

Nutzung von genomischen Ressourcen aus Reis und Gerste zur gezielten Markierung von Genen der Befruchtungskontrolle bei Roggen

B. HACKAUF, H. WORTMANN und P. WEHLING

Einleitung

Genetisch determinierte Mechanismen der Befruchtungskontrolle sind in der Evolution der Blütenpflanzen wie in der modernen Pflanzenzüchtung von zentraler Bedeutung. Im Roggen (*Secale cereale* L.) sind zwei genetische Mechanismen bekannt, die eine Befruchtungskontrolle durch Befruchtungslenkung bzw. Disfunktionalität von Pollenkörnern bedingen: Selbstinkompatibilität (SI) und cytoplasmatische männliche Sterilität (cms).

SI im Roggen wird durch zwei komplementär wirkende Genorte, *S* und *Z*, kontrolliert (LUNDQVIST 1956), die auf Chromosom 1R (WRICKE and WEHLING 1985) und 2R (GERTZ and WRICKE 1989) lokalisiert sind. Im Gegensatz zu sporophytischen und gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystemen einiger Familien dikotyler Pflanzen, für welche sowohl die männliche als auch die weibliche Komponente des *S*-Gens isoliert werden konnte (vgl. NASRALAH 2005 zum Überblick), sind die molekularen Grundlagen der bifaktoriellen SI in der Familie der Gräser bislang ungeklärt. Fortschritte konnten indessen hinsichtlich der Feinkartierung des *S*- und *Z*-Locus in *Phalaris* (BIAN et al. 2004) sowie des *Z*-Locus bei Roggen (HACKAUF und WEHLING 2005) durch vergleichende Ansätze der Genkartierung erzielt werden.

Die Hybridzüchtung bei Roggen wird auf der Grundlage der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (GEIGER und SCHNELL 1970) durchgeführt, wobei die Nutzung des Pampa- (P-) Cytoplasmas dominiert. Die Restauration der männlichen Fertilität im P-Cytoplasma ist abhängig von der Wirkung zweier dominanter Restorerogene, *Rfp1* und *Rfp2*,

auf Chromosom 4RL (MIEDANER et al. 2000). Sowohl für *Rfp1* als auch für *Rfp2* sind flankierende, dominante SCAR-Marker entwickelt worden (STRACKE et al. 2003). Eine züchterisch ausreichend präzise Ansprache von *Rfp1* und *Rfp2* ist allerdings mangels eng gekoppelter, beidseitig flankierender, kominanter Marker bislang nicht möglich. Die Notwendigkeit solcher Werkzeuge ergibt sich zum ersten aus dem Bedarf, Polleneliter-Genpools markergestützt mit *Rfp1* bzw. *Rfp2* auszustatten, um das Pollenschüttungsvermögen von Hybriden zu verbessern. Zum zweiten ist es wünschenswert, mit Hilfe eng gekoppelter molekularer Marker rekombinativ reduzierte Donorchromosomensegmente identifizieren zu können mit dem Ziel, die Korrelation von Restauration und unerwünschter Wuchshöhe aufzubrechen.

Wir berichten über die laufende Entwicklung neuer, PCR-gestützter Marker für den Selbstinkompatibilitätslocus *S* auf Chromosom 1RS und für das Restorerogen *Rfp1* auf Chromosom 4RL. Grundlage dieser Arbeiten ist die vergleichende Genkartierung, welche für eine gezielte Markerentwicklung ausgewählter Genombereiche im Roggen auf die Reiserenomdaten zurückgreift.

Markierung des Selbstinkompatibilitätslocus *S*

LI et al. (1994) identifizierten einen cDNA-Klon (*Bm2*) als mutmaßlichen Kandidaten für das *S*-Gen im Gras *Phalaris coerulea*, der mit dem *S*-Locus in *P. coerulea* kosegregierte, die zu erwartende gewebespezifische Expression aufwies, Sequenzvariation unter verschiedenen *S*-Haplotypen zeigte und für ein Thioredoxin-h kodierte. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden von uns

im Roggen durch 5'-RACE-PCR Transkripte mit Ähnlichkeit zu Thioredoxin-h aus Pollen-cDNA verschiedener *S*-Haplotypen des Roggens isoliert. Aus diesen Untersuchungen resultierte der Marker *Xiac1(THL)* (*THL* = thioredoxin-h-like) (HACKAUF et al. 2003).

Die Kartierung von *Xiac1(THL)* relativ zu *S* wurde zunächst anhand einer *S1*-Selbstungsfamilie (*BAZ-1001*) vorgenommen. Diese Familie segregierte am *S*-Locus mit einem funktionellen (*S_f*) und einem mutierten, Selbstkompatibilität bedingenden *S*-Allel (*S_c*) und ließ somit eine 1:1:0-Aufspaltung von *S_cS_c:S_cS_f:S_fS_f* erwarten. Mit *S* kosegregierende Marker sollten diesem Aufspaltungsmuster folgen. Unter 93 Individuen traten drei Rekombinationsereignisse zwischen dem mit *Xiac1(THL)* bezeichneten Thioredoxin-h-Genort und dem *S*-Locus auf (Tabelle 1). Ein anderer Marker, *Xiac55*, kosegregierte im untersuchten Material mit *S*.

Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Spaltungsdaten aus einer *S*-Testerpopulation (*BAZ-531*), die auf Kreuzungseltern mit zwei funktionellen *S*-Allelen zurückgeht (Tabelle 2). In dieser Nachkommenschaft aus der Kreuzung vom Typ *S_fS_fZ₁Z₁ x S_fS_cZ₁Z₁* ist nur *S_c*-Pollen auf dem mütterlichen Elter befruchtungsfähig. Legitime Nachkommen dieser Kreuzung müssen somit am *S*-Locus sowie an Markern, die mit *S* ohne Rekombination gekoppelt sind, den paternalen Genotyp zeigen. Maternale Markergenotypen zeigen Rekombination mit *S* an.

Die unter 87 *S*-Genotypen der Familie *BAZ-531* zu beobachtenden Spaltungsdaten erlauben es, den *S*-Locus innerhalb eines 9,4 cM-Markerintervalls auf Chromosom 1R zu kartieren. Unter 12 neuen

Autoren: Dr. Bernd HACKAUF und Dr. habil. Peter WEHLING, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für landwirtschaftliche Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, D-18190 GROSS LÜSEWITZ; Dr. Heinrich WORTMANN, Hybro Saatzucht GmbH & Co. KG, Kleptow Nr. 53, D-17291 SCHENKENBERG



Tabelle 1: Spaltungsdaten der Selbstungsfamilie BAZ-1001 für STS-Marker. M_{22} repräsentiert die Markergenotypen des selbstinkompatiblen Elters. Engere Kopplung von Markerlocus M mit S bedingt größere Abweichung von 1:2:1 am Markerlocus.

Locus	Position (cM)	M_{11}	M_{12}	M_{22}	n	Chi ²	DF	$r(s_p)$
<i>Xiag95</i>	0.0	26	56	23	105	0.6	2	0.469 (0.069)
<i>Xiac42</i>	10.2	33	54	18	105	3.7	2	0.353 (0.066)
<i>Xiac35</i>	30.0	40	53	11	104	16.2*	2	0.216 (0.057)
<i>Xiac40</i>	44.0	49	54	2	105	43.8*	2	0.039 (0.027)
<i>Prx7</i>	46.1	49	56	1	106	42.2*	2	0.020 (0.019)
<i>Xiac55</i>	47.8	47	58	0	105	43.2*	2	0 (0)
<i>Xiac1(THL)</i>	49.6	42	48	3	93	32.8*	2	0.067 (0.037)

* signifikant für alpha = 0.05

Tabelle 2: Spaltungsdaten der S-Testerfamilie BAZ-531 für STS-Marker. M_{11} repräsentiert die maternalen Genotypen (und die Rekombinanten mit S), M_{12} die paternalen Genotypen; Rek. und cM: Anzahl der Rekombinanten bzw. genetische Distanz zwischen benachbarten Loci. Die genetische Konstitution am S -Locus wurde nicht direkt erfasst; stattdessen wurde die gemäß SI-Genetik zu erwartende Zusammensetzung der Testkreuzungsnachkommenschaft (alle S_1S_2) zugrundegelegt.

Marker	M_{11}	M_{12}	Rek.	N	cM	s	95%-Konf.-Intervall	LOD	
<i>Xiac77</i>	47	40	5	87	5.8	2.5	2.6	13.2	17.9
<i>Xiag95</i>	42	45	22	78	31.9	7.5	20.9	50.0	3.3
<i>Xiac35</i>	18	60	11	77	14.7	4.3	8.4	26.4	9.5
<i>Xiac37</i>	7	79	2	85	2.4	1.6	0.7	8.3	21.5
<i>Xiac41</i>	5	81	0	86	0.0	0.0	0.0	4.2	25.9
<i>Xiac78</i>	5	82	5	86	5.8	2.6	2.6	13.4	17.6
<i>Xiac55</i>	0	86	0	86	0.0	0.0	0.0	4.2	25.9
S	0	87	0	84	0.0	0.0	0.0	4.3	25.3
<i>Xiac79</i>	0	84	3	83	3.6	2.1	1.3	10.4	19.4
<i>Xiac49</i>	3	82	2	83	2.4	1.7	0.8	8.5	10.9
<i>Xiac50</i>	5	80	0	61	0.0	0.0	0.0	5.9	18.4
<i>Xiac1(THL)</i>	3	60	1	61	1.6	1.6	0.4	8.9	16.1
<i>Xiac6</i>	4	81	3	81	3.7	2.1	1.4	10.6	18.8
<i>Xiac80</i>	5	78	4	80	5.0	2.5	2.1	12.6	17.2
<i>Xiac60</i>	7	77							

STS-Markern zeigen *Xiac55* und *Xiac79* Kosegregation mit dem S -Locus, während die Rekombination zwischen S und dem Thioredoxin-Marker *Xiac1(THL)* bestätigt wurde. In-situ-Testbestäubungen bestätigten, dass alle drei für *Xiac1(THL)* homozygoten Individuen selbst-inkompatibel sowie am S -Locus heterozygot sind. Durch Genotypisierung weiterer, ungekoppelter Marker konnten desweiteren Selbstung und Fremdeinstäubung als Ursachen der drei maternalen *Xiac1(THL)*-Markergenoty-

pen ausgeschlossen werden. Aufgrund der somit bestätigten Rekombination mit S kommt das Thioredoxin-Gen im Roggen nicht als Kandidat für das S -Gen in Betracht. Dies steht in Einklang mit den Schlussfolgerungen von LANGRIDGE et al. (1999) im Hinblick auf die Rolle von *Bm2* in *P. coeruleus*. Sequenzanalyse und chromosomale Lokalisation relativ zu Ankermarkern lassen den Schluss zu, dass es sich bei *Bm2* und *Xiac1(THL)* um orthologe Genorte in *Phalaris* und Roggen handelt. BIAN

et al. (2004) beschreiben Kosegregation von *Bm2* und S unter 844 Individuen. Die von uns beobachtete Rekombination zwischen *Xiac1(THL)* und S deutet darauf hin, dass im Roggen die Rekombinationshäufigkeit am S -Locus deutlich höher ist als in *Phalaris*.

Durch Sequenzähnlichkeitsstudien konnten die neuen IRS-STS-Marker über die zugrundeliegenden EST-Sequenzen mit dem Reisingenom verankert werden. Für die beiden mit dem S -Locus kosegregierenden Marker *Xiac55* und *Xiac79* konnten Gensequenzen mit hochsignifikanter Sequenzähnlichkeit auf Reischromosom R2 bzw. R10 identifiziert werden. Dies bedeutet, dass in dem 9,4cM-Intervall, welches den S -Locus im Roggen umschließt, Rearrangements subgenomischer Bereiche vorliegen, welche die Kolinearität zwischen Roggen und Reis in dieser Region unterbrechen.

Markierung des Restorerlocus *Rfp1*

Die genomische Region auf Chromosom 4RL, in welcher die dominanten Restorerogene *Rfp1* und *Rfp2* lokalisiert sind, wurde mit dem Ansatz der vergleichenden Genkartierung (HACKAUF und WEHLING 2005) mit zusätzlichen molekularen Markern angereichert. Die für Gerste und Weizen entwickelten EST-Ressourcen sowie die Reisingenomdaten ermöglichten es, 14 neue STS-Marker zu entwickeln, die innerhalb eines 23,8cM-Intervalls auf Chromosom 4RL kartieren. In einer F₂-Familie, welche nicht für einen Restorerlocus spaltete, wurden diese neuen Marker relativ zu den von STRACKE et al. (2003) beschriebenen Markern *SCY03* und *SCXX04* kartiert. Die Kopplungsanalyse von 96 Individuen ergab, dass 8 der neuen STS-Marker innerhalb der von *SCY03* und *SCXX04*

definierten, 6 cM weiten Zielregion lokalisiert sind.

In zwei weiteren, für *Rfp1* aufspaltenden F2-Familien wurden 155 *Rfp1*-Genotypen durch Bonitur von Antherengröße und Pollenschüttungsvermögen phänotypisiert. Die genetische Konstitution am *Rfp1*-Locus wurde durch Nachkommenchaftstests bestimmt. Die Kopplungsanalyse führte zur Lokalisierung von *Rfp1* in einem 1,3cM-Intervall, welches distal und proximal von den neuen Markern *Xiac76* bzw. *Xiac86* definiert ist (Abbildung 1). Beide STS-Marker werden kodominant vererbt. Bei gleichzeitiger Betrachtung der beiden flankierenden Marker als Selektionskriterium ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von lediglich 0.0043 % für eine Rekombination zwischen Markern und Zielgen. Mit den hier beschriebenen Markern ist somit eine sehr sichere markergestützte Selektionsentscheidung im Hinblick auf das Merkmal 'Fertilitätsrestauration' bei Roggen möglich.

Wir haben begonnen, die flankierenden Marker in ihrer Sequenz zu charakterisieren. Die Analyse der *Xiac76*-Sequenz ergab einen InDel-Polymorphismus, der für die Donoren von *Rfp1* ('Iran IX'), *Rfp2* ('Pico Gentario') und die sterilen Tester zu jeweils spezifischen *Xiac76*-Allelen führte und somit einen haplotypspezifischen Markerassay ermöglicht.

Auch die *Rfp1*-Zielregion auf Chromosom 4RL ist durch durch Rearrangements relativ zum Reisgenom charakterisiert. Die Suche nach Sequenzähnlichkeiten für den 2 cM proximal von *Rfp1* lokalisierten STS-Marker *Xiac69* zeigte, dass der diesem Marker zugrundeliegende EST in seiner Sequenz einem Gen auf Reischromosom R8 ähnlich ist. Für den 2,8 cM distal von *Rfp1* lokalisierten Marker *Xiac81* konnte hingegen im Reisgenom bislang weder auf Nukleinsäure- noch auf Aminosäureebene eine signifikant ähnliche Sequenz gefunden werden. Die STS-Marker *Xiac76* und *Xiac86*, welche den *Rfp1*-Locus direkt flankieren, wurden auf Grundlage von zwei annotierten Reisgenen entwickelt, die auf Reischromosom R2 9295 bp voneinander entfernt liegen.

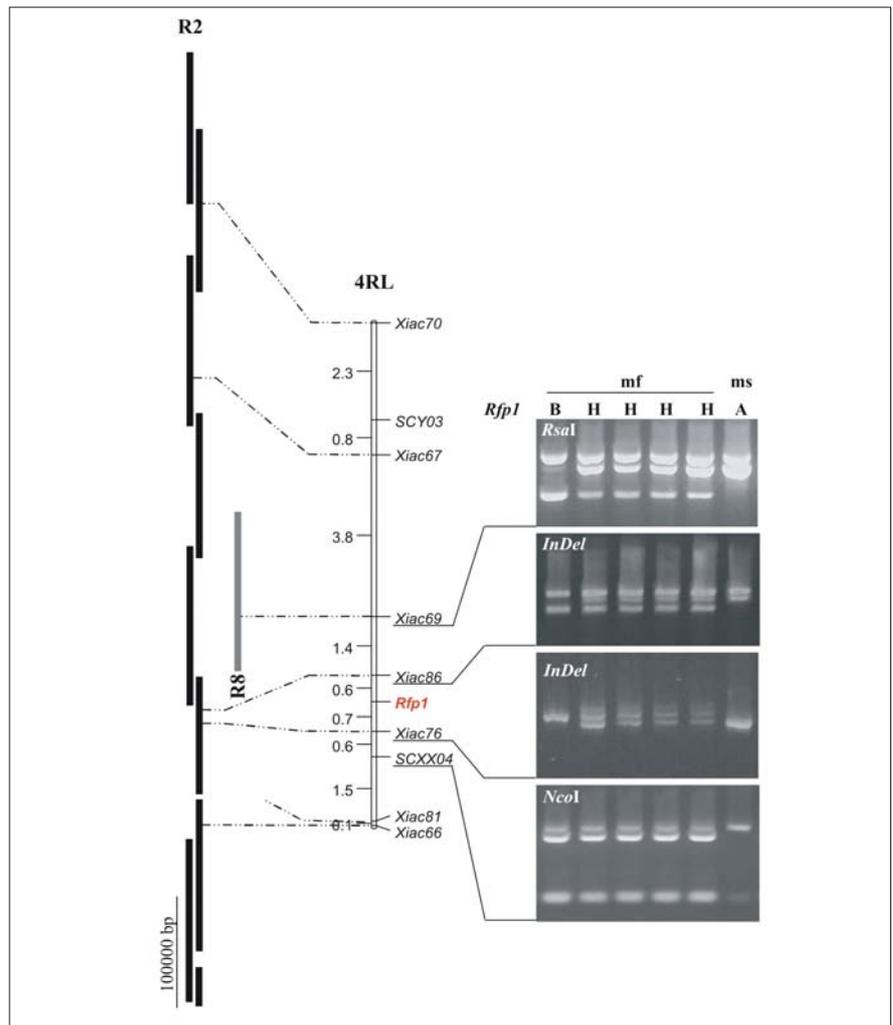


Abbildung 1: Entwicklung molekularer Marker für das Restorergen *Rfp1* auf Chromosom 4RL bei Roggen durch vergleichende Genkartierung. Die physikalische Karte von Reischromosom R2 (links) dient als Blaupause für die Entwicklung von Markern für Roggenchromosom 4RL (Mitte). Die neuen STS-Marker *Xiac76*, *Xiac86* und *Xiac69* folgen einem kodominanten Erbgang (rechts).

Zusammenfassung

Die Nutzung genetischer und genomischer Informationen für Modellgenome, die aufgrund von Kollinearitätsbeziehungen zwischen den Gräsergenomen möglich war, erlaubte es, neue Marker für ausgewählte Genombereiche des Roggens in einem gezielten Ansatz zu entwickeln. Die neu entwickelten Marker ermöglichen es nunmehr, den Selbstinkompatibilitätslocus *S* auf Chromosom 1RS sowie den Restorerlocus *Rfp1* auf 4RL präziser als bislang mit STS-Markern anzusprechen. Für Fruchtarten wie den Roggen mit limitierten genomischen Ressourcen eröffnen die Reisgenomdaten, ergänzt durch die genetischen Karten und EST-Ressourcen der Gerste, somit neue Perspektiven, um agronomisch

relevante Regionen des Roggen-genoms zu charakterisieren. Hierbei sind allerdings mögliche chromosomale Rearrangements zwischen Roggen, anderen Triticeen und Reis zu berücksichtigen.

Danksagung

Wir bedanken uns bei K. JANTZEN, I. KRÜGER, H. LINKE, A. KLAHR, T. SCZIGLOWSKI und R. VOSS für die technische Assistenz bei der Durchführung der vorgestellten Arbeiten. Ein Teil der Ergebnisse wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (WE-2079/1) finanziert.

Literatur

BIAN, X.Y., A. FRIEDRICH, J.R. BAI, U. BAUMANN, D.L. HAYMAN, S.J. BARKER and

- P. LANGRIDGE, 2004: High-resolution mapping of the *S* and *Z* loci of *Phalaris coerulescens*. *Genome* 47:918-930.
- GEIGER, H.H. and F.W. SCHNELL, 1970: Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Sci* 10:590-593.
- GERTZ, A. and G. WRICKE, 1989: Linkage between the incompatibility locus *Z* and a beta-glucosidase locus in rye. *Plant Breed* 102:255-259.
- HACKAUF, B., N. MAKAROVA und P. WEHLING 2003: Isolierung und molekulare Charakterisierung von Pseudokompatibilitätsgenen beim Roggen. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 61:100-110.
- HACKAUF, B. and P. WEHLING, 2005: Approaching the self-incompatibility locus *Z* in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics. *Theor Appl Genet.* 110:832-845.
- LANGRIDGE, P., U. BAUMANN and J. JUTTNER, 1999: Revisiting and revising the self-incompatibility genetics of *Phalaris coerulescens*. *Plant Cell* 11:1826.
- LI, X., J. NIELD, D. HAYMAN and P. LANGRIDGE, 1994: Cloning a putative self-incompatibility gene from the pollen of the grass *Phalaris coerulescens*. *The Plant Cell* 6:1923-1932.
- LUNDQVIST, A., 1956: Self-incompatibility in rye. I. Genetic control in the diploid. *Hereditas* 42:293-348.
- MIEDANER, T., C. GLASS, F. DREYER, P. WILDE, H. WORTMANN and H.H. GEIGER, 2000: Mapping of genes for male-fertility restoration in 'Pampa' CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 101:1226-1233.
- NASRALLAH, J.B., 2005: Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: comparisons to animal histocompatibility. *Trends Immunol.* 26:412-418.
- STRACKE, S., A.G. SCHILLING, J. FORSTER, C. WEISS, C. GLASS, T. MIEDANER and H.H. GEIGER, 2003: Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 106: 1184-1190.