

Erstellung einer cDNA-AFLP basierten Transkriptomkarte zur Malzqualität von Gerste

K. KRUMNACKER, S. MIKOLAJEWSKI, G. SCHWEIZER und M. HERZ

Einleitung

Malzqualität ist neben dem Ertrag das wichtigste Zuchtziel in der Sommergerste. Das Merkmal Malzqualität resultiert aus einem balancierten Zusammenwirken vieler Qualitätskomponenten, die alle quantitativ vererbt werden. Eine Schwierigkeit in Züchtungsprogrammen ist die erst in sehr späten Generationen (F_6) mögliche phänotypische Selektion auf dieses Merkmal in der Kleinvermälzung. Die Anwendung molekularer Marker würde hingegen eine schnelle und effiziente Selektion schon in frühen Generationen ermöglichen. Durch die Entwicklung genetischer Karten war es möglich, genomische Regionen, in denen QTL für Malzqualität lokalisiert sind, zu identifizieren (HAYES et al. 1993, MATHER et al. 1997, HARTL et al. 2000, MARQUEZ-CEDILLO et al. 2000). Die genetischen Karten geben oft gute Hinweise auf die Lokalisation der QTL im Genom, die Marker zeigen aber meist keine sehr enge Kopplung mit dem Merkmal und sind häufig auch spezifisch für den jeweiligen genetischen Hintergrund, in dem die QTL-Analyse durchgeführt wurde.

Auf Ebene der Genexpression abgeleitete funktionelle Marker hingegen sind innerhalb codierender Genomregionen lokalisiert und können mit ihren Sequenzinformationen auch weitere Aussagen über die genetische Basis des jeweiligen Merkmals liefern.

Ein Ansatz zur Entwicklung funktioneller Marker, bietet die Transkriptomkartierung, eine Methode bei der polymorphe Transkripte, durch eine Genexpressionsanalyse generiert, für eine genetische Kartierung genutzt werden (BRUGMANS et al. 2002). Die durch spezifische Induktion aktivierten Gene, werden mittels cDNA-AFLP-Analyse, einer Technik zur Erstellung und Vergleich von Expressionsprofilen, identifiziert

(BACHEM et al. 1996). BRUGMANS et al. (2002) zeigten in Kartoffel, dass diese spaltenden cDNA-AFLP Fragmente, sogenannte TDFs (transcript derived fragments) kartiert werden können und sich so funktionelle Marker Chromosomenbereichen zuordnen lassen, die mit dem spezifisch induzierten Merkmal assoziiert sind. Die Eignung der cDNA-AFLP-Technik zur Untersuchung der Genexpression vermälzter Gerstenkörner wurde von MIKOLAJEWSKI et al. (2002) bestätigt.

Unter der Annahme, dass ein großer Teil der Gene, die für Malzqualität verantwortlich sind während des Vermälzungsprozesses induziert werden, ist eine cDNA-AFLP Analyse von direkt aus dem laufenden Vermälzungsprozess entnommenen Proben ein optimaler Ansatz zur Identifizierung der mit Malzqualität korrelierten Gene.

In der hier beschriebenen Studie wurde eine solche Genexpressionsanalyse in der Gerstenpopulation Alexis×Steina durchgeführt. Diese Population wurde bereits für eine QTL-Kartierung der Malzqualität genutzt. Hierbei wurden vier QTL-Intervalle auf den Chromosomen 1H, 4H, 5H und 6H detektiert (HARTL et al. 2000). Diese Genombereiche sind aber noch zu weit gefasst, um eng gekoppelte Marker zu finden, die für eine MAS (marker assisted selection) genutzt werden könnten.

Ziel der vorliegenden Studie war daher die Erstellung einer Transkriptomkarte für Gerste, in der genomische Markerdaten zusammen mit cDNA-AFLP Markern, die auf der Genexpression während der Vermälzung beruhen, kartiert werden. Transkriptommarker, die in den bereits detektierten wichtigen Genombereichen für Malzqualität lokalisiert sind, repräsentieren interessante Kandidatengene für eine weiterführende Sequenzanalyse und Markerentwicklung.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Kleinmälzung

Für die Transkriptomkartierung wurde eine Subpopulation von 48 DH-Linien aus der QTL-Kartierungspopulation Alexis × Steina selektiert. Alexis und Steina sind beides zweizeilige Sommergerstensorten mit guter Malzqualität, die sich vor allem in den proteolytischen Parametern und der allgemeinen Enzymausstattung unterscheiden. Die selektierten DH-Linien wurden 2001 zusammen mit den Eltern in 10 m² Parzellen in 2 Wiederholungen angebaut. Für die Kleinmälzung wurden die Wiederholungen vereinigt. Von jeder DH-Linie wurden 250 g Körner der Siebfraktion über 2,5 mm in einer vollautomatischen Kleinmälzungsanlage (Phoenix Systems, Australia) vermälzt. Der Kleinmälzungsprozess und die Malzanalyse erfolgten nach den Vorschriften der MEBAK (1997). Während der Vermälzung wurden 24 h nach Beginn des Prozesses Proben (3 g) jeder Linie entnommen und sofort bei -80° C gelagert.

RNA Isolierung, cDNA-Synthese und cDNA-AFLP Analyse

RNA Isolierung, cDNA-Synthese und cDNA-AFLP Analyse wurden wie bei MIKOLAJEWSKI et al. (2002) beschrieben, durchgeführt. 31 AFLP Primerkombinationen wurden gescreent. Die Bezeichnung der Primerkombinationen wurde aus der Standardliste für AFLP Primer (Keygene Nomenklatur) übernommen. Die Namen der AFLP-Loci basieren auf der verwendeten Primerkombination, gefolgt von einer Nummer, die der Fragmentgröße entspricht. Alle cDNA-AFLP Marker sind mit einem c beginnend gekennzeichnet.

Genomische Markeranalyse

Für die genomische Markeranalyse wurden alle 134 DH Linien der Alexis × Stei-

Autoren: Dipl.agr.biol. Kerstin KRUMNACKER, Dr. Sabine MIKOLAJEWSKI, Dr. Günther SCHWEIZER und Dr. Markus HERZ, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING



na Population genutzt. DNA wurde nach ANDERSON et al. (1992) isoliert. Die AFLP Analyse wurde nach VOS et al. (1995) mit Modifikationen nach HARTL et al. (1999) und BEHN et al. (2004) durchgeführt. Die genomischen AFLP Marker sind mit einem **g** gekennzeichnet. Mikrosatelliten, entwickelt von verschiedenen Autoren wurden in der Kartierung genutzt. Genaue Beschreibung der Mikrosatelliten, PCR Bedingungen und Fragmentanalyse sind bei BEHN et al. (2004) beschrieben.

Kopplungsanalyse und Einzelmarkerregression

Spaltende Transkripte wurden zusammen mit den genomischen Markerdaten der Alexis×Steina Population kartiert. Die cDNA- und die genomischen AFLPs wurden mit der Software Cross Checker (BUNTJER 2000) ausgewertet. Die Erstellung der Kopplungskarte wurde mit dem Programm Joinmap 3.0 (Plant Research International BV, Wageningen) durchgeführt. Zur Gruppierung wurde ein LOD Wert von ≥ 3 gewählt. Die Berechnung der Kopplungsabstände erfolgte nach Haldane. Die Einzelmarkerregression wurde mit der GLM Prozedur in SAS 9.1 durchgeführt. Die Malzqualitätsdaten entsprechen den Daten in HARTL et al. (2000).

Ergebnisse und Diskussion

cDNA-AFLP Markerdaten

Die Subpopulation der Alexis×Steina Kreuzung wurde zum Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Vermälzung mit 31 cDNA-AFLP Primerkombinationen gescreent. Hierbei konnten insgesamt 185 polymorphe TDFs detektiert werden. Durchschnittlich waren dies 6 Marker pro Primerkombination, wobei die Spanne zwischen 3 und 16 ausgewerteten Polymorphismen lag. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von BRUGMANS et al. (2002) überein, die durchschnittlich neun Polymorphismen fanden mit einer Spannweite von 1 bis 19 Markern pro Kombination. 109 cDNA-AFLP Marker waren Alexis-spezifisch und 76 wurden von Steina vererbt. Die Fragmentgröße lag zwischen 100-700 bp. 85 Transkriptommarker zeigten eine gestörte Spaltung. Dies ist ein bekanntes Phänomen in durch Antherenkultur erstell-

ten DH-Populationen (GRANER et al. 1991, SAYED et al. 2002). Die Ursache liegt in der unterschiedlichen Effizienz der Elternlinien in der Antherenkultur und ist kein markersystemspezifisches Problem.

Kopplungsanalyse

Für die Erstellung der Transkriptomkarte lagen insgesamt 376 Marker vor. Die Marker, die signifikant vom erwarteten Spaltungsverhältnis abwichen, wurden vor der Berechnung verworfen. Die resultierende Transkriptomkarte besteht aus 168 Loci (89 genomischen AFLPs, 51 SSRs, 38 cDNA-AFLPs), die sich auf 10 Kopplungsgruppen verteilen. Die Mikrosatelliten wurden als Ankermarker für die chromosomale Zuordnung genutzt. Neun Kopplungsgruppen konnten den Gerstenchromosomen 1H, 2H, 4H, 5H, 6H und 7H zugeordnet werden. Chromosom 3H konnte aufgrund zu geringer Markerdichte in dieser genomischen Region nicht identifiziert werden. Eine weitere Kopplungsgruppe konnte bis jetzt noch keinem Chromosom zugeordnet werden. Die Anzahl der Loci in den Gruppen variiert von 7 bis 32.

Die Karte ist in *Abbildung 1* dargestellt. Die Transkriptomkarte hat eine Gesamtlänge von 1022 cM mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 6,5 cM. Aufgrund der Tatsache, dass Chromosom 3H nicht identifiziert werden konnte, ist diese Kartengröße vergleichbar mit der anderer Gerstenpopulationen (QI et al. 1998, 1062 cM; RAMSEY et al. 2000, 1173 cM).

Transkriptommarker kartieren auf jedem Chromosom. Eine Anzahl von cDNA-AFLP Markern ist direkt in den interessanten QTL Intervallen für Malzqualität lokalisiert, insbesondere auf Chromosom 5H und 6H. Auf Chromosom 5H wurde ein Cluster von Transkriptommarkern detektiert. Fünf cDNA-AFLP Marker cosegregieren und zwei weitere kartieren im Abstand von 1 cM neben diesem Locus. Insgesamt wurden 12 Transkriptommarker auf 5H identifiziert. Auf 6H kartieren fünf der TDFs in den interessanten Chromosomenbereichen. In einer Reihe von Studien wurden wichtige QTL für Malzqualität in bestimmten Regionen auf Chromosom 5H detektiert (MATHER et al. 1997, OKADA et al. 2006). Es kann angenommen werden, dass die

se Chromosomenregionen entscheidende Schritte der Keimung beeinflussen und eine Kaskade von wichtigen Modifikationprozessen während der Mälzung hervorrufen. Die Verteilung der Transkriptommarker über alle Chromosomen, auch außerhalb der QTL Hot Spots für Malzqualität hat mehrere Gründe. Die Keimung ist einer der transkriptionsaktivsten Prozesse während der Entwicklung einer Pflanze, so dass auch Gene exprimiert und detektiert werden, die nicht mit Malzqualität korreliert sein müssen. Da die cDNA-AFLP Technik eine sehr sensitive Methode ist, wird das gesamte Transkriptom erfasst. Ein zweiter Punkt ist, dass auch QTL mit geringeren Effekten bestehen, die nicht in den Hot Spots lokalisiert sind oder nicht in der QTL Analyse detektiert wurden. In einigen Fällen koinzidieren bereits bekannte Kandidatengene für Schlüsselenzyme der Keimung und Mälzung nicht mit den erfassten QTL (MATHER et al. 1997).

Einzelmarkerregression

Der Zusammenhang zwischen den Transkriptommarkern und den Malzqualitätsmerkmalen aus mehreren Umwelten wurde mit Hilfe einer Einzelmarkerregression geschätzt. In *Abbildung 2* sind die Ergebnisse der Regression für die Transkriptommarker, die entweder in die QTL Hot Spots kartieren oder auf den entsprechenden Chromosomen liegen, dargestellt. Es ist erkennbar, dass die meisten Marker einen signifikanten Zusammenhang für mehrere Merkmale konstant über die Mehrzahl der Umwelten hinweg zeigen. Hierbei erklären die TDFs jeweils bis zu 30% der phänotypischen Varianz eines Merkmals.

Besonders deutliche Zusammenhänge ergaben sich für die Merkmale Eiweißlösungsgrad und VZ45°C.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Induktion der Genexpression durch den streng kontrollierten Prozess der Kleinmälzung in Kombination mit der cDNA-AFLP Technik eine effiziente und gute Möglichkeit zur Untersuchung des malzqualitätsrelevanten Transkriptoms darstellt. Spaltende Transkripte konnten zusammen mit genomischen

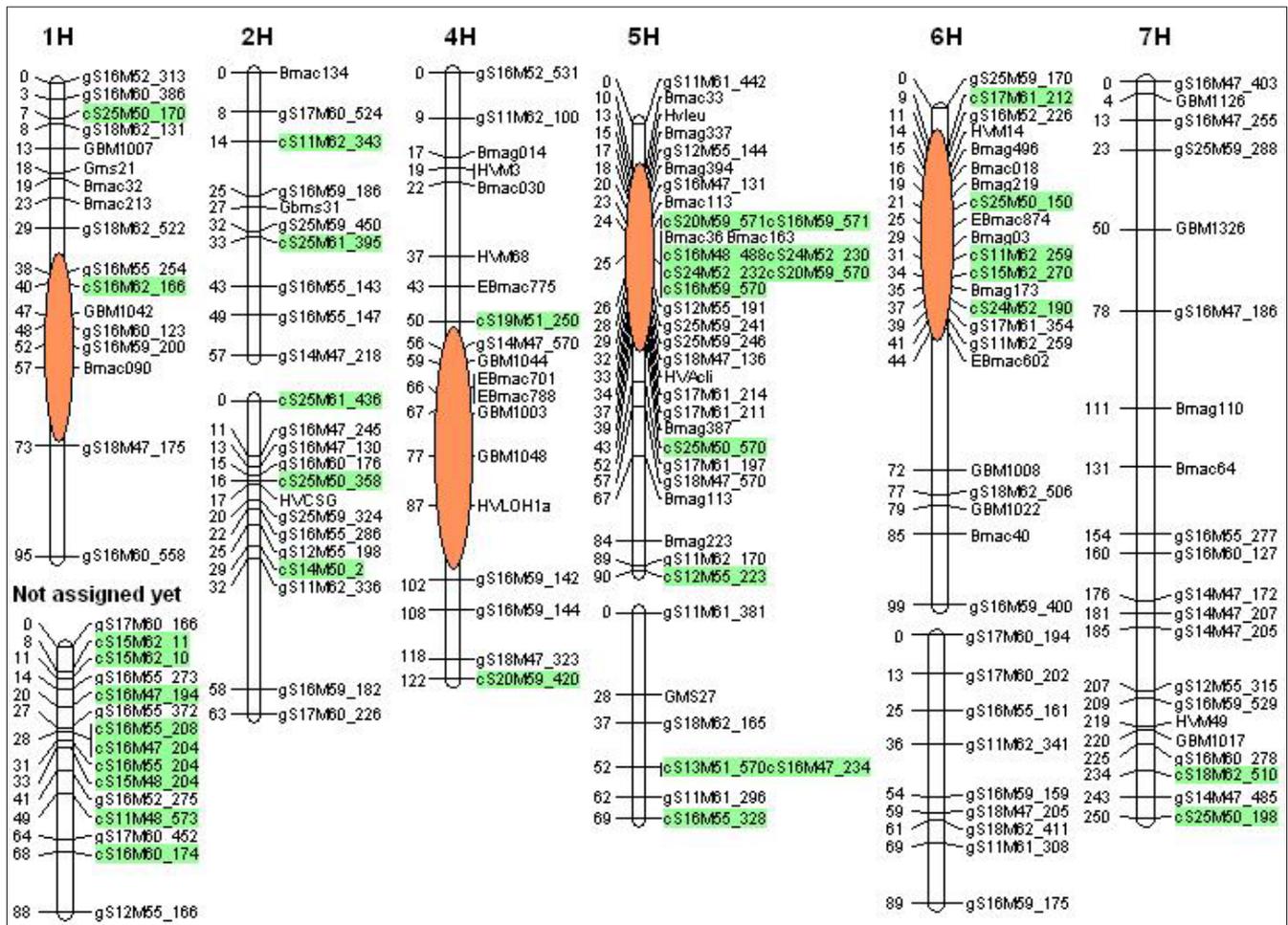


Abbildung 1: Transkriptomkarte der Alexis×Steina Subpopulation. Dargestellt sind die Chromosomen 1H, 2H, 4H, 5H, 6H und 7H. Die cDNA-AFLP Marker sind mit einem c markiert und dunkel unterlegt. Die Regionen der QTL Hot Spots sind durch Ellipsen gekennzeichnet.

Marker	Parameter											
	BRA	ELG	EV	EXT	FRI	LN	MQI	PHW	RP	VIS	VZ 45°C	
cS16M59_570	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS16M59_571	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS25M50_570	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS24M52_232	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS25M50_170	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS11M62_259	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS16M48_488	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS17M61_212	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS24M52_190	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS17M60_570	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS24M52_230	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS25M50_150	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS15M62_270	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS19M51_250	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS20M59_571	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS20M59_570	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
cS20M59_420	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün

Abbildung 2: Graphische Darstellung der R²-Werte der Einzelmarkerregression ausgewählter Transkriptommarker für Malzqualität. Jede Spalte repräsentiert eine einzelne Umwelt. Grün: R² 0,1-0,25; Gelb: R² 0,25-0,3; Rot: R² >0,3 BRA: Brabender, ELG: Eiweißlösungsgrad, EV: Endvergärungsgrad, EXT: Extrakt, FRI: Friabilimeter, LN: Lösl. N, MQI: Malzqualitätsindex, PHW: ph, RP: Rohprotein, VIS: Viskosität, VZ45°: Hartongindex

Markerdaten kartiert werden. Die cDNA-AFLP Marker sind vor allem in den transkriptionsaktiven Genomregionen, die in Zusammenhang mit Malzqualität stehen, lokalisiert. Dies konnte mit der Einzelmarkerregression bestätigt werden.

Die Fragmente, die in den QTL-Intervallen kartieren und die einen bestimmten Anteil der Merkmalsvarianz in der Einzelmarkerregression erklären, repräsentieren Kandidaten für die Entwicklung funktioneller Marker. Genetische Marker, die direkt auf den Sequenzen der beteiligten Gene beruhen, wären ein sehr effizientes und zuverlässiges Hilfsmittel für die Selektion gewünschter Genotypen, bereits in frühen Generationen des Züchtungsprozesses.

Um die Marker-Merkmal Assoziationen zu bestätigen und um den genauen Anteil der Kandidaten an der phänotypischen Varianz zu klären wird die Transkriptomkartierung auf die gesamte Alexis × Steina Population von 134 DH-Linien ausgeweitet und nach Beendigung der phänotypischen Datenaufnahme eine nochmalige QTL-Analyse durchgeführt. Die Arbeit wird durch das BMBF im Rahmen des GABI-MALT Projektes (Förderkennzeichen 0313125C) gefördert.

Literatur

- ANDERSON, J.A., Y. OGIHARA, M.E. SORRELLS and S.D. TANKSLEY, 1992: Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor Appl Genet* 83, 1035-1043.
- BACHEM, C., R. VAN DER HOEVEN, M. DE BRUIJN, D. VREUGDENHIL, M. ZABEAU and R. VISSER, 1996: Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9, 745-753.
- BEHN, A., L. HARTL, G. SCHWEIZER, G. WENZEL and M. BAUMER, 2004: QTL mapping for resistance against non-parasitic leaf spots in a spring barley doubled haploid population. *Theor Appl Genet* 108, 1229-1235.
- BRUGMANS, B., A.F. DEL CARMEN, C.W.B. BACHEM, H. VAN OS, H. J. VAN ECK and R.G.F. VISSER, 2002: A novel method for the construction of genome wide transcriptome maps. *The Plant Journal* 31 (2), 211-222.
- BUNTJER, J.B., 2000: CROSSCHECKER: computer-assisted scoring of genetic AFLP data. In *Plant and Animal Genome VIII Conference*, San Diego, CA, January 9-12. 2000. <http://www.intl-pag.org/pag/8/abstracts/pag8664.html>.
- GRANER, A., A. JAHOOOR, J. SCHONDELMAIER, H. SIEDLER, K. PILLEN, G. FISCHBECK, G. WENZEL and R.G. HERRMANN, 1991: Construction of a RFLP map of barley. *Theor Appl Genet* 83, 250-256.
- HARTL, L., V. MOHLER, F. ZELLER, S. HSAM and G. SCHWEIZER, 1999: Identification of AFLP markers closely linked to powdery mildew resistance genes *Pm1c* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) Genome 42, 322-329.
- HARTL, L., G. SCHWEIZER, M. HERZ und M. BAUMER, 2000: Molekulargenetische Lokalisierung von QTL für die Malzqualität der Gerste. *Berichte über die Arbeitstagung 2000 der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter*, 21.-23. November 2000, 117-122.
- HAYES, P.M., B.H. LIU, S.J. KNAPP, F. CHEN, B. JONES, T. BLAKE, J. FRANCKOWIAK, D. RASMUSSEN, M. SORRELLS, S.E. ULLRICH, D. WESENBERG und A. KLEINHOF, 1993: Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theor Appl Genet* 87, 392-401.
- MARQUEZ-CEDILLO, L.A., P.M. HAYES, B.L. JONES, A. KLEINHOF, W.G. LEGGE, B.G. ROSSNAGEL, K. SATO, E. ULLRICH and D.M. WESENBERG, 2000: The North American Barley, QTL analysis of malting quality in barley based on the double-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theor Appl Genet* 101, 173-184.
- MATHER, D.E., N.A. TINKER, D.E. LABERGE, M. EDNEY, B.L. JONES, B.G. ROSSNAGEL, W.G. LEGGE, K.G. BRIGGS, R.B. IRVINE, D.E. FALK and K.J. KASHA, 1997: Regions of the genome that affect grain and malt quality in a North American two-row barley cross. *Crop Sci* 37, 544-554.
- MEBAK, 1997: Brautechnologische Analysemethoden, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission. MEBAK, D-85350 Freising-Weißenstephan, Germany.
- MIKOLAJEWSKI S., M. HERZ, K. PICHLMAIER, G. SCHWEIZER und M. BAUMER, 2002: Untersuchung differentieller Genexpression im Verlauf der Vermälzung von Gerstenkörnern - ein Vergleich von Brau- und Futtergerstensorten mittels cDNA-AFLP Technik. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 54: 405-408.
- OKADA, Y., M. KIHARA, W. SAITO, N. KAWADA and K. ITO, 2006: QTL mapping for malting quality and starch-degrading enzyme activity based on the double-haploid progeny of standard Japanese and North American malting barley cultivars. *MBAA TQ* 43, no.1, 9-14.
- QI, X., P. STAM and P. LINDHOUT, 1998: Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet* 96, 376-384.
- RAMSEY, L., M. MACAULAY, S. IVANISSEVICH, K. MACLEAN, L. CARDLE, J. FULLER, K.J. EDWARDS, S. TUVESON, M. MORGANTE, A. MASSARI, E. MAESTRI, N. MARMIROLI, T. SJAKSTE, M. GANAL, W. POWELL and R. WAUGH, 2000: A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156, 1997-2005.
- SAYED, H., H. KAYYALI, L. RAMSEY, S. CECARELLI and M. BAUM, 2002: Segregation distortion in double haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR) markers *Euphytica* 125, 265-272.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRITJERS, J. POT., J. PELEMAN, M. KUIPER and M. ZABEAU, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, 4407-4414.