

Entwicklung und Validierung des CAPS-Markers *HvHSC70/PstI* aus einem *hsp70* homologen differenziellen cDNA-AFLP-Fragment der Braugerste

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

Die Malzqualität von Gerste resultiert aus einem balancierten Zusammenwirken einer Vielzahl von Qualitätskomponenten, die meist quantitativ vererbt werden und einer hohen Umweltabhängigkeit unterliegen. Für die Braugerstenzüchtung kommt erschwerend hinzu, dass erst in sehr späten Generationen (F_6) in der Kleinvermälzung eine phänotypische Selektion auf dieses komplexe Merkmal möglich ist. Die Anwendung molekularer Marker stellt hingegen eine Frühselektion des Zuchtmaterials in Aussicht. Mehr noch, auf Expressionsebene abgeleitete funktionelle Marker, die innerhalb codierender Genombereiche lokalisiert sind, erbringen über physiologische Marker-Merkmal-Assoziationen weitere wertvolle Informationen für das Züchtungsprogramm.

Eine Möglichkeit, ausgehend von der Genexpression Marker zu entwickeln, bietet die cDNA-AFLP-Technik, eine Methode zu Erstellung und Vergleich von Transkriptionsprofilen von hinsichtlich eines bestimmten Merkmals induziertem Untersuchungsmaterial (BACHEM et al., 1996). Dadurch können differenzielle cDNA-Fragmente, sog. differenzielle TDFs (*transcript derived fragments*), detektiert und dem Merkmal zugeordnet werden. Die im Rahmen des Verbundprojektes GABI-Malt an der LfL in Freising-Weihenstephan durchgeführten Arbeiten zielen darauf ab, unter Verwendung dieser Technik von keimenden Gerstenkörnern zu definierten Zeitpunkten der Kleinvermälzung vergleichende Transkriptionsprofile zu generieren und anhand der differenziellen TDFs auf Expressionsebene Kandidatengene für die Malzqualität von Gerste zu

identifizieren, um diagnostische, funktionelle Marker für die Anwendung in der Züchtung abzuleiten (MIKOLAJEWSKI et al., 2002).

Eines der prominentesten qualitativ differenziellen TDFs, das bei Verwendung des Enzymsystems *PstI/MseI* für die Generierung der cDNA-AFLPs signifikant war und sowohl elf ausgewählte Brau- und Futtergerstensorten als auch DH-Linien einer Kartierungspopulation für Malzqualität, der Kreuzung ‚Alexis‘ x ‚Steina‘ (HARTL et al., 2000), spaltete, wurde als ein dem Hitzeschockprotein *hsp70* homologes cDNA-Fragment identifiziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz indiziert desweiteren ein zytosolisches HSC-Protein (*heat shock cognate*). Aufgrund essentieller Funktionen von Hitzeschockproteinen als molekulare Chaperone, die neben der Proteinbiogenese bei der Reaktion auf Stress insbesondere bei der Samenkeimung (SUNG et al., 2001), und damit auch der Vermälzung von Gerste, von Bedeutung sind, war jedoch nicht zu erwarten, dass ein strikter +/- Polymorphismus auf ebensolchen Expressionsunterschieden beruhen kann. Detaillierte RT- und Real-Time PCR-Analysen bestätigten diese Annahme: *HvHSC70* wurde bei allen untersuchten Gerstensorten zu allen Zeitpunkten konstitutiv exprimiert. Neben Expressionsunterschieden als Ursache für einen Polymorphismus besteht jedoch in der cDNA-AFLP-Prozedur begründet auch die Möglichkeit, Polymorphismen, die auf Sequenzunterschieden innerhalb der Restriktionsschnitt- und/oder Primerbindungsstellen beruhen, zu detektieren, sobald der genetische Hintergrund der verglichenen Tran-

skriptome nicht vollkommen identisch ist.

Zur Aufklärung des polymorphen Charakters des TDF *HvHSC70* wurde das cDNA-AFLP-Fragment mit Hilfe einer modifizierten RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) über die flankierenden Restriktionsschnittstellen hinaus verlängert. Die Sequenzanalyse der RACE-Klone verschiedener Gerstensorten ergab, dass der festgestellte Polymorphismus auf einem SNP (*single nucleotide polymorphism*) innerhalb der *PstI*-Schnittstelle beruht durch den ein Codon für die Aminosäure Alanin von einer stillen Mutation betroffen ist.

Für die praktische Anwendung in der Pflanzenzüchtung wurde auf der Basis dieses SNPs der CAPS-Marker *HvHSC70/PstI* entwickelt und dessen Eignung als Selektionsmarker auf Transkriptom-Ebene von Gerstensorten und Individuen der DH-Population validiert. Im folgenden gelang anhand von multiplen Alignments verschiedener cDNA- und genomischer *HSC70*-Klone die Etablierung des CAPS-Markers auf genomischer Ebene, womit dieser zur Differenzierung von Gerstensorten herangezogen werden kann. Dies wurde an bisher 277 Gerstenherkünften überprüft. Werden Sorten mit diesem Marker selektiert, zeigt sich eine deutliche Korrelation zu den Malzqualitätsparametern VZ45°C, Brabender und Friabilimeter sowie zum Malzqualitätsindex, in welchen o.g. Parameter einfließen. Es wird eine Verbesserung der Parameter um bis zu 7% gegenüber dem Mittel über alle Sorten erreicht. Am Beispiel des *HvHSC70*-Gens erweist sich die cDNA-AFLP-Technik als geeignetes Werkzeug

Autoren: Dr. Sabine MIKOLAJEWSKI, Dipl.agr.biol. Kerstin KRUMNACKER, Dr. Markus HERZ und Dr. Günther SCHWEIZER, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING-WEIHENSTEPHAN; Dipl.-Ing.agr. Anja HANEMANN, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN



zur Entwicklung funktioneller Marker innerhalb codierender Genombereiche und zur Übertragung dieser von der Expressions- auf die genomische Ebene.

Literatur

- 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.
- 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.
- 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.
- SUNG, D.Y., F. KAPLAN and C.L. GUY, 2001: Plant *Hsp70* molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* 113: 443-451.