

Haplotypdiversität von Kandidatengen mit Einfluss auf die Malzqualität in Gerste

I. E. MATTHIES und M. S. RÖDER

Einführung

Neben Ertrag ist eine gute Malz- und Brauqualität die wichtigste Eigenschaft in der Sommergerstenzüchtung. Innerhalb des vom BMBF geförderten Verbundprojektes GABI-MALT werden mit verschiedenen molekularbiologischen Ansätzen deren genetische Grundlagen untersucht. Da dieser Merkmalskomplex quantitativ vererbt wird, ist eine Analyse auf rekombinationsgenetischer Ebene nur sehr begrenzt möglich. Daher werden in unserem Teilprojekt folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- (1) die Identifizierung von relevanten Kandidatengen,
- (2) die Untersuchung der allelischen Diversität dieser Kandidatengene,
- (3) der Einfluss der genetischen Unterschiede auf die Malzqualität, sowie
- (4) die Entwicklung von diagnostischen Markern.

Unser Ziel ist dabei, die Diversität von Kandidatengen durch die Detektion von ‚*single nucleotide polymorphisms*‘ (SNP) und Insertionen-Deletionen (INDELs) zu analysieren und deren Bezug zu entscheidenden Malzparametern in Gerste zu untersuchen. Folgende Arbeitshypothese liegt dieser Arbeit zugrunde: Eine Sorte mit guter Malzqualität besitzt andere Allele für relevante Gene als eine Sorte mit schlechter Malzqualität (→ *structural genomics* Ansatz). Alternativ wird folgende Hypothese in zwei anderen Teilprojekten von GABI-MALT getestet: In einer Sorte mit guter Malzqualität werden bestimmte Gene stärker oder schwächer exprimiert als in einer Sorte mit schlechter Malzqualität (→ *functional genomics* Ansatz).

Vorgehensweise und Ergebnisse

Ziel ist die Detektion von SNPs in relevanten Kandidatengen für Malzquali-

tät, welche im wesentlichen aus zwei Quellen resultieren:

- Enzyme und andere Proteine, welche aufgrund ihrer Funktion in der Literatur in Zusammenhang mit Malzqualität beschrieben wurden (FOX et al. 2003; HAYES et al. 2003; SWANSTON & ELLIS 2002; etc.).
- ESTs bzw. deren korrespondierenden Gene, welche in den anderen Teilprojekten aufgrund von differentieller Expression als mögliche Kandidaten identifiziert wurden (POTOKINA et al. 2004).

Das für Malzqualität wichtige Enzym β -Amylase wurde dabei nicht berücksichtigt, da die Haplotypenstruktur dieses Enzymes bereits untersucht wurde (MALYSHEVA-OTTO & RÖDER 2006).

Analyse der Genstruktur und Haplotypen-Assoziation

Aus insgesamt 62 Genen mit bekannter Funktion oder putativer Bedeutung für den Malz- und Brauprozess wurden Fragmente in einem Standardset von 8 diversen Referenzgenotypen sequenziert und auf Vorhandensein und Position von Polymorphismen geprüft, welche das jeweilige Haplotypenmuster (= Summe der Sequenzunterschiede) determinieren. Es wurden insgesamt 463 Primerkombinationen für alle Kandidatengene getestet. Ungefähr die Hälfte aller untersuchten Primerkombinationen zeigten Einzelkopie-Amplifikate von 300-600 bp in verschiedenen Bereichen der kodierenden Gene. Hier konnten eine unterschiedliche Zahl an SNPs und INDELs abhängig vom untersuchten Genabschnitt detektiert werden. Anschließend wurden 111 Primerkombinationen genutzt, um 64 ausgewählte deutsche Gerstensorten zu untersuchen.

Bisher wurden ca. 30 % aller studierten Kandidatengene (z.B. Hydrolasen, Stärkesynthasen, Speicherproteine, Lipoxy-

genasen, Proteinasen) auf die Existenz von INDELs, SNPs, deren Lokalisation in der ‚*untranslated region*‘ (UTR), im Intron oder Exon, sowie die Auswirkung des gefundenen SNP auf die Translation untersucht. Für einige interessante SNPs und INDELs werden nun molekulare Marker für die technischen Plattformen Pyrosequenzierung und CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) etabliert und im Hochdurchsatzverfahren an weiteren 300 Sorten getestet. Dabei werden vorzugsweise Marker für solche SNPs entwickelt, die im Exon lokalisiert sind und zu einem Aminosäureaustausch führen. Durch Korrelation der erhaltenen molekulargenetischen Daten mit den sortenspezifischen Malzeigenschaften können kausale Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp gefunden werden. Erst nach Verifizierung der Sequenzierungsergebnisse durch die erhaltenen SNP-Muster der 64 Sorten mittels Pyrosequencing wird die Haplotypenassoziation durchgeführt. Dazu werden alle verfügbaren Quellen für phänotypische Daten genutzt: die von unserem Projektpartner Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising zur Verfügung gestellten Analysendaten aus der Mikromälzung von 2004 und 2005, Bundessortenamt (BSA)-Listen, Landessortenversuche (LSV) der einzelnen Bundesländer und die Braugerstenjahrbücher der deutschen Braugerstengemeinschaft e.V. (BGJB). Zur effizienten Verrechnung wurden Datenbanken mit ca. 120 relevanten Malzparametern für ca. 250 Sorten mit nunmehr 100.000 Datenpunkten, sowie mit allen in diesem Projekt erhaltenen molekularen Daten angelegt (KÜNNE et al. 2006, submitted), so dass weitere umfangreiche Assoziationsstudien durchführbar sind. Anhand einiger vorläufiger Berechnungen mit der Software TASSEL (<http://www.maizegenetics.net>) konnten signifikante Beziehungen von Haplotypen der 1,4- β -Xy-

Autoren: Dr. Inge E. MATTHIES und Dr. Marion S. RÖDER, Leibniz-Institut für Pflanzen-genetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN



lanase I und der β -Glucanase zu einigen wichtigen Malzqualitätsmerkmalen gefunden werden.

Die verwendeten Malzdaten stammen aus der Mikromälzung von Feldexperimenten unseres Projektpartners LfL in Freising. Die einzelnen Malzparameter sind in unterschiedlicher und komplexer Weise sowohl durch die genetischen Eigenschaften einer Sorte als auch durch Umwelteinflüsse und anderen Faktoren während der Vermälzung bestimmt. So wird der Rohproteingehalt zu ca. 60 % durch die Umwelt bestimmt und nur 10 % dieses Merkmals sind genetisch determiniert, dagegen sind der Eiweißlösungsgrad (ELG) und die VZ45 zu 50 % genetisch und 20 % von der Umwelt bedingt (Quelle: Landessortenversuche Sommergerste 2004, LfL Freising). Interaktionen zwischen genetischem Polymorphismen und Unterschieden in der phänotypischen Ausprägung in einem Satz von 64 Sorten werden exemplarisch an zwei Kandidatengenen näher erläutert.

(1 \rightarrow 4)- β -Xylan Endohydrolase Isoenzym I und β -Glucanase

Für die (1 \rightarrow 4)- β -Xylan Endohydrolase X-I wurden beginnend von der 5'UTR

im nachfolgenden Exon drei SNPs und ein weiterer im benachbarten Intron detektiert, wobei zwei davon zum Aminosäureaustausch führen (Tabelle 1). Einer der fünf resultierenden Haplotypen (H4_GM111) zeigte signifikante Assoziationen ($p < 0,05$) mit den Malzparametern Viskosität und Friabilimeter, welche durch viele Faktoren wie z.B. Mehlkörperstruktur, Zellwandbeschaffenheit, β -Glucangehalt, β -Glucanaseaktivität, β -Glucansolubilaseaktivität bedingt sind.

Die beiden gefundenen Haplotypen für die β -Glucanase kamen bei der Untersuchung von 64 Sorten und 8 Referenzgenotypen nahezu im gleichen Verhältnis vor und beide zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Viskosität bei $p < 0,05$. Alle drei gefundenen SNPs lagen im gleichen Exon.

Selten auftretende Haplotypen werden derzeit für diese beiden Gene wie auch für das nachfolgend beschriebene an einem größeren Datensatz verifiziert.

α -Amylase 1

Die α -Amylase 1 hydrolisiert glykosidische Bindungen in der Stärke und Maltodextrinen. Das kodierende *amy2*-Gen ist auf Chromosom 7H kartiert und be-

sitzt im analysierten Abschnitt von ca. 570 bp sechs SNPs, von denen vier im Exon und zwei im nachfolgenden Intron lokalisiert sind. Davon führen drei SNPs zu einem Aminosäureaustausch (Tabelle 2). Es wurden bereits SNPs und INDELs in einer anderen α -Amylase beschrieben (MACHOVA-POLAKOVA et al. 2005).

Markerentwicklung für weitere Kandidatengene

Das gefundene Haplotypenmuster für die Glycerinaldehydphosphodehydrogenase (GAPDH) ist auffallend durch bestimmte Pedigrees der hier untersuchten Sorten determiniert. Für dieses Kandidatengenen konnten drei CAPS-Marker entwickelt werden. Alle analysierten 12 SNPs und 2 INDELs befinden sich im Intron. Außerdem konnten für zwei weitere Gene (B3-Hordein und Flavon-3-Hydroxylase) ebenfalls erfolgreich CAPS-Assays etabliert werden. Zudem werden derzeit u.a. für die Serin-Carboxypeptidase I und III (POTOKINA et al. 2006) und Protein-Disulfidisomerase Pyrosequencing-Assays etabliert.

Zusammenfassung und Ausblick

Die hier erhaltenen Ergebnisse stellen einen wichtigen Erkenntnisgewinn zum Verständnis der Struktur und Funktion der an der Ausprägung der Malzqualität beteiligten Gene, sowie ihrer Einbindung in verschiedene Stoffwechselwege dar und geben Hinweise auf eine weitere Optimierung des Zucht- und Mälzungsprozesses. Durch zielgerichtete Nutzung der genetischen Diversität im primären Genpool der Gerste wird die Entwicklung neuer Gerstensorten mit verbesserten physiologischen Leistungen ermöglicht. Gerste als wirtschaftlich wichtige Nutzpflanze hat hier Modellcharakter für diese Fragestellung. Die entwickelten diagnostischen Marker mit Bezug zur Malzqualität sollen zukünftig den Zuchtprozess von Elitesorten beschleunigen und erleichtern.

Literatur

FOX, G.P., J.F. PANOZZO, C.D. LI, R.C.M. LANCE, P.A. INKERMAN and R.J. HENRY 2003: Molecular basis of barley quality. Australian Journal of Agricultural Research 54: 1081-1101.

Tabelle 1: Gefundene SNP- und Haplotypenmuster sowie Struktur des amplifizierten Genfragmentes der (1 \rightarrow 4)- β -Xylan Endohydrolase Isoenzym I bei den 64 Sorten und 8 Referenzgenotypen

SNP1 #	Exon 1 SNP2	SNP3 #	Intron SNP4	Haplotypen SNP1 - SNP4	Häufigkeit
A (Tyr)	C (His)	A (Leu)	T	H1_GM111	1
A (Tyr)	T (His)	G (Arg)	A	H2_GM111	20
T (Phe)	C (His)	A (Leu)	T	H3_GM111	20
A (Tyr)	C (His)	G (Arg)	T	H4_GM111*	25
A (Tyr)	C (His)	G (Arg)	A	H5_GM111	2
-	-	G (Arg)	A	n.a.	4

= SNP führt zu Aminosäureaustausch nach Translation, * sign. bei $p < 0,05$ für Visk. und Friab., n.a. = nicht auswertbar

Tabelle 2: Haplotypen des Genes *amy2* für die α -Amylase 1 detektiert in ca. 400 zwei- und mehrzeiligen Sommer- und Wintergerstensorten

SNP1 #	Exon			Intron		Haplotypen SNP1 - SNP6
	SNP2 #	SNP3	SNP4 #	SNP5	SNP6	
C (Arg)	A (Asn)	G (Gly)	G (Gly)	G	G	H1_GM125
C (Arg)	G (Ser)	G (Gly)	G (Gly)	G	G	H2_GM125
C (Arg)	G (Ser)	A (Gly)	G (Gly)	G	G	H3_GM125
G (Gly)	G (Ser)	G (Gly)	C (Ala)	A	C	H4_GM125
C (Arg)	G (Ser)	G (Gly)	C (Ala)	A	C	H5_GM125
C (Arg)	G (Ser)	G (Gly)	G (Gly)	G	C	H6_GM125
G (Gly)	A (Asn)	G (Gly)	G (Gly)	A	C	H7_GM125
G (Gly)	G (Ser)	A (Gly)	G (Gly)	A	C	H8_GM125
G (Gly)	G (Ser)	G (Gly)	C (Ala)	G	G	H9_GM125
C (Arg)	A (Asn)	G (Gly)	C (Ala)	A	G	H10_GM125

= SNP führt zu Aminosäureaustausch nach Translation

- HAYES, P.M., A. CASTRO, L. MARQUEZ-CE-DILLO, A. COREY, C. HENSON, B.L. JONES, J. KLING, D. MATHER, I. MATUS, C. ROSSI and K. SATO, 2003: Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In: R von Bothmer, Th van Hintum, H Knüpfner, Sato K (eds), Diversity in barley (*Hordeum vulgare*), 201-226. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- KÜNNE, C., I. GROSSE, I. MATTHIES, T. SRETENOVIC-RAJICIC, U. SCHOLZ, A. STEPHANIK and S. WEISE, 2006: Using data warehouse technologies in crop plant bioinformatics *submitted to*: J Integrative Bioinformatics.
- MACHOVA-POLAKOVA, K., L. KUCERA, D.A. LAURIE, K. VACULOVA and J. OVESNA, 2005: Coding region single nucleotide polymorphism in the barley low-pI, α -amylase gene *Amy32b*. *Theor Appl Genet* 110: 1499-1504.
- MALYSHEVA-OTTO, L. and M.S. RÖDER, 2006: Haplotype diversity in the endosperm specific β -amylase gene *Bmy1* of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Breed* 18: 143-156.
- POTOKINA, E., M. CASPERS, M. PRASAD, R. KOTA, H. ZHANG, N. SREENIVASULU, M. WANG and A. GRANER, 2004: Functional association between malting quality trait components and cDNA array based expression patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Breed* 14: 153-170.
- POTOKINA, E., M. PRASAD, L. MALYSHEVA, M.S. RÖDER and A. GRANER, 2006: Expression genetics and haplotype analysis reveal *cis* regulation of serine carboxypeptidase I (*Cxp1*) a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct & Integr Genomics* 6: 25-35.
- SWANSTON, J.S. and R.P. ELLIS, 2002: Genetics and Breeding of Malt Quality Attributes. In: Barley Science - Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality. Ed.: Slafer GA, Molina-Cano JL, Araus JL, Romagosa I. Food Products press, New York, London, Oxford. 85-114.