

Assoziationsstudie in Gerste für das Merkmal Ährenschieben

S. STRACKE, G. HASENEYER, S. SAUER, H.H. GEIGER und A. GRANER

Für Identifizierung von Genen, die maßgeblich zur Variation agronomisch wichtiger Merkmale beitragen, gewinnt die Evaluierung der Nukleotiddiversität ausgewählter Kandidatengene und die Analyse der Assoziation zwischen Sequenzpolymorphismen und Merkmalsvariationen zunehmend an Bedeutung. Dieser Ansatz der Verknüpfung von Genomforschung und Diversitätsanalysen wird im Rahmen eines Gabi-Génoplante Projektes für bedeutende Getreidearten (Gerste, Roggen, Mais, Weizen, Reis, Sorghum) verfolgt. Das Gesamtvorhaben zielt auf eine detaillierte molekulare Untersuchung von Genombereichen, welche für die Pflanzenzüchtung und -produktion von besonderem Interesse sind. Im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses stehen hierbei die Nutzung von Kandidatengenen für die Beeinflussung des reproduktiven Wachstums (Blüh- und Reifezeitpunkt, Wuchshöhe, Kornqualitätsparameter) sowie die Entwicklung und Einführung innovativer Verfahren zur Analyse und züchterischen Nutzung von Marker/Merkmal-korrelationen. Neben der vergleichenden Analyse innerhalb einer Art bietet die Bearbeitung gleicher Kandidatengene die einzigartige Möglichkeit eines artenübergreifenden Vergleichs zwischen Getreidearten mit unterschiedlicher Reproduktionsweise, Domestikation, Züchtungsgeschichte und Genomstruktur.

Im Nachfolgenden werden erste Ergebnisse der Studie an drei Kandidatengenen für das Merkmal Ährenschieben in einer genetisch breiten Kollektion von Sommergersten dargestellt. Die selektierten Kandidatengene *PpdH1*, *HvCO1* und *HvFT* spielen eine bedeutende Rolle in der photoperiodischen Regulation des Ährenschiebens bzw. der Blüte unter Langtagbedingungen (TURNER et al. 2005). *PpdH1* (homolog zum Pseudo-Response Regulator *PRR7* in Arabidop-

sis) ist einer der zwei Haupt-QTL für Blüte in Gerste und lokalisiert auf Chromosom 2H.

Ableitend aus den Studien an *PRR7* wird vermutet, dass *PpdH1* eine wichtige Rolle in der Funktion des Zirkadian-Rhythmus spielt. *HvCO1* (homolog zu *CONSTANS*, *CO* in Arabidopsis) und *HvFT* (homolog zu *FLOWERING LOCUS T*, *FT* in Arabidopsis) sind auf Chromosom 6H lokalisiert. In der Regulationskette sind sie *PpdH1* nachgelagert und ihre Expression ist durch den Zirkadian-Rhythmus reguliert. *HvCO1* kodiert für einen transkriptionalen Aktivator, welcher direkt oder indirekt die Expression von *HvFT* induziert. Aufgrund der Interaktion zwischen den Genen und ihrer diversen Expressionsmuster in früh- und spätblühenden Genotypen (TURNER et al. 2005) sind sie interessante Kandidaten für die Identifizierung entsprechender „Leistungs-Allele“ (SNP-Haplotypen) für das Merkmal Ährenschieben bzw. Blüte.

Material und Methoden

Zur Bearbeitung der Fragestellungen wurde ein Gerstensortiment bestehend aus 150 Sorten und Stämmen der beteiligten Züchterfirmen Lochow-Petkus GmbH und Dr. J. ACKERMANN & Co. sowie 223 weltweit verbreitete Akzessionen aus der „Barley Core Collection“ und der Gaterslebener Genbankkollektion zusammengestellt. Die Genbankakzessionen stammen aus den Regionen Europa (117, EU), Westasien (36, WA), Ostasien (40, EA) und Amerika (30, AM). Im Nachfolgenden werden die beiden Materialsätze wie folgt abgekürzt: ‚Z‘ für die Sorten und Stämme der Züchterfirmen und ‚BCC‘ für das Genbankmaterial. Die Evaluierung des Sortiments hinsichtlich Ährenschieben erfolgte im Jahr 2004 in Irlbach und 2005 an den

drei Standorten Hohenheim, Irlbach und Wohlde. Die Versuchsanlage an jedem Standort war eine Gitteranlage mit 3 Wiederholungen. Das Merkmal Ährenschieben wurde als Tage nach Aussaat erfasst. Die Verrechnung der Boniturdaten erfolgte über alle 4 Umwelten unter Verwendung von PLABSTAT (UTZ 1993).

Für die Schätzung der genetischen Struktur dieser Kollektion wurden die Allele von 25 EST-abgeleitete, hochgradig polymorphe Mikrosatellitenmarker (SSR) erfasst und mit STRUCTURE 2.1 (PRITCHARD et al. 2000) verrechnet. Für die Identifizierung der Anzahl der Untergruppen wurde der Ansatz nach EVANNO et al. (2005) verwendet.

Die Genotypisierung erfolgte durch die Sequenzierung von zwei Fragmenten je Gen im gesamten Pflanzenmaterial. Die amplifizierten Genfragmente wurden basierend auf CAPS (Cleaved amplified polymorphic sites)-Markern in der DH-Population Steptoe x Morex (STEIN et al. eingereicht) kartiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Akzessionen der BCC zeigten im Ährenschieben über vier Umwelten eine höhere phänotypische Diversität als das Z Material (Abbildung 1).

Für beide Materialsätze ergaben sich signifikante Schätzwerte der genotypischen Varianz und der Genotyp x Umwelt-Interaktionsvarianz. Die genetische Varianz war in der BCC 14-fach größer als im Z Material. Die Bedeutung der Genotyp x Umwelt-Interaktion war in beiden Materialsätzen nur gering, was zu Heritabilitäten von über 90% führte (Tabelle 1).

Basierend auf den Allelen der SSRs in der gesamten Kollektion zeigte sich eine deutliche Gruppierung in das genetisch

Autoren: Dr. Silke STRACKE, Grit HASENEYER und Prof. Dr. Andreas GRANER, Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, GATERSLEBEN; Dr. Sascha SAUER, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, BERLIN; Prof. Dr. agr. Dr. h.c. Hartwig H. GEIGER, Universität Hohenheim, Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, STUTTGART



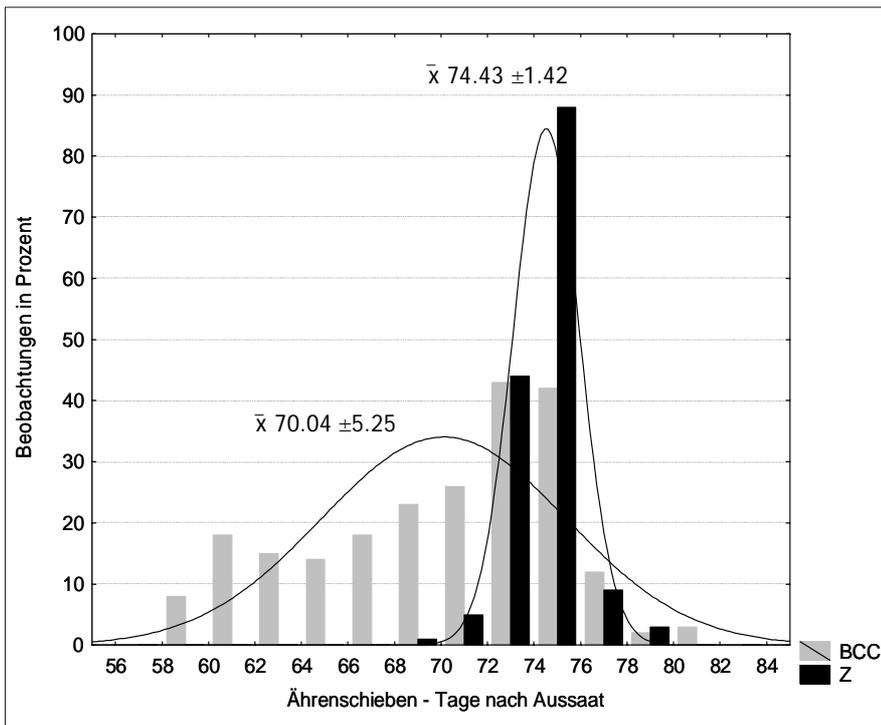


Abbildung 1: Phänotypische Variation für Ährenschieben innerhalb der Genbankkzessionen (BCC) und der Zuchtsorten und -stämme (Z). Mittelwerte (\bar{x}) mit Standardabweichung sind über den jeweiligen Verteilungen eingetragen.

Tabelle 1: ANOVA über 4 Umwelten für das Merkmal Ährenschieben in den Genbankkzessionen (BCC) und den Zuchtsorten und -stämmen (Z)

	FG	Var.kp	F
BCC			
Genotyp	219	26.8111	29.80**
Genotyp x Umwelt	649	3.3187	9.19**
Fehler	2675	0.4053	
Heritabilität (der Prüfgliedmittelwerte): 97%			
Z			
Genotyp	149	1.8447	12.58**
Genotyp x Umwelt	447	0.2321	1.57**
Fehler	2675	0.4053	
Heritabilität (der Prüfgliedmittelwerte): 92%			

breite BCC Material und das hochgradig verwandte Z Material. Innerhalb des BCC deutete sich eine Gruppierung in 2 Untergruppen an. Diese Struktur erklärt einen erheblichen Anteil des Merkmals Zeiligkeit (zwei- und sechszeilig).

Die Analyse der Kandidatengene *PpdH1*, *HvCO1* und *HvFT* zeigte deutliche Differenzen in der Diversität innerhalb der beiden Materialsätze (Tabelle 2). In dem Z Material wurden 2 Haplotypen in jedem der drei Gene identifiziert,

Tabelle 2: Diversität in den Kandidatengenen *PpdH1*, *HvCO1* und *HvFT*

Gene	Chromosom	Analysiertes Fragment	Genotypenanzahl ¹⁾	polymorphe Nukleotide	Polymorphie-rate	Haplotypenanzahl		Π total ¹⁾	Π kodierende Region ¹⁾
						BCC	Z		
<i>PpdH1</i>	2H	1,2 kb	209	15	1/82 bp	10	2	0,0025	0,0029
<i>HvCO1</i>	7H	1,8 kb	204	21	1/84 bp	14	2	0,0002 ²⁾	0,0002 ²⁾
<i>HvFT</i>	7H	2,0 kb	194	26	1/76 bp	9	2	0,0021 ²⁾	0,0003 ²⁾

¹⁾ Angaben basieren auf dem Materialset BCC

²⁾ Nukleotiddiversität wurde getrennt für nichtüberlappende Genfragmente berechnet

ziert, wobei die Frequenz des seltenen Allels bei 0,01 (*PpdH1* und *HvFT*) und 0,1 (*HvCO1*) lag.

Diese drastisch eingeschränkte Diversität weist auf eine starke Fixierung einzelner Allele im aktuellen Zuchtmaterial hin und somit auf einen hohen Selektionsdruck. Das BCC Material zeigte eine wesentlich höhere Diversität, wobei das Material aus EU geringere Variation gegenüber dem Material aus EA, WA und AM aufwies. Die Haplotypenanzahl in der BCC variierte zwischen 9 (*HvFT*) und 14 (*HvCO1*).

Die durchschnittliche Polymorphierate aller drei Gene war ähnlich und lag zwischen 1/76 bp - 1/84 bp, jedoch wurden deutliche Unterschiede im Diversitätsverlauf erkennbar. In *PpdH1* war die Nukleotiddiversität in den kodierenden Bereichen am höchsten und zeigte keinen Unterschied zur Nukleotiddiversität im gesamten Fragment. In *HvCO1* und *HvFT* hingegen war die Diversität im kodierenden Bereich stark reduziert. Während *PpdH1* ausgewogene Frequenzen der Allelvarianten aufwies, lag die Frequenz des seltenen Allels aller Polymorphismen in den kodierenden Bereichen von *HvCO1* und *HvFT* unter 5%.

Die beobachtete Variation in der Diversität der drei Gene könnte einen Hinweis auf ihre unterschiedliche Funktion innerhalb der Regulationskette geben und lässt auf unterschiedliche Mechanismen in der Evolution schließen. Inwieweit sich diese Unterschiede zwischen den Genen auf den Erfolg einer Assoziationsstudie auswirken soll in der Fortsetzung des Projektes geprüft werden.

Danksagung

Die Autoren danken den beteiligten Züchterfirmen Lochow Petkus GmbH und Dr. J. ACKERMANN & Co. für die

Bereitstellung des Pflanzenmaterials und die Durchführung der umfangreichen Feldevaluierungen. Katrin TRNKA (IPK), Jochen JESSE (Uni. Hohenheim), Silvia KOCH (Uni. Hohenheim) und Anett SMYRA (MPI Berlin) danken wir für die hervorragende technische Unterstützung.

Das Projekt wird finanziell gefördert durch das BMBF im Rahmen der GABI-Initiative (0313098A-C).

Literatur

- EVANNO, G., S. REGNAUT and J. GOUDET, 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS and P. DONNELLY, 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- STEIN, N., M. PRASAD, U. SCHOLZ, T. THIEL, H. ZHANG, M. WOLF, R. KOTA, R. VAR-

- SHNEY, D. PEROVIC, I. GROSSE and A. GRANER, 2006: A 1000 loci transcript map of the barley genome - new anchoring points for integrative grass genomics, TAG in print.
- TURNER, A., J. BEALES, S. FAURE, R.P. DUNFORD and D.A. LAURIE, 2005: The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031-1034.
- UTZ, H.F., 1993: PLABSTAT VERSION 2H. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics. University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.