenhöhe in der Pre-BreedYield Kollektion 2011/2012 als Mittelwert über alle Genotypen (A) oder der einzelnen Genotypen (B) unter Nitrat (Nitrate) oder Harnstoff (Urea).** (A, B) Boxplots: Mediane, erstes und drittes Quartil; Whisker: Datenminimum und -maximum (A: n=45; B: n=3). Sterne: signifikante Mittelwertunterschiede zwischen Nitrat- und Harnstoffvariante (ungepaarter t-Test; p<0.05). (B) ANOVA \*, \*\* bzw. \*\*\*: signifikante Unterschiede oder Interaktionen bei p<0.05, p<0.01 bzw. p<0.001; G=Genotyp, T=N-Behandlung, ns=nicht signifikant. Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben: signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Genotypen innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test; p<0,05).



**Abbildung 2: Ertragskomponenten der Pre-BreedYield Kollektion 2011/2012 als Mittelwert über alle Genotypen (A, C, E, G, I) oder der einzelnen Genotypen (B, D, F, H, J) unter Nitrat (Nitrate) oder Harnstoff (Urea).** (A-J) Boxplots: Mediane, erstes und drittes Quartil; Whisker: Datenminimum und -maximum (A, C, E, G, I: n=45; B, D, F, H, J: n=3). Sterne: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen Nitrat- und Harnstoffvariante (ungepaarter t-Test [A, C, I, B, D, F, H, J] bzw. Mann-Whitney-Rangsummentest [E, G];  $p < 0.05$ ). (B, D, F, H, J) ANOVA \*, \*\* bzw. \*\*\*: signifikante Unterschiede oder Interaktionen bei  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  bzw.  $p < 0.001$ ; G=Genotyp, T=N-Behandlung, ns=nicht signifikant. Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben: signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Genotypen innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test;  $p < 0.05$ ).



**Abbildung 3: N-Verteilung innerhalb der oberirdischen Biomasse zu BBCH79 in einzelnen Genotypen (A) oder als Mittelwert über alle Genotypen (B) der Pre-BreedYield Kollektion 2011/2012 unter Nitrat (Nitrate) oder Harnstoff (Urea).** (A) Balken: Mittelwerte  $\pm$ SD (n=3). ANOVA oder ANOVA an Rängen (- -) \*, \*\* bzw. \*\*\*: signifikante Unterschiede oder Interaktionen bei  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  bzw.  $p < 0.001$ ; G=Genotyp, T=N-Behandlung, ns=nicht signifikant. Sterne im Organ-Farbcode: signifikante Mittelwertunterschiede (ungepaarter t-Test bei  $p < 0.05$ ) zwischen Nitrat- und Harnstoffvariante eines Genotyps. Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben im Balken: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen den Genotypen innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test [Nitrat: ■■■■; Harnstoff: ■■■■] bzw. Tukey's Test an Rängen [Nitrat: ■■■■; Harnstoff: ■■■■];  $p < 0.05$ ). (B) Tortendiagramme: N-Gehalt (Mittelwert  $\pm$ SD) der Pflanzenorgane und deren Anteil am Gesamtpflanzen-N (n=45). Sterne: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen Nitrat- und Harnstoffvariante (ungepaarter t-Test [■] bzw. Mann-Whitney Rangsummentest [■■■■■■]);  $p < 0.05$ .

## 2. Einfluss von N-Formen auf Ertragsbildung in Elitelinien und deren Reaktionsfähigkeit auf N-regulierte Pflanzenentwicklung sowie Charakterisierung von N-Pools zum Erntezeitpunkt

Die Elitelinien wurden in den Versuchsjahren 2012/2013 und 2013/2014 nach demselben Düngeschema wie in 2011/2012 angebaut. Bonituren zu Feldaufgang, Winterhärte, Blühbeginn und -dauer und Pflanzenhöhe wurden in beiden Jahren wie in 2011/2012 durchgeführt, allerdings waren sowohl in 2012/2013 als auch in 2013/2014 genotypische Unterschiede in den aufgelisteten Merkmalen geringer als in 2011/2012, was auf eine geringere genetische Variabilität in der Population der Elitelinien im Vergleich zur Pre-BreedYield Kollektion hindeutete. In keinem der beiden Jahre hatte die gedüngte N-Form einen Einfluss auf Blühverhalten oder Pflanzenhöhe (Daten nicht gezeigt).

Die aufgenommene N-Menge in die oberirdischen Pflanzenorgane unterschied sich im Mittel in keinem der beiden Jahre zwischen Nitrat- und Harnstoffdüngung (Daten nicht gezeigt), lag aber im Jahr 2012/2013 mit 656 bzw. 685 mg N pro Pflanze (unter Nitrat bzw. Harnstoff) um 30-60 mg N pro Pflanze niedriger als in 2013/2014 (717 bzw. 711 mg N pro Pflanze unter Nitrat bzw. Harnstoff), was wahrscheinlich auf das Konkurrenzverhalten um Stickstoff im Jahr 2012/2013 zurückzuführen ist, da in diesem Jahr mehr Pflanzen den Winter überlebten. Auch die N-Allokation zu den einzelnen vegetativen und generativen Organen war im Populationsmittel nicht durch die N-Form beeinflusst, allerdings zeigte sich in 2012/2013, dass zum Ende der Schotenbildung ca. 2/3 des Pflanzenstickstoffs in den Schoten nachzuweisen war, wogegen in 2013/2014 nur ca. 1/2 des N zu den generativen Organen

verteilt war (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise könnte hier aber auch das Pflanzenmaterial zu zeitig geerntet worden sein.

Bezüglich der Ertragsbildung konnte in der Elitepopulation weder in 2012/2013 noch in 2013/2014 ein Einfluss der N-Form in einem der Genotypen beobachtet werden. Weder die Pflanzenarchitektur noch Samenmenge und -gewicht unterschieden sich nach den Düngebehandlungen, was am Ende zu einem ähnlichen Samenertrag pro Pflanze und auch pro Fläche führte (Daten nicht gezeigt). Generell zeigte sich auch hier im Vergleich beider Jahre, dass in 2012/2013 die höhere Pflanzenzahl pro Fläche den Ertrag pro Pflanze minderte, da die Pflanzen der Population in 2013/2014 im Mittel mehr Seitentriebe und Schoten ausbilden und diese auch mit mehr Samen füllen konnten.

### *3.+ 4. Beschreibung von N-abhängiger Regulation der Wurzelaktivität durch Cytokinine und deren Einfluss auf die N-Allokation im Sproß sowie N-düngungsabhängige Ertragsbildung in Elitelinien und der Einfluss der Wurzelaktivität auf die Größe von pflanzlichen N-Pools*

In allen Versuchsjahren wurde Xylemsaft zu verschiedenen Entwicklungsstadien geerntet und darin die Translokationsrate von Cytokininen (CK) bestimmt. Dabei konnten in allen Proben die inaktiven CK-Transportformen trans-Zeatinribosid (ZR), cis-Zeatinribosid (cZR) und Isopentenyladenosin (IPR) nachgewiesen werden, wobei ZR jeweils in der höchsten Menge auftrat.

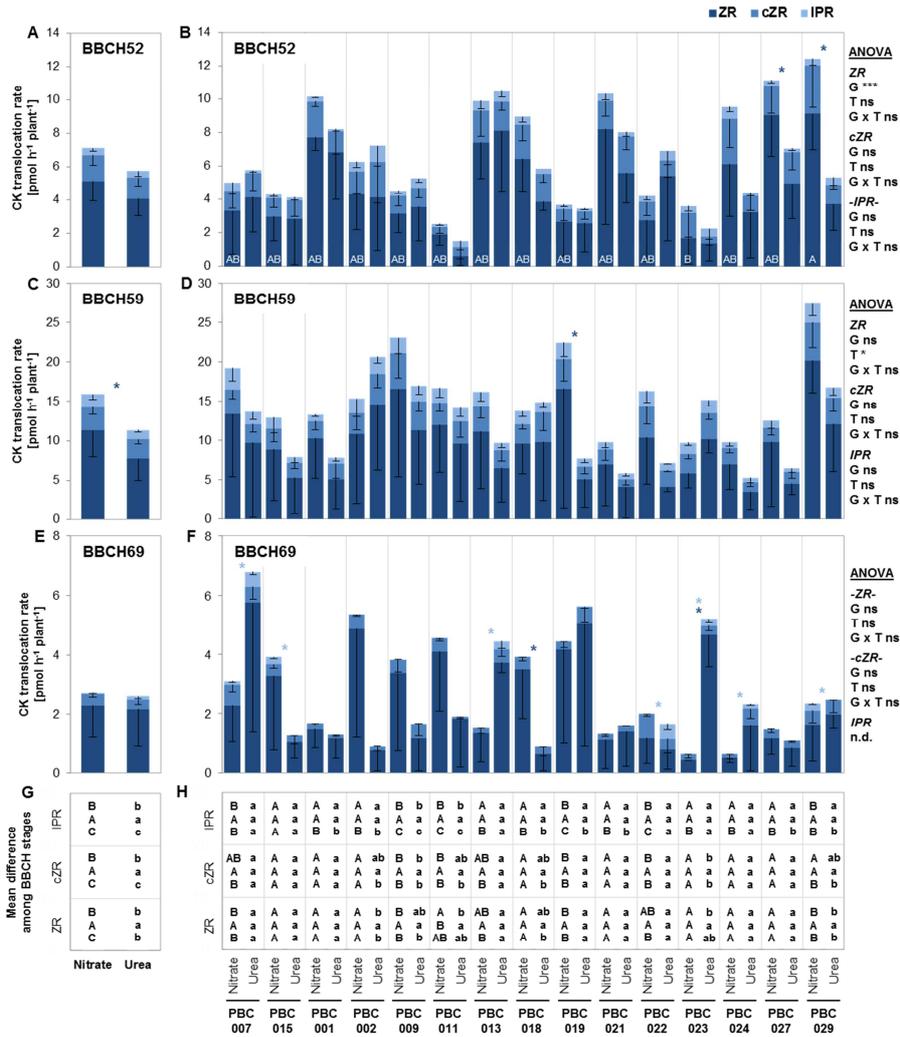
Bei der Auswertung der Daten des ersten Versuchsjahres 2011/2012 (Abbildung 4) fiel auf, dass nur zu einem Entwicklungsstadium (BBCH59) die mittlere Transportrate des am häufigsten vorkommenden CKs ZR nach Nitratdüngung signifikant höher war als in der Harnstoffvariante. Beim Vergleich der Tage, die zwischen Düngung und Xylemsafternte lagen, zeigte sich, dass die Düngung mit  $60 \text{ kg N ha}^{-1}$  nur sieben Tage vor der Ernte zu BBCH59 stattfand, wogegen die anderen Ernten 27 Tage nach  $40 \text{ kg N ha}^{-1}$  (BBCH52) und 42 Tage nach  $60 \text{ kg N ha}^{-1}$  (BBCH69) durchgeführt wurden. Da Nitrat, wie schon erwähnt, die CK-Bildung in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* durch die Induktion von *AtIPT3* und *AtIPT5* (Gene von Isopentenyltransferasen, die den ersten Schritt in der CK-Biosynthese katalysieren) stimuliert und auch Ammonium zu einer Induktion von *AtIPT5* führen kann (Takei *et al.*, 2004), liegt die Vermutung nahe, dass der höhere CK-Transport im Xylemsaft kurze Zeit nach der Ammoniumnitratdüngung auch auf einen solchen Signalling-Mechanismus zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu hielt der zugesetzte Harnstoffinhibitor nBTPT den applizierten Harnstoff wahrscheinlich mehrere Tage stabil (Soares *et al.*, 2012), wodurch vermutlich hier die CK-Bildung nicht so stark stimuliert wurde. Obwohl im zweiten und dritten Versuchsjahr zu anderen Entwicklungsstadien als im ersten Jahr geerntet wurde, konnte der stimulierende Effekt der Nitratdüngung auf die ZR-Translokation in beiden Jahren kurze Zeit nach der Düngung wieder beobachtet werden (in 2012/2013 zu BBCH57 zwei Tage nach Applikation von  $60 \text{ kg N ha}^{-1}$ , Daten nicht gezeigt; in 2013/2014 zu BBCH57 11 Tage nach  $60 \text{ kg N ha}^{-1}$ , Abbildung 5). Auch die Messung der gedüngten N-Formen im Xylemsaft im zweiten und dritten Versuchsjahr ergab, dass in denselben Proben jeweils kurze Zeit nach der Düngemittelapplikation Nitrat zu einer signifikant höheren Nitrattranslokation und Harnstoff zu einer signifikant höheren Harnstofftranslokation im Xylemsaft fast aller Genotypen führte, die Harnstofftranslokation zu späteren Entwicklungsstadien aber nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich war zu diesen Zeitpunkten der Harnstoff im Boden schon abgebaut, da die Wirkung des Ureaseinhibitors womöglich nachließ. Interessanterweise wurde zu diesen

späteren Entwicklungsstadien während und nach der Blüte oft eine signifikant höhere CK-Translokation im Xylem unter Harnstoffdüngung im Populationsmittel beobachtet (2012/2013: erhöhter Xylem-ZR-Transport zu BBCH75 unter Harnstoff, Daten nicht gezeigt; 2013/2014, erhöhter Transport aller CK-Formen im Xylem zu BBCH65 und BBCH75, Abbildung 5 E und F). Harnstoff wird im Boden durch Ureasen zu Ammonium abgebaut (Mérigout *et al.*, 2008), welches an Bodenpartikel bindet und über einen längeren Zeitraum von dort wieder freigesetzt wird (Jensen, 2006), wogegen Nitrat relativ schnell in tiefere Bodenschichten ausgewaschen wird (Galloway and Cowling, 2002). Vermutlich führte Ammoniumnitratdüngung kurzzeitig zu einer sehr hohen N-Verfügbarkeit, da Ammonium und Nitrat auch die präferierten N-Aufnahmeformen für Pflanzen sind (Hawkesford *et al.*, 2012). Durch Nitratauswaschung könnte die N-Verfügbarkeit im Boden allerdings relativ schnell gesunken sein. Im Gegensatz dazu ist stabilisierter Harnstoff bis zu 14 Tage im Boden stabil (Soares *et al.*, 2012) und wird dann zu Ammonium abgebaut, welches an Bodenpartikel bindet und über einen längeren Zeitraum freigesetzt und zu Nitrat nitrifiziert wird (Jensen, 2006). Somit könnte Harnstoffdüngung im Vergleich zu Ammoniumnitrat eher zu einer kontinuierlicheren moderaten N-Bereitstellung und weniger N-Auswaschung in Form von Nitrat geführt haben und in der Folge zu einer höheren N-Verfügbarkeit auch längere Zeit nach der Düngung. Dies könnte zu einer höheren CK-Induktion in den Wurzelzellen geführt haben und die höhere CK-Translokation im Xylemsaft längere Zeit nach Harnstoffdüngung erklären.

Da die CK-Produktion der Wurzel eng an die verfügbare N-Form gekoppelt ist (Takei *et al.*, 2004) und dadurch nicht unbedingt als ausschließlicher Marker für die Menge an aktiven Wurzelmeristemen angesehen werden kann, erschien es im zweiten und dritten Versuchsjahr plausibler direkt die N-Translokation im Xylemsaft als Marker für N-Aufnahme und N-Transportaktivität in den Sproß zu bestimmen. Die im Populationsmittel höhere ZR-Translokation kurze Zeit nach der Düngung mit Nitrat war nur in 2012/2013 auch mit einer höheren Gesamt-N-Translokation assoziiert (Daten nicht gezeigt), wogegen die im Mittel höhere CK-Translokation unter Harnstoff zu späteren Entwicklungsstadien nur in 2013/2014 zu BBCH65 auch mit einer höheren N-Translokation unter Harnstoffdüngung verbunden zu sein schien (Abbildung 6 C). Auch die entwicklungsabhängigen Mengen an transportiertem N und an CK im Xylemsaft zeigten ein unterschiedliches Muster: Während in beiden Versuchsjahren, 2012/2013 und 2013/2014, die mittlere Gesamt-CK-Translokationsrate vom Ende der Blütenentwicklung (BBCH57) zur Blüte (BBCH69) hin anstieg und bis zur Schotenentwicklung (BBCH75) wieder abfiel (2012/2013: Daten nicht gezeigt; 2013/2014: Abbildung 5), war die mittlere Gesamt-N-Translokation schon zu BBCH57 am höchsten und fiel mit fortschreitender Pflanzenentwicklung ab (2012/2013: Daten nicht gezeigt; 2013/2014: Abbildung 6). Die ansteigende CK-Transportrate bis zur Blüte könnte auf ein wachsendes Wurzelsystem hinweisen, das mehr Meristeme als Syntheseort von CK hat (Engels *et al.*, 2012). Da dieses wachsende Wurzelsystem auch N zur Synthese von z.B. Proteinen, Nukleinsäuren, Co-Enzymen, Phytohormonen und Sekundärmetaboliten benötigt (Hawkesford *et al.*, 2012), nutzte die Wurzel wahrscheinlich im Vergleich zu BBCH57 mehr N was zu geringerem N-Transport in den Sproß zu geführt haben könnte. Zu BBCH75 könnte das Wurzelsystem schon seneszent gewesen sein, was die niedrigsten Transportraten von CK und N im Xylem erklären könnte. Trotz dieser unterschiedlichen entwicklungsabhängigen Muster der CK- und N-Translokationsraten im Xylemsaft, zeigte sich aber zu den einzelnen Entwicklungsstadien in beiden Jahren und unter beiden N-Bedingungen eine moderat positive Korrelation zwischen Gesamt-N-Transport und CK-Transport im Xylemsaft, die in

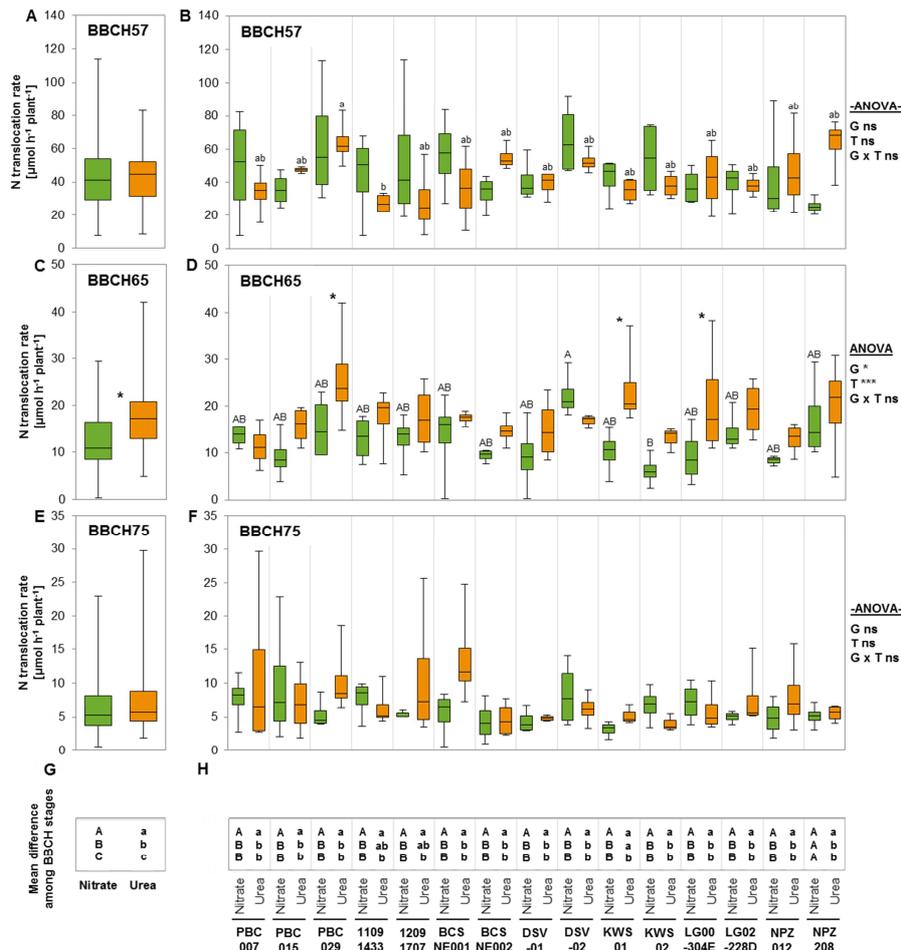
2012/2013 in BBCH57 und BBCH65 auftrat und im Folgejahr sogar in allen Entwicklungsstadien (Tabelle 1).

Um den Einfluss der Wurzelaktivität auf die N-Allokation im Sproß der Rapspflanzen zu beschreiben, wurden Korrelationen zwischen der CK- und N-Translokation im Xylem zu den verschiedenen Entwicklungsstadien und der N-Verteilung im Sproß zum Ende der Schotenentwicklung (BBCH79) berechnet (Daten nicht gezeigt). Ein über Populationen und Versuchsjahre konstanter Zusammenhang konnte nicht beobachtet werden. Im ersten Versuchsjahr war sowohl in den Nitrat- als auch in den Harnstoff-gedüngten Pflanzen der Pre-BreedYield-Kollektion eine höhere CK-Translokation gegen Ende der Blütenentwicklung (BBCH59) und gegen Ende der Blüte (BBCH69) häufig signifikant oder tendenziell mit einer vermehrten N-Allokation zu vegetativen Pflanzenorganen verbunden. Höhere CK-Transportraten zu Beginn der Blütenentwicklung (BBCH52) waren allerdings später mit einem höheren N-Gehalt in den Schoten am Haupttrieb assoziiert. In den Elitelinien des zweiten Versuchsjahres fanden sich ebenfalls signifikant positive Korrelationen zwischen CK- und tendenziell positive Korrelationen zwischen Gesamt-N-Transport im Xylem in der späteren Pflanzenentwicklung und der vermehrten N-Allokation zu vegetativen Pflanzenteilen. Dieser Zusammenhang konnte vor allem in nitratgedüngten Pflanzen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten harnstoffgedüngte Pflanzen positive Korrelationen zwischen CK- und N-Transport zum Ende der Blütenentwicklung mit dem späteren N-Gehalt in vegetativen Pflanzenfraktionen. Im dritten Versuchsjahr war die Gesamt-N-Transportrate im Xylem der harnstoffgedüngten Pflanzen während der Schotenentwicklung (BBCH75) positiv mit dem späteren N-Gehalt in Blattfraktionen assoziiert, eine höhere CK-Transportrate zu diesem Zeitpunkt assoziierte jedoch mit einem höheren N-Gehalt in den Schoten. Es scheint insgesamt häufig der Fall zu sein, dass ein höherer CK- und N-Transport von der Wurzel in den Sproß zu frühen wie auch zu späteren Entwicklungsstadien mit einer vermehrten N-Einlagerung in vegetative Organfraktionen assoziiert ist. Außerdem war eine höhere CK-Transportrate zu späteren Entwicklungsstadien meist mit einer niedrigeren Samenzahl pro Schote assoziiert (Daten nicht gezeigt). Letztere war aber genau der Parameter, der über alle Jahre hinweg die Ertragsbildung positiv beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Somit scheint anhand unserer Daten eine höhere Wurzelaktivität entweder keinen oder einen tendenziell negativen Einfluss auf die N-Allokation im Sproß und die Ertragsbildung gehabt zu haben.



**Abbildung 4: CK-Translokation im Xylemsaft der Pre-BreedYield-Kollektion 2011/2012 zu BBCH52, BBCH59 und BBCH69 als Mittelwert über alle Genotypen (A, C, E) und der einzelnen Genotypen (B, D, F) und als Vergleich zwischen den Entwicklungsstadien über alle Genotypen (G) und der einzelnen Genotypen (H) unter Nitrat (Nitrate) oder Harnstoff (Urea). (A-F) Balken: Mittelwerte -SD (A, C, E: n=45; B, D, F: n=3). Sterne im CK-Farbcodes: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen Nitrat- und Harnstoffvariante (ungepaarter t-Test [B, D, F] bzw. Mann-Whitney Rangsummentest [A, C, E]; p<0.05). (B, D, F) ANOVA oder ANOVA an Rängen (-) \*, \*\* bzw. \*\*\*: signifikante Unterschiede oder Interaktionen bei p<0.05, p<0.01 bzw. p<0.001; G=Genotyp, T=N-Behandlung, ns=nicht signifikant, n.d.=nicht bestimmbar. Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen den Genotypen innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test [Nitrat: B:■, D:■, F:■; Harnstoff: B:■, D:■, F:■] bzw. Tukey's Test an Rängen [Nitrat: F:■; Harnstoff: B:■, F:■]; p<0.05). (G, H) Mittelwert- oder Medianunterschiede in ZR-, cZR- und IPR-Translokation zwischen BBCH52, BBCH59 und BBCH69 (v.o.n.u.). Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede im Mittelwert (H) oder Median (G) zwischen den BBCH-Stadien innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test [H] oder Tukey's Test an Rängen [G]; p<0.05; [G] n=45; [H] n=3).**





**Abbildung 6: Gesamt-N-Translokation im Xylemsaft der Elitelinien-Kollektion 2013/2014 zu BBCH57, BBCH65 und BBCH75 als Mittelwert über alle Genotypen (A, C, E) und der einzelnen Genotypen (B, D, F) und als Vergleich zwischen den Entwicklungsstadien über alle Genotypen (G) und der einzelnen Genotypen (H) unter Nitrat (Nitrate) oder Harnstoff (Urea). (A-F) Boxplots: Mediane, erstes und drittes Quartil; Whisker: Datenminimum und -maximum (A, C, E: n=60; B, D, F: n=4). Sterne: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen Nitrat- und Harnstoffvariante (ungepaarter t-Test [B, D, F] bzw. Mann-Whitney-Rangsummentest [A, C, E]; p<0.05). (B, D, F) ANOVA \*, \*\* bzw. \*\*\*: signifikante Unterschiede oder Interaktionen bei p<0.05, p<0.01 bzw. p<0.001; G=Genotyp, T=N-Behandlung, ns=nicht signifikant. Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben: signifikante Mittelwert- oder Medianunterschiede zwischen den Genotypen innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test [Nitrat/Harnstoff: B, D] bzw. Tukey's Test an Rängen [Nitrat/Harnstoff: F]; p<0.05. (G, H) Mittelwert- oder Medianunterschiede in N-Translokation zwischen BBCH52, BBCH59 und BBCH69 (v.o.n.u.). Verschiedene Groß-/Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede im Mittelwert (H) oder Median (G) zwischen den BBCH-Stadien innerhalb der Nitrat-/Harnstoffbehandlung (Tukey's Test [H] oder Tukey's Test an Rängen [G]; p<0.05; [G] n=60; [H] n=4).**

	BBCH57	BBCH65	BBCH75
2012/2013	0.45, <0.01 0.57, <0.01	0.25, 0.07 0.37, <0.01	0.19, 0.17 -0.06, 0.68
2013/2014	0.37, <0.01 0.31, 0.02	0.55, <0.01 0.45, <0.01	0.45, <0.01 0.48, <0.01

■=Nitrate, ■= Urea

**Tabelle 1: Korrelationen zwischen den Translokationsraten für Gesamt-CK und Gesamt-N im Xylemsaft der Elitelinien 2012/2013 und 2013/2014 zu den Entwicklungsstadien BBCH57, BBCH65 und BBCH75 unter Nitrat (Nitrate) oder Harnstoff (Urea). Berechnung der r und p Werte nach Spearman-Rangkorrelation; n=60.**

## Referenzen

- Bauer B. 2014. *Wirkung unterschiedlicher Stickstoff-Formen auf die Bestockung, den Cytokinintransport im Xylem, die Triebreduktion und die Kornqualität in Sommergerste und Winterweizen*. PhD Thesis. Martin-Luther-University Halle-Wittenberg
- Engels C, Kirkby E, White PJ. 2012. Mineral Nutrition, Yield and Source–Sink Relationships In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, ed. P Marschner: Academic Press
- Galloway JN, Cowling EB. 2002. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio* 31: 64-71
- Gregersen P, Culetic A, Boschian L, Krupinska K. 2013. Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* 82: 603-22
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, et al. 2012. Functions of Macronutrients In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, ed. P Marschner: Academic Press
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot* 58: 2369-87
- Jensen T. *Irrigated Crop Production Update Conference, Lethbridge, AB, Canada, 2006*, 17: 21-26.
- Mérigout P, Lelandais M, Bitton F, Renou J-P, Briand X, et al. 2008. Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology* 147: 1225-38
- Ongaro V, Leyser O. 2008. Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany* 59: 67-74
- Schildhauer J, Wiedemuth K, Humbeck K. 2008. Supply of nitrogen can reverse senescence processes and affect expression of genes coding for plastidic glutamine synthetase and lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase. *Plant Biology* 10: 76-84
- Soares JR, Cantarella H, Menegale MLdC. 2012. Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry* 52: 82-89
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, et al. 2004. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant & cell physiology* 45: 1053-62
- Wiesler F, Behrens T, Horst WJ. 2001. The role of nitrogen-efficient cultivars in sustainable agriculture. *ScientificWorldJournal* 1 Suppl 2: 61-9

## Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele und erreichten Ergebnisse

Die mit \* gekennzeichneten Ziele wurden zu 100 % dem Projektplan entsprechend erreicht. Die mit + gekennzeichneten Ziele wurden nicht exakt dem Projektplan entsprechend erreicht: Die N-Pools im Sproß wurden nicht wie vorgesehen zum Zeitpunkt der Samenernte bestimmt, sondern zur Schotenfüllung, da zu späterer Pflanzenentwicklung die N-Verteilung zu den Blätter durch Blattverlust nicht mehr hätte bestimmt werden können.

### Ziele

### Erreichte Ergebnisse

Einfluss von N-Formen auf Ertragsbildung in Pre-Breeding Linien (*)	Obwohl die Nitratdüngung zu mehr Seitentrieben und Schoten führte, wurde der finale Samenertrag der Linien nicht beeinflusst.
Reaktionsfähigkeit auf N-regulierte Pflanzenentwicklung (*) sowie Charakterisierung von N-Pools zum Erntezeitpunkt (+)	Harnstoffgedüngte Pflanzen zeigten Symptome früherer Seneszenz: Blüte 1 d eher als unter Nitrat; N-Allokation zu Schoten zu BBCH79 tendenziell höher als unter Nitrat.
Einfluss von N-Formen auf Ertragsbildung in Elitelinien (*)	Die N-Düngeform hatte keinen Einfluss auf die Ertragsbildung in den Elitelinien.
Reaktionsfähigkeit auf N-regulierte Pflanzenentwicklung (*) sowie Charakterisierung von N-Pools zum Erntezeitpunkt (+)	Die N-Düngeform hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung und Ausbildung der N-Pools der Elitelinien.
Beschreibung von N-abhängiger Regulation der Wurzelaktivität durch Cytokinine und deren Einfluss auf die N-Allokation im Sproß (*)	Nitratdüngung führte zu kurzzeitiger CK-Stimulation. Linien mit höherem CK-Export in den Sproß investierten eher in vegetatives Wachstum.
N-Düngungsabhängige Ertragsbildung in Elitelinien (*) und der Einfluss der Wurzelaktivität in die Größe von pflanzl. N-Pools (+)	Die N-Düngeform hatte keinen Einfluss auf die Ertragsbildung in den Elitelinien. Höherer CK-Export in den Sproß begünstigte N-Allokation zu vegetativen Organen und weniger die Ertragsbildung.

## Arbeitspaket WP3: Genotyping

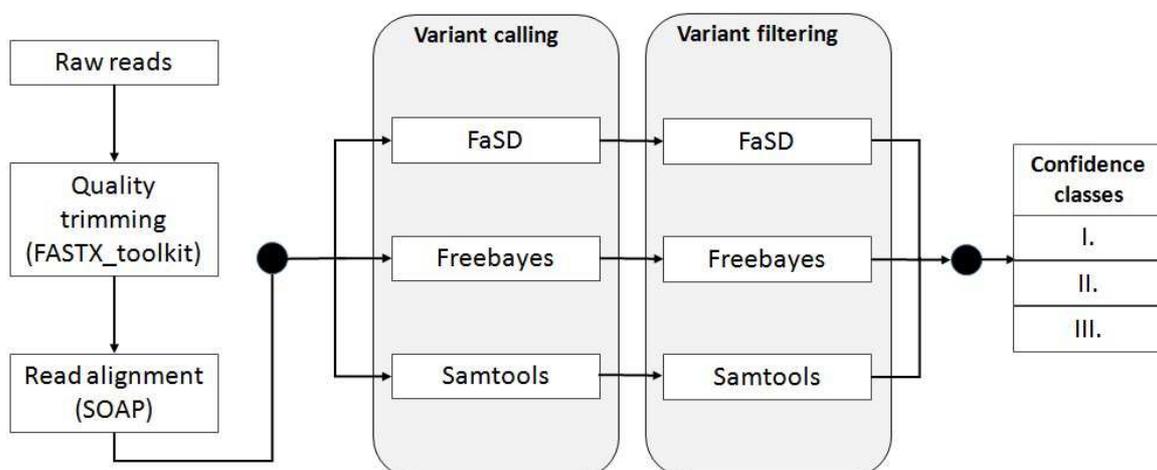
Das Arbeitspaket zur Genotypisierung wurde in Zusammenarbeit mit der Justus Liebig Universität Gießen (AG Snowdon) durchgeführt. Darüber hinaus fand auch eine enge Kooperation mit den Züchtern statt.

Im ersten Schritt wurden im Projekt 50 natürliche und synthetische *Brassica napus* Akzessionen ausgewählt und zusätzlich durch zwei moderne Züchterlinien ergänzt. Diese 52 Linien wurden anschließend vom Partner Syngenta Seeds GmbH mittels des Whole Genome Shotgun (WGS) Verfahrens sequenziert. Hierzu wurde die Plattform Illumina HiSeq 2000 eingesetzt. Die erhaltenen Sequenzdaten (Raw Reads) sind anschließend allen Projektpartnern zugänglich gemacht worden. In Zusammenarbeit zwischen Justus Liebig University Gießen (JGI) und dem IPK sind daraus für alle 52 Genotypen die Sequenz-Alignments gegen die 2014 publizierte Genomsequenz von *B. napus* konstruiert und bereitgestellt worden. Darüber hinaus wurden die Sequenzdaten auch im öffentlichen Archiv EMBL/ENA veröffentlicht:

- <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB5974>
- <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB6069>

Über diese 52 ausgewählten Linien verteilt wurden dann 4,3 Millionen Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) detektiert. Die einzelnen Arbeitsschritte der Sequenzierung und Verarbeitung der Daten, zur Ermittlung der SNPs sind in Abbildung 7 illustriert. Die Skripte, welche die Basis dieses Workflows darstellen, wurden als Datensatz veröffentlicht:

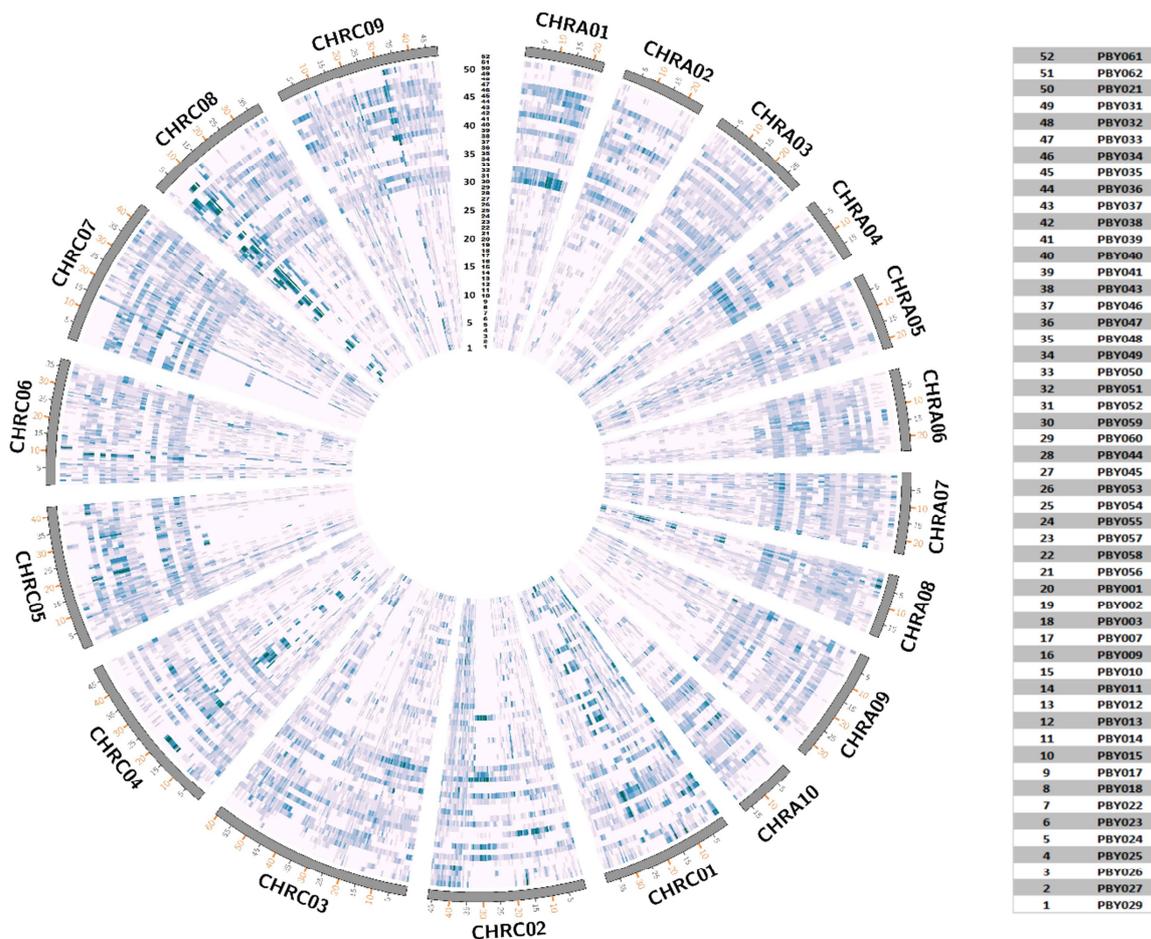
- <http://dx.doi.org/10.5447/IPK/2015/7>



**Abbildung 7: Workflow zur Ermittlung von SNPs in den ausgewählten Pre-BreedYield Genotypen.** Um die Qualität der Vorhersagen zu erhöhen, sind verschiedene Programme (FaSD, Freebayes und SAMtools) zur Detektion von SNPs genutzt worden. Die anschließende Kombination der Ergebnisse ermöglichte die besten SNP aus den verschiedenen Konfidenzklassen auszuwählen.

Um die Ergebnisse dieses Workflows grafisch zu illustrieren wurde die Verteilung der Variationen in den 52 Genotypen über das komplette Genom in einer Circos Grafik dargestellt (siehe Abbildung 8). Das Referenzgenom von *B. napus* ist gegenwärtig noch durch eine hohe Anzahl an Contigs charakterisiert, die keiner spezifischen Chromosomenpositionen zugeordnet werden können. Dies verdeutlicht die Herausforderungen bei der Assemblierung der Genomreferenz. Für die Circos Darstellung sind diese Contigs daher nicht betrachtet worden. Um jedoch eine vollständige Abdeckung der

Diversität zwischen den ausgewählten Genotypen zu erzielen, wurde das Read Alignment sowie das Variant Calling über das komplette Referenzgenom durchgeführt. Die erzeugte SNP-Matrix wurde als Datensatz öffentlich hinterlegt (<http://dx.doi.org/10.5447/IPK/2015/5>). Mit der etablierten Diversitätsressource besteht auch die Möglichkeit die gegenwärtig hohe Zahl nicht zugeordneter Contigs in die Genomsequenz zu integrieren. Erste Analysen zeigen, dass über 1 Million SNVs auf Sequenzabschnitten liegen, die noch keine exakte Chromosomenpositionen zugewiesen bekommen haben und eine Marker Entwicklung hier möglich ist.



**Abbildung 8: Zirkuläre Darstellung von Variationen über alle Genotypen** - 3,28 Millionen Variationen inklusive SNPs und InDels wurden mit definierter Chromosomenposition mit Circos visualisiert. Die Abbildung zeigt die 19 Chromosomen des *Brassia napus* Genoms, zehn vom A Subgenom sowie 9 vom C Subgenom. Die inneren Spuren stellen die beobachtete Diversität (Anzahl von Variationen) für jeden der resequenzierten 52 Genotypen dar. In Form einer Heatmap wird die SNP-Dichte innerhalb eines 500 kb großen Fensters betrachtet (blaue Segmente stehen für hohe Dichte an detektierter SNVs und helle Segmente für geringe SNV Dichte). Neben den beiden äußeren Spuren, auf denen die zwei Elitelinien dargestellt sind, wurden die weiteren Spuren der Genotypen in synthetische Linien (Spur: 50 – 31) und adaptierte Linien (Spur: 30 – 1) unterteilt und von außen nach innen in absteigender Diversität sortiert.

Unabhängig vom SNP Calling wurde die Detektion von Insertions- und Deletions-Polymorphismen durchgeführt. In Summe wurden 633.844 Insertionen und 469.860 Deletionen entdeckt. Dabei wurden nur Veränderungen detektiert, deren Längen im Bereich zwischen -20 und 20 bp liegt, wobei die große Mehrheit von etwa 90% eine Länge  $\leq$  3bp aufweist.

Für den Genotyp *B. napus* Darmor-bzh wurde eine genauere Untersuchung von repetitiven Sequenzen vorgenommen, da die Referenzsequenz einen Anteil von 34,5% an Transposons enthält. Um ein genaueres Bild über die repetitiven Sequenzen in der Genotyp-Kollektion von Pre-BreedYield zu erhalten, wurde eine k-mer Analyse mit dem Tool Kmasker durchgeführt. Hier wurde der Fokus insbesondere auf die Sequenzabschnitte im Bereich der Variationspositionen gelegt. Für jeden der 52 Genotypen wurde ein spezifischer k-mer Index erstellt. Anschließend wurden mit Hilfe dieser Indizes die flankierenden Sequenzen der Variationspositionen untersucht (jeweils 100bp in 5' und 3' Richtung). Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden als Datensatz veröffentlicht: <http://dx.doi.org/10.5447/IPK/2015/8>.

Zum tieferen Verständnis der SNPs und InDels wurde eine funktionelle Annotation durchgeführt. Dabei wurde eine Unterscheidung in vier Klassen vorgenommen:

- LoF - "Radikale" nicht-synonyme SNPs, welche einen Funktionsverlust verursachen können
- moderate - nicht-synonyme SNPs, welche ein geringeres Potential haben, eine Genfunktion zu beeinflussen
- low - synonyme SNPs, die sich in kodierenden Regionen befinden, die Proteinsequenz aber nicht beeinflussen
- other - nicht kodierende SNPs, die sich in Introns oder außerhalb von Genabschnitten befinden.

Eine große Mehrheit der SNPs konzentriert sich auf die letzteren beiden Klassen. Die Tabelle 2 gibt einen Gesamtüberblick über die gewonnenen Erkenntnisse. Ferner wurden die Ergebnisse auch in Form eines Datensatzes veröffentlicht: <http://dx.doi.org/10.5447/IPK/2015/9>. Die Verarbeitung der Sequenzdatenressourcen (~3.5 Terabyte an Sequenzdaten für die 52 Genotypen) und die genomischen Analysen sind in diesem Umfang nur über die etablierte Expertisen und Synergien aus vorangegangenen und aktuellen BMBF-Projekten (RYE-EXPRESS, BARLEX bzw. RYE-SELECT) umsetzbar gewesen.

Variant type	Minor allele frequency	LoF (frame shift InDel, splice acceptor or donor, stop gained or lost, non-conservative)	Moderate (inframe InDel, conservative missense)	Low (synonymous)	Other (intronic or intergenic)	Total
SNP	>=0.5%	865 (1.46%)	2,802 (4.74%)	3,549 (6.00%)	51,891 (87.79%)	59,107
	0.1% - 0.5%	12,115 (1.64%)	42,667 (5.79%)	59,778 (8.11%)	622,693 (84.46%)	737,253
	<0.1%	54,912 (1.57%)	186,261 (5.31%)	272,773 (7.77%)	2,994,658 (85.35%)	3,508,604
	all	67,892 (1.58%)	231,730 (5.38%)	336,100 (7.81%)	3,669,242 (85.23%)	4,304,964
InDel	all	14,051 (1.32%)	5,083 (0.48%)	-	1,043,726 (98.20%)	1,062,860

**Tabelle 2: Funktionelle Annotation von SNPs und InDels**

## Erstellung eines KASP Array Chips zur Genotypisierung

Im abschließenden Projektschritt ist die etablierte Diversitätsressource genutzt worden, um ein KASP Array zu erstellen mit dem größere Populationen von Genotypen getestet werden können. Hierfür sind die 4.3 Millionen SNVs genutzt worden, um unter Berücksichtigung einer genetischen Karte von *B. napus* als auch der physikalischer Information, aus diesem Datensatz ein robustes Markerset zu erstellen. Die angewendeten Kriterien sind in

Tabelle 3 aufgeführt. Die insgesamt 380 selektierten Variationen sind für die direkte Erstellung von KASP Markern vorbereitet worden (Bereitstellung aller Sequenz- und Markerinformation) und an den Züchter Limagrain übergeben worden.

STEP	Filter description	Accepted SNP marker
total	Set of unique variant positions	>4.3 million
1	No SNPs within 100 bp on each side of a selected variant position	180,248
2	MAF (> 0.3) in both groups (adapted and synthetic)	28,508
3	Marker sequence has A/C genome specificity (A or C specific mapping)	21,289
4	Calling rate should be > 80% in both groups (adapted and synthetic)	16,176
5	Darmor chromosome (chr. 1 - 19)	13,124
6	GAP filling genetic map	326
7	Removal small distant SNPs	300
8	GAP filling physical map	80

**Tabelle 3: KASP Array Design.** In der Tabelle werden die angewendeten Kriterien aufgeführt, die für eine qualitative Selektion angewendet worden. Die sukzessive angewendeten Schritte 1 – 5 bilden die Grundmenge von 13,124 SNVs, die genutzt werden um sowohl Lücken in der genetischen Karte (7) als auch der physikalischen Sequenz (8) zu füllen. Final sind 300 SNVs für die Erstellung von KASP Marker in Bereichen ( $\geq 4\text{cM}$ ) der genetischen Karte ausgewählt worden, die nicht durch Marker abgedeckt sind. Weiterhin wurde 80 SNVs aus Chromosomenregionen selektiert, die nicht durch Marker abgedeckt sind und eine große physikalischen Bereich abdecken.

## Arbeitspaket WP5: Datenmanagement und Implementierung zur Erfassung von Züchtungsleistungen

Das Arbeitspaket zum Datenmanagement wurde in Zusammenarbeit mit der German Seed Alliance durchgeführt. Die GSA übernahm hierbei die Koordination der Datensammlung, während das IPK für die Implementierung der Infrastruktur sowie den Datenimport und die Datenbereitstellung verantwortlich war.

In Diskussion mit den Pre-BreedYield-Projektpartnern wurden die Nutzeranforderungen erfasst. Darüber hinaus erfolgte auch eine Abstimmung mit dem ebenfalls vom BMBF

geförderten Projekt BARSELECT, um entsprechende Synergieeffekte zu erzeugen und Entwicklungsarbeiten in beiden Vorhaben zu kombinieren.

Für den Datenimport wurde die Entscheidung gefällt, Daten von den Partnern in Form von Excel-Tabellen als einzulesende Datensätze zu verwenden. In Abstimmung mit den Projektpartnern wurden entsprechende Excel-Templates erstellt. Damit wurde es möglich, eine einheitliche Formatierung sowie kontrollierte Vokabularien zu verwenden, um die Importprozeduren effektiv umzusetzen und eine spätere Vergleichbarkeit der Daten von verschiedenen Projektpartnern zu ermöglichen.

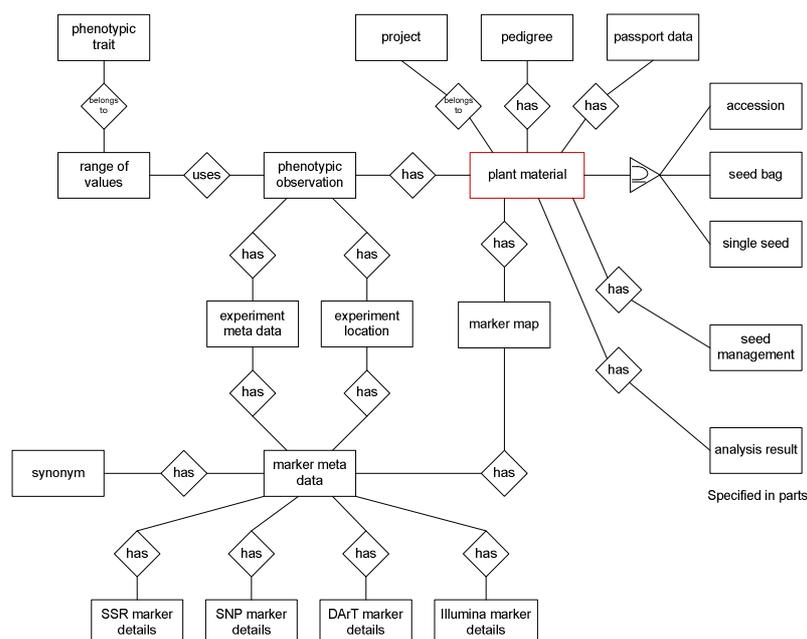
Es wurden Templates für die folgenden Bereiche erstellt:

- Plant material (incl. Passport data, pedigree, seed management)
- Meta data (e.g. Experimental setups, treatments, locations, ...)
- Phenotypic data (trait definitions, evaluation and characterisation data)
- Marker data (marker, types, genotyping data, mappings)
- Analysis results (e.g. QTL maps, association results)

Die Abbildung 9 illustriert den Zusammenhang zwischen den einzelnen Informationskategorien. Im nächsten Schritt wurden die Anpassungen an den Operativdatenbankstrukturen für das Oracle Datenbankmanagementsystem (DBMS) umgesetzt. Das Datenbankschema enthält über 50 Tabellen, in denen die Informationskategorien Metadaten, phänotypische Daten, Kartierungsdaten, Genotypisierungsdaten, Markerdaten und Analyse-daten abgebildet werden können.

Auf Basis der entworfenen Excel-Templates wurden Importroutinen entwickelt. Diese setzen sich aus Java-Programmen sowie PL/SQL-Paketen zusammen. Hierbei konnten zum Teil Entwicklungen aus vorherigen Projekten genutzt werden.

Im ORACLE-DBMS können die Inhalte der Operativdatenbanken für die Anwender transparent in das Pre-BreedYield-Warehouse überführt werden. Den aktuellen Datenbestand fasst die Tabelle 4 zusammen.



**Abbildung 9: Zusammenhang zwischen den Pre-BreedYield-Projektdate als ER-Diagramm**

Zur Bereitstellung dieser Daten für alle Projektpartner wurde eine webbasierte Schnittstelle erstellt welche über die Adresse <http://www.ipk-gatersleben.de/databases/pby> erreichbar ist. Der Zugriff auf das System ist gegenwärtig nur für Projektpartner möglich. Zu diesem Zweck wurde jedem eine persönliche Zugangskennung bereitgestellt, mit der sie sich im System anmelden können.

Type of data	No. Of records
Plant materials	17.580
Experiment setups	71
Phenotypic traits	348
Phenotypic values	286.007
Illumina markers	52.157
Genotyping values	138.216.050

**Tabelle 4: Datenbestand im Pre-BreedYield-Warehouse (Stand vom 30.11.2015)**

Das Webinterface wurde mittels Oracle Application Express (APEX) entwickelt und erlaubt den selektiven Zugriff auf sämtliche erhobenen Projektdaten. Somit können nicht nur von allen Projektpartnern die gesammelten Daten jederzeit abgerufen werden sondern darüber hinaus auch eine Vorselektion bestimmter Daten vorgenommen werden um beispielsweise ein bestimmtes Merkmal oder einen bestimmte Genotyp zu betrachten. Die Abbildung 10 zeigt ein Beispiel für die Filterung nach einem bestimmten Merkmal für einen bestimmten Standort.

Pre-BreedYield

Welcome: COLMSEE Logout

Home Plant material Experiment Phenotypic data Polymorphism Statistics Feedback

Phenotypic traits Ranges of values Evaluation data Characterisation data

Home > Phenotypic traits > Evaluation data

Hint: If a trait was scored, but for a certain plant no value could be detected (e.g. for technical reasons etc.), the respective value has been labelled with ND (not detected). If a trait was not scored, the respective value was labelled with NA (not available).

Q Go Actions User defined export

Experiment Location contains 'Lundsgaard'

Trait contains 'Seed Yield'

1 - 5

Plant Material	Experiment	Experiment Location	Experiment Site	Serial No	Block	Row No	Col No	Barcode	Trait	Observation	Collection Date
PBY027H1-022	PBY_BCS_Lundsgaard_1	Lundsgaard	BCS_Field_LU1	51137	148	19	4	137.0	Seed Yield	55.799150326797374	2014-07-26
PBY027H1-025	PBY_BCS_Lundsgaard_1	Lundsgaard	BCS_Field_LU1	51139	148	18	4	139.0	Seed Yield	53.30431372549019	2014-07-26
PBY026H1-030	PBY_BCS_Lundsgaard_1	Lundsgaard	BCS_Field_LU1	51125	148	17	4	125.0	Seed Yield	53.06470588235294	2014-07-26
PBY029H1-016	PBY_BCS_Lundsgaard_1	Lundsgaard	BCS_Field_LU1	51166	148	16	4	166.0	Seed Yield	52.50411764705881	2014-07-26
PBY025H1-028	PBY_BCS_Lundsgaard_1	Lundsgaard	BCS_Field_LU1	51096	148	15	4	96.0	Seed Yield	55.19477124183006	2014-07-26

**Abbildung 10: Filterung nach Merkmal und Standort**

Mit Hilfe der APEX-Technologie können umfangreiche Such-, Filter- und Exportfunktionen bereitgestellt werden, die eine entsprechende Weiterverwendung der Daten oder den Import in andere Werkzeuge möglich machen.

Am IPK sind interne Ressourcen in Form von Personal, gewarteter IT-Infrastruktur, Softwarewartungsvertrag für Oracle-DBMS und Oracle-APEX vorhanden, um das Pre-BreedYield Data Warehouse nach dem Förderende weiter zu betreiben. Dies stellt eine nachhaltige Verfügbarkeit sowie Nutzung der Projektergebnisse sicher.

## **2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Personalkosten Wissenschaftler:	239.033,05 €
Personalkosten Technisches Personal	107.640,75 €
Sachmittel:	105.027,03 €
Reisekosten:	8.131,21 €
Gesamtsumme:	459.832,04 €

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

Die Probenahmen, -aufbereitungen und -analysen waren sehr zeitaufwendig, aber notwendig, da im Modul Phenotyping eine möglichst große Zahl an Genotypen physiologisch validiert werden sollte und statistisch auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse nur mit einer genügend hohen Anzahl an Wiederholungen erreicht werden konnten. Ohne die bewilligten Projektmittel wären diese Arbeiten nicht möglich gewesen.

Am IPK sind waren keine Personalkapazitäten vorhanden, um die umfangreichen Resequenzierungsdaten zu bearbeiten. Das durch dieses Projekt finanzierte Personal konnte nur durch die Zusammenarbeit mit der AG Snowdon und unter Nutzung der am IPK vorhandenen Compute-Kapazität die Analysen durchführen.

Auch die Arbeiten zur Erstellung des Pre-BreedYield-Warehouses sowie des Datenimports gingen über die Aufgaben der Grundfinanzierung des IPK hinaus und konnten nur somit nur mit Hilfe der bewilligten Projektmittel ausgeführt werden.

## **4. Voraussichtlichen Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

In allen Projektjahren und Populationen hatte die gedüngte N-Form keinen Einfluss auf den finalen Samenertrag. Dies ist vor dem Hintergrund der ab 2017 gesetzlich einzuhaltenden Verschärfungen der Treibhausgas(THG)-Emissionswerte während der Energiepflanzenproduktion ein positives Ergebnis, da Harnstoffdünger im Vergleich zu Nitrat-haltigen Düngern, wie z.B. KAS, bei der Produktion zu geringeren THG-Emissionen führt und die Stabilisierung von Harnstoff mittels Urease-Inhibitoren auch die Lachgasemission nach Feldausbringung mindert.

Da die Nitratdüngung in einigen Genotypen der Pre-BreedYield-Population einen positiven Einfluss auf die Schoten- und Seitentriebbildung hatte und Harnstoff zu Anzeichen einer früheren Pflanzensezessenz führte, könnten Landwirte durch eine gezielte Wahl der N-Düngemittelform saisonale Einflüsse auf die Anlage von Ertragskomponenten zumindest

teilweise kompensieren. Beispielsweise könnten Bestandslücken nach Auswinterungsverlusten durch die Applikation Nitrat-haltiger Düngemittel über vermehrte Seitentriebbildung geschlossen werden. In sehr trockenen Jahren könnte Harnstoffdüngung eine frühere N-Retranslokation in die Samen fördern und damit die N-Nutzungseffizienz erhöhen. Allerdings scheinen nicht alle Genotypen in derselben Weise auf unterschiedliche N-Formen zu reagieren. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit zukünftig Elitelinien auch hinsichtlich ihrer Reaktion auf verschiedene Düngemittelformen zu optimieren.

Die *B. napus* Sequenz-Ressourcen der 52 Genotypen und die etablierten Diversitätsmerkmale innerhalb dieser Genotypen sind von zentraler Bedeutung für die Anwendung moderner Züchtungsstrategien. Die aus dieser Studie hervorgegangenen Erkenntnisse aus adaptierten und synthetischen *B. napus* Linien sind wesentlich, um den Rückgang der genetischen Diversität in Züchtungslinien entgegenzuwirken und neue Diversitätsmerkmale in Züchtungsprogramm einzubringen. Diese Kenntnisse sind in die gemeinsame Publikation von Snowdon et al. (2015) eingeflossen.

Alle wesentlichen Ergebnisse des Projektes sind strukturiert sowie dokumentiert gespeichert und das Pre-BreedYield-Warehouse wird mit IPK-Mitteln weiter betrieben. Somit ist eine Nutzung der Ergebnisse in weiteren Projekten bzw. Analysen leicht möglich.

## **5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Für das WP2 wurde nicht bekannt, dass an anderen Stellen ein ähnlicher Ansatz zur Messung des Xylem-Cytokintransportes als Marker für Wurzelaktivität in Zusammenhang mit N-Allokation und Ertragsbildung bei Raps verfolgt wird.

Für das Arbeitspakete WP3 und WP5 sind während der Projektlaufzeit keine Fortschritte bekannt geworden, die einen bedeutenden Einfluss auf das Projekt (im Sinne von Änderungen von innerhalb der Arbeitspakete oder neuen Zielstellungen) hatten. Auch mit der erst der spät erfolgten Veröffentlichung des Raps-Genoms konnte entsprechend gearbeitet werden.

## **6. Erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11**

WP2:

- Gierth, D. von Wirén, N. et al.: zwei Publikationsvorhaben zu:
  - Stickstoff- und Cytokinverlagerung in Abhängigkeit der Stickstoffdüngung
  - Genotypische Variabilität in der Plastizität der Anlage von Ertragskomponenten

WP3:

- Snowdon RJ, Abadi A, Kox T, Schmutzer T, Leckband G. Heterotic Haplotype Capture: precision breeding for hybrid performance. *Trends in Plant Science*. 2015;20: 410–413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.013>
- Schmutzer, T., Samans, B., Dyrszka, E., Ulpinnis, C., Weise, S., Stengel, D., Colmsee, C., Lespinasse, D., Micic, Z., Abel, S., Duchscherer, P., Breuer, F., Abadi, A., Leckband, G., Snowdon, R., and Scholz, U., (2015). Species-wide genome sequence and nucleotide polymorphisms from the model allopolyploid plant *Brassica napus*. *Scientific Data*, (submitted).

#### WP5:

Für das Arbeitspaket WP5 sind bisher keine Veröffentlichungen in Fachzeitschriften erfolgt bzw. geplant. Die Erkenntnisse aus der Projektbearbeitung sind indirekt in andere Veröffentlichungen eingeflossen. Das webbasierte Benutzungsinterface ist über die URL <http://www.ipk-gatersleben.de/databases/pby> erreichbar. Aktuell ist der Zugriff auf Projektpartner beschränkt. Für später ist geplant den Zugang entsprechend öffentlich zu ermöglichen.

#### **Anlagen:**

Erfolgskontrollbericht

Kurzfassung des wesentlichen fachlichen Inhalts des Schlussberichts (Berichtsblatt)

## **Erfolgskontrollbericht**

### **1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen**

Ziel des Vorhabens war es, wettbewerbsfähige pflanzenzüchterische und bioinformatische Kenntnisse, Verfahren und Produkte in bzw. für die Kulturart Raps zu entwickeln, die zu einer nachhaltigen landwirtschaftlichen Produktion von hochwertigeren Pflanzen beitragen. Neue Rapslinien sollen eine erhöhte Ertragsstabilität zeigen und sich durch neue Merkmale auszeichnen, die insbesondere die Stickstoffeffizienz erhöhen. Im Teilprojekt J wurden solche Ergebnisse erzielt, indem die genetische Variabilität für die interne Stickstoffnutzung zwischen Elitelinien und Linien aus dem Vorfeld der Züchtung verglichen wurde. Zudem wurde die Reaktion dieser Linien auf verändertes Stickstoffdüngungsmanagement bestimmt. Des Weiteren wurde eine neue Datenbank mit neuen anwenderorientierten Abfrage- und Analysewerkzeugen geschaffen. Damit repräsentierten die Arbeiten im vorliegenden Projekt einen innovativen Ansatz zur Weiterentwicklung von Phänotypisierungsverfahren und zur Nutzung dadurch gewonnener Daten über neue bioinformatische Interpretations- und Auswertungsmöglichkeiten im Bereich der Pflanzengenomforschung. Damit entsprachen die vorliegenden Arbeiten genau den förderpolitischen Zielen der Ausschreibung.

### **2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis, erreichte Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen**

In WP2 wurden folgende Ergebnisse erreicht:

- Der Vergleich einer Stickstoffdüngung in Form von Nitrat oder Harnstoff zeigte, dass die Nitratdüngung zwar zu mehr Seitentrieben und Schoten führt, den finalen Samenertrag der Linien aber nicht signifikant beeinflusst. Allerdings blühen harnstoffgedüngte Pflanzen um 1 Tag früher und gehen etwas früher in die Seneszenz.
- Nitratdüngung erhöht kurzzeitig die Translokation von Cytokinen in den Sproß und begünstigt die Versorgung von vegetativen Pflanzenorganen mit Stickstoff. Dies ist ungünstig hinsichtlich der Stickstoffnutzungseffizienz.
- Genotypische Unterschiede in der Cytokintranslokation im Xylem erscheinen zu gering und zu variabel, um diesen Parameter als Maß für die Wurzelaktivität einsetzen zu können und um solche Linien zu selektieren, die eine erhöhte Nährstoffaufnahme nach der Blüte zeigen.

In WP3 wurde folgende Ergebnisse erreicht:

- Konstruktion und Bereitstellung von Sequenz-Alignments gegen die publizierte Genomsequenz von *B. napus* für alle 52 Genotypen der Pre-BreedYield Kollektion
- Erzeugung und Veröffentlichung einer SNP-Matrix auf Basis eines Read Alignments sowie eines Variant Callings über das komplette Referenzgenom für alle ausgewählten Genotypen
- Bereitstellung von Analyseergebnissen repetitiver Sequenzen der Pre-BreedYield Kollektion

- Durchführung sowie Veröffentlichung einer funktionellen Annotation detektierter SNPs
- Erstellung eines KASP Array Chips auf Basis der 4,3 Millionen SNVs zur Genotypisierung größerer Populationen

In WP5 wurde folgendes Ergebnis erreicht:

- Entwicklung eines zentralen Repositories (Pre-BreedYield-Warehouse) inklusive einer webbasierten Benutzungsschnittstelle zur Abfrage, Filterung, Analyse sowie zum Datenexport

### 3. Fortschreibung des Verwertungsplans

- Erfindungen und Schutzrechtsanmeldungen

Nicht erfolgt.

- Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Erhebung von physiologischen Merkmalen in größeren Pools von Prebreeding- und Elitelinien ist von besonderem Wert, da so grundlegende Erkenntnisse zur genetischen Variabilität und genetischen Architektur der beschriebenen Merkmale gewonnen werden konnten. Aufgrund der gewonnenen Daten kann das Potential zur züchterischen Verbesserung der Stickstoffnutzungseffizienz und dem Einfluss der Düngemittelform besser abgeschätzt werden. Damit liefert dieses Projekt neue Erkenntnisse zur weiteren Verbesserung des Züchtungsprozesses und zum Stickstoffmanagement im Rapsanbau.

Die *B. napus* Sequenz-Ressourcen der 52 Genotypen und die etablierten Diversitätsmerkmale innerhalb dieser Genotypen können in modernen Züchtungsstrategien angewendet werden.

- Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten

Die Erkenntnisse aus den durchgeführten Untersuchungen erlauben Anschlussprojekte mit zielgerichteten Ansätzen zur Nutzung der genotypischen Variabilität in der Stickstoffverteilung in der Pflanze. Da die N-Düngemittelform keinen Einfluss auf den Kornertrag wohl aber auf die Entwicklung von Ertragskomponenten im Raps hatte, kann diese Erkenntnis auch in der landwirtschaftlichen Beratung zur gezielten Steuerung der Anlage von Ertragsorganen herangezogen werden.

Auch für wissenschaftliche Fragestellungen können die *B. napus* Sequenz-Ressourcen der 52 Genotypen und die etablierten Diversitätsmerkmale Basis für verschiedenste Projekte bilden.

- Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die gewonnenen Erkenntnisse stellen eine interessante Basis für wissenschaftliche Anschlussarbeiten dar, indem direkt an die Erkenntnisse zur genotypischen Variabilität in der internen Stickstoffallokation angeknüpft werden kann. Dabei zeigte die größere Variabilität in

den Prebreeding-Linien, dass der Genpool der Elitelinien angereichert werden sollte, wenn die Stickstoffnutzungseffizienz züchterisch genutzt werden soll.

Die Diversitätsdaten stellen eine bisher einzigartige und umfangreiche Ressource dar, die in neuen Projektanträgen als Basis verwendet werden können.

Darüber hinaus bildet das Pre-BreedYield-Warehouse eine langfristig verfügbare Ressource, welche die wesentlichen Ergebnisse des Projektes dauerhaft Wissenschaftlern und Züchtern zur Verfügung stellen wird.

#### **4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben**

Die Hypothese, dass Cytokinine im Xylemsaft als Marker für die Wurzelaktivität eingesetzt werden können, ließ sich nicht bestätigen. Damit bleibt die Suche nach einem geeigneten molekularen oder physiologischen Marker für genotypische Unterschiede in der Wurzelaktivität weiter offen.

#### **5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer**

Manuskripte zu diesen Arbeiten sind bereits veröffentlicht oder in Vorbereitung, um interessierten Nutzern Zugang zu den erhobenen Daten und gewonnenen Erkenntnissen zu geben.

Darüber hinaus ist geplant den Zugang zum Webinterface für das Pre-BreedYield-Warehouse nach dem in Kooperationsvertrag festgelegten Zeitraum für die Öffentlichkeit zu ermöglichen. Das System ist unter der URL <http://www.ipk-gatersleben.de/databases/pby> verfügbar.

#### **6. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung**

Der Ausgabenplan wurde eingehalten während die Zeitplanung, wie in den Berichten dargelegt, verschoben werden musste. Die zuwendungsneutrale Laufzeitverlängerung war nötig, um die Analyse der erhobenen Daten abzuschließen und um die angefallenen Daten auszuwerten, zu interpretieren und in die Datenbank zu importieren.