

Abschlussbericht Teilprojekt 5

# Hitze- und Trockentoleranz in Gerste

## Projektverbund BayKlimaFit

Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den  
Klimawandel

### Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Rosenkavalierplatz 2  
81925 München

### Projektnehmer

FAU Erlangen-Nürnberg  
Lehrstuhl für Biochemie  
Prof. Dr. Uwe Sonnewald  
Staudtstrasse 5  
91058 Erlangen

Tel.: 09131/ 85-28256

Fax: 09131/ 85-28254

E-Mail: [uwe.sonnewald@fau.de](mailto:uwe.sonnewald@fau.de)

Web: <https://www.biochemie.nat.uni-erlangen.de>

### Berichtszeitraum:

1. Februar 2016 bis 31. Januar 2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Kurzzusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>2 Einführung.....</b>	<b>5</b>
<b>3 Zielsetzung.....</b>	<b>8</b>
3.1 Arbeitspaket 1: Annotation von Zielgenen und deren Verankerung im Gerstengenom.....	8
3.2 Arbeitspaket 2: Korrelation der Ertragsleistung mit Stoffwechseleigenschaften unter Einzelstress- und kombinierten Stressbedingungen.....	8
3.2.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt und im Korn.....	9
3.2.2 Stärke Biosynthese im Korn.....	11
3.2.3 Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner).....	14
3.2.4 RNAseq.....	14
3.3 Arbeitspaket 3: Identifizierung von Allelen, die erhöhte Ertragsstabilität unter Stress vermitteln.....	14
3.4 Arbeitspaket 4: Ableitung und Validierung von molekularen Markern für die Gerstenzüchtung.....	15
3.5 Ursprünglicher Zeitplan und Meilensteinplanung.....	16
3.6 Meilensteine.....	16
<b>4 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>17</b>
4.1 Arbeitspaket 1: Annotation von Zielgenen und deren Verankerung im Gerstengenom.....	17
4.2 Arbeitspaket 2: Korrelation der Ertragsleistung mit Stoffwechsel-Eigenschaften in Einzelstress- und kombinierten Stressbedingungen.....	19
4.2.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt.....	20
4.2.2 Die Tocopherol-Biosynthese im Korn.....	24
4.2.3 Die Stärkebiosynthese im Korn.....	26
4.2.4 Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner).....	27
4.2.5 RNAseq.....	27
4.3 Arbeitspaket 3: Identifizierung von Allelen, die erhöhte Ertragsstabilität unter Stress vermitteln.....	41
4.3.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt.....	41
4.3.2 Die Tocopherol-Biosynthese im Korn.....	44
4.3.3 Die Stärkebiosynthese im Korn.....	45

4.3.4	Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner) .....	46
4.3.5	RNASeq.....	46
4.4	Arbeitspaket 4: Ableitung und Validierung von molekularen Markern für die Gerstenzüchtung.....	49
4.4.1	Ableitung molekularer Marker.....	49
4.4.2	Validierung molekularer Marker.....	50
<b>5</b>	<b>Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Vernetzungen .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Bestehende und entstandene Industriebeteiligungen.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>55</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>62</b>

## 1 Kurzzusammenfassung

Der Klimawandel wird eine Vielzahl gesellschaftlicher Auswirkungen haben. Nicht nur Menschen und Tiere, sondern auch Pflanzen werden die Folgen des Klimawandels zu spüren bekommen. Steigende Temperaturen und sinkende Niederschläge stellen dabei vor allem die Landwirtschaft vor neue Herausforderungen. Unsere bayerischen Nutzpflanzen sollen auch in Zukunft trotz widrigerer Umstände genug Ertrag liefern. Strategien zur Züchtung neuer stresstoleranter Gerstensorten standen im Fokus dieses Projekts.

Biochemische und molekularbiologische Analysen wurden genutzt, um Stoffwechsellanpassungen der Pflanzen zu verstehen, die zu einer gesteigerten Stresstoleranz führen können. Anschließend wurden für diese Faktoren Unterschiede im Erbgut unterschiedlich empfindlicher Gerstensorten identifiziert, um diese für die Züchtung neuer, stresstoleranter Sorten nutzen zu können. Im Projektverlauf wurden genetische Faktoren gefunden, die den Vitamin E-Gehalt in Gerstensorten kontrollieren. Für diesen konnten wiederum positive Effekte auf physiologische Eigenschaften der Pflanzen nachgewiesen werden. Um auch über den Projektzeitraum hinaus ein tieferes Verständnis über die transkriptionellen Regulationsnetzwerke zu erhalten, die in Gerstenpflanzen Ertragsstabilität vermitteln, wurden durch *next generation sequencing* (NGS)-Methoden vollständige Transkriptome sequenziert und analysiert. Das gesammelte Wissen wird helfen züchterische Bemühungen zu beschleunigen, um die bayerische Gerste fit für den Klimawandel zu machen.

## 2 Einführung

Der Klimawandel ist längst in Bayern angekommen – er ist spür- und messbar. Die Durchschnittstemperatur ist hierzulande zwischen 1931 und 2010 um rund 1,1°C gestiegen. Im sensiblen Alpenraum sind die Temperaturen in den letzten 100 Jahren sogar doppelt so stark gestiegen wie im weltweiten Durchschnitt. Bayern bleibt von den unvermeidbaren Veränderungen des Klimawandels nicht verschont. Wir erwarten zukünftig mehr Extremwetterereignisse, nassere Winter und trockenere und heißere Sommer. Die Vorhersagen prognostizieren im Zeitraum von 2021 bis 2050 einen Anstieg der durchschnittlichen Temperaturen von 0,5°C bis 1,5°C und für den Zeitraum von 2071 bis 2100 von 1,5°C bis 3,5°C. Die Folgen dieser Entwicklungen zeigen sich auch in den Kommunen in Bayern und wirken sich auf das Leben der Menschen aus. Zur Abmilderung der Folgen des Klimawandels hat Bayern eine Klimaschutzstrategie beschlossen. Hierbei stehen u.a. der Schutz biologischer Ressourcen und des Bodens, sowie die Anpassung klimasensitiver Bereiche in Bayern im Vordergrund. Ein klimasensitiver Bereich ist die Landwirtschaft. Trockenheit und Hitze stellen für Nutzpflanzen eine große Herausforderung dar. Die Anwendung klassischer Kompensationsstrategien wie künstliche Bewässerung ist jedoch nur teilweise möglich und oft ressourcenintensiv. Um auch in Zukunft möglichst ressourcenschonend Landwirtschaft in Bayern betreiben zu können, ist es wichtig, die bayerischen Nutzpflanzen fit für den Klimawandel zu machen.

Die züchterische Selektion von neuen Sorten, die sowohl Trockenheit als auch Hitzeperioden standhalten können, ist jedoch langwierig und diffizil. Dies liegt auch an der Schwierigkeit, zukünftige Klimaszenarien unter Feldbedingungen reproduzierbar zu simulieren und diese über mehrere Jahre aufrecht zu erhalten, um valide Aussagen über die Robustheit neuer Sorten zu tätigen. Forschungsarbeiten zur Stresstoleranz bei Kulturpflanzen werden weltweit durchgeführt. Hierbei dominiert meist eine klare Trennung zwischen Anwendung (Beobachtungen im Feld, soweit möglich) und der Grundlagenforschung (Experimente im Labor, oft mit wenig landwirtschaftlicher Relevanz oder anhand von Modellpflanzen). Eine enge Verzahnung von Züchtungs- und Laborforschung findet selten statt. Ferner sind die Untersuchungen meist auf Einzelstressfaktoren begrenzt, wodurch eine Vorhersage der Reaktion auf kombinatorischen Stress nahezu unmöglich ist [1]. Verlässliche wissenschaftliche Daten zur Reaktion von Nutzpflanzen auf Hitze- und/oder Dürreperioden liegen deshalb nur sehr vereinzelt vor.

Um Stressperioden zu überstehen, können Pflanzen drei unterschiedliche Strategien verfolgen: Flucht (*escape*), Vermeidung (*avoidance*) oder Toleranz (*tolerance*). Fluchtstrategien zielen darauf ab, die reproduktive Phase vor dem Einsetzen der Stressbedingung abzuschließen. Dies geht mit einem Ertragsverlust einher und ist agronomisch nicht vielversprechend. Vermeidungsstrategien versuchen für Hitze- und Trockentoleranz Wasserverluste durch Regulation der Schließzellen zu minimieren oder die Wasseraufnahme durch ein verbessertes Wurzelsystem zu optimieren. Toleranzmechanismen beruhen häufig auf Abscisinsäure (ABA)-vermittelten Signalwegen [2], [3] und sind durch die Akkumulation kompatibler Osmolyte und den Aufbau effizienter Schutzsysteme zur Vermeidung reaktiver Sauerstoffspezies gekennzeichnet (zusammengefasst in [4] und [5]). Zumeist ergibt sich eine verbesserte Stresstoleranz erst durch die Kombination unterschiedlicher morphologischer Ei-

genschaften und stressinduzierter zellulärer Reaktionen. Der Beitrag einzelner Mechanismen auf die multifaktoriell-beeinflusste Stresstoleranz ist deshalb oft nur schwer zu entschlüsseln.

Vorrangiges Ziel des Projekts „Hitze- und Trockentoleranz in Gerste“ war die Identifizierung solcher relevanter zellulärer Mechanismen, die eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit von Gerstenpflanzen unter den zu erwartenden Klimaverhältnissen ermöglichen. Hauptaugenmerk lag dabei auf Toleranzmechanismen. Die Züchtung von modernen Hochleistungssorten, die einen ressourcenschonenden Anbau von Gerste trotz Klimawandel ermöglichen, war dabei das übergeordnete Ziel. Durch gezielte Kombinationen aus biochemischen, molekularen und genomischen Untersuchungen sollten zelluläre Prozesse und molekulare Marker abgeleitet werden, die später eine gezielte züchterische Verbesserung der Gerstenpflanzen erlauben. Im Einzelnen sollten (i) zelluläre Prozesse, die mit Hitze- und Trockentoleranz korrelieren, aufgeklärt, (ii) die zugrundeliegenden Gene identifiziert, (iii) die Expression der Gene unter Stressbedingungen untersucht, (iv) die allelische Variation der Zielgene in ausgewählten Genotypen erfasst und (v) abgeleitete genomische Marker unter Feldbedingungen an unabhängigen Genotypen validiert werden. Die daraufhin abgeleiteten Marker sollen zur Züchtung neuer Gerstensorten beitragen.

Einige Forschungsprojekte haben sich dabei in den letzten Jahren bereits damit befasst, die für die Trockenstress-Toleranz verantwortlichen Gene z.B. aus trockenstressadaptierten Landrassen und Wildformen der Gerste über assoziationsgenetische Untersuchungen zu identifizieren um diese für die Züchtung neuer Sorten zugänglich zu machen ([6], [7], [8], [9], [10]). Parallel wurden auch bereits gezielte Studien durchgeführt, bei denen konkrete zelluläre Prozesse untersucht wurden, bei denen vermutet wurde, dass sie Einfluss auf die Stresstoleranz haben. So konnte gezeigt werden, dass die Stärkebiosynthese im Korn durch trockenstressassoziierte Signale wie ABA stimuliert wird [11]. Die dadurch erzielte schnellere Reifung der Körner kann dann die Reproduktion der Pflanzen unter Trockenstress sicherstellen. Andererseits ist auch bekannt, dass die Stärkesynthese im Getreidekorn hitzesensitiv ist. Dies liegt zum einen an der Hitzelabilität einiger Stärkebiosynthesegene, z.B. der ADP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase). So korreliert die Hitzelabilität von Allelen der AGPase mit Ertragsverlusten bei Mais [12]. Zum anderen werden bei Trockenstress Gene der Stärkebiosynthese transkriptionell herunterreguliert während sich die Expression stärke-degradierender Enzyme erhöht [13].

Das im Rahmen des Plant 2030-Programms des BMBF geförderte Projekt CLIMATE CHANGE zielte bereits darauf ab, in einem assoziationsgenetischen Ansatz metabolische Adaptionsmechanismen speziell von Gerste in kombinierten Trocken- und Hitzestressbedingungen zu identifizieren. Dafür wurden zunächst Klimamodelle erstellt, auf deren Basis realistische Stressszenarien für die Klimakammeranzucht von 89 genetisch diversen Gerstenlinien unter Trocken- bzw. kombiniertem Trocken- und Hitzestress definiert wurden. Dabei wurden sowohl 47 trockenstressadaptierte Landrassen, davon 20 aus dem Mittelmeerraum, als auch 42 aktuelle Zuchtlinien – ein Großteil davon aus dem Zuchtprogramm der Saatzeit Josef Breun GmbH & Co. KG, Herzogenaurach – angezogen. Fünf Tage nach Einsetzen des Trockenstresses bzw. des kombinierten Hitze- und Trockenstresses wurden Fahnenblattproben genommen, von denen Metabolitprofile am LS Biochemie der FAU analysiert wurden. Dabei wurden insgesamt 59 Metabolite des Primärstoffwechsels wie Zucker, Aminosäuren und Carbonsäuren, sowie Antioxidantien quantifiziert. Parallel wurden agronomische und

physiologische Eigenschaften wie Kornertrag, Blattwassergehalt, Photosynthese-Kapazität und Tausendkorngewicht bonitiert und die untersuchten Linien mithilfe des Illumina iSELECT 9K SNP-Array von den beteiligten Gerstenzucht-Unternehmen genotypisiert [9]. Diese Untersuchungen erlaubten (i) stressbedingte Stoffwechsellanpassungen der Gerstensorten als potentielle Grundlage von Toleranzmechanismen zu identifizieren, (ii) diese Stoffwechsellanpassungen mit Ertragsparametern zu korrelieren und (iii) dafür verantwortliche Bereiche im Genom der Gerste einzugrenzen. Die Vorarbeiten aus dem CLIMATE CHANGE-Projekt stellen eine wichtige Grundlage für das hier protokollierte Projekt dar und ermöglichten es bereits, einige zelluläre Prozesse zu identifizieren, die potentiell relevant für die Ertragsstabilität der Pflanzen unter Stressbedingungen sind.

Darüber hinaus sollten stetig weitere potentielle Zielprozesse identifiziert werden. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Betrachtung von physiologischen Eigenschaften von Pflanzen, die unter Feldbedingungen und nicht in Klimakammern wuchsen. Im Rahmen des Projektverbunds BayKlimaFit bestand hier die Möglichkeit Gerstensorten zu analysieren, die von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising im Rahmen des Teilprojekts 6 „Validierung praxisrelevanter Marker für die Züchtung klimaangepasster und gesunder Gerstensorten“ unter Leitung von Herrn Dr. Markus Herz angebaut wurden. Dem TP05 standen selbst keine eigenen Versuchsflächen für eine Freilandanzucht zur Verfügung. Die Anzucht fand in einem Rollgewächshaus (ROS) an der LfL statt, mit dessen Hilfe Trockenstress unter Feldbedingungen simuliert wurde.

Die Identifizierung neuer Zielprozesse profitierte auch vom stetigen technischen Fortschritt im Bereich der metabolischen, genomischen und transkriptomischen Analysen. So erlauben modernste Chromatographie und massenspektrometrische Methoden die Identifizierung einer Vielzahl relevanter Metabolite einer Zelle. Neue Sequenziertechniken ermöglichen darüber hinaus die vollständige Entschlüsselung umfangreicher Genome oder Transkriptome. Die Kombination aus biochemischem Wissen und Daten der modernen Genomik erlaubt erstmals die Verankerung metabolischer Prozesse im Genom. In Verbindung mit globalen Transkriptomanalysen können darüber hinaus quantitative Effekte der im Genom verankerten Prozesse studiert werden.

### **3 Zielsetzung**

#### **3.1 Arbeitspaket 1: Annotation von Zielgenen und deren Verankerung im Gerstengenom**

Letztendliches Ziel des Projekts war die Entwicklung genetischer Marker. Diese sollen in markerbasierten Zuchtansätzen verwendet werden können, um neue moderne Gerstensorten zu entwickeln, die besser den klimawandelgeschuldeten Stressbedingungen standhalten können. Fundamentale Voraussetzung für die Entwicklung solcher Marker ist die Aufklärung der genetischen Determinanten, die die Stresstoleranz vermitteln. Deshalb sollten in Arbeitspaket 1 Gene im Gerstengenom annotiert und verankert werden, die an den in Vorarbeiten und Arbeitspaket 2 identifizierten Zielprozessen beteiligt sind. Als Grundlage sollten dafür bereits charakterisierte Gene aus anderen Organismen dienen, die über Sequenzhomologien im Gerstengenomen verankert und somit annotiert werden. Dies sollte sicherstellen, dass über die bereits automatisch annotierten Gene hinaus, die Gene definierter Zielprozesse möglichst genau und vollständig betrachtet werden können. Die Aufklärung der Genstruktur jedes Zielgenes war außerdem Voraussetzung für die Identifizierung von Allelen in Arbeitspaket 3.

Die durch die Vorarbeiten im CLIMATE CHANGE Projekt definierten Zielprozesse waren:

1. Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt und im Korn
2. Die Stärkebiosynthese im Korn
3. Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner)

#### **3.2 Arbeitspaket 2: Korrelation der Ertragsleistung mit Stoffwechseleigenschaften unter Einzelstress- und kombinierten Stressbedingungen**

Zu Projektbeginn wurde eine Kollektion von Sommergerstensorten zusammengestellt. In diese Kollektion wurden neben aktuellem Zuchtmaterial der drei assoziierten Saatzuchtunternehmen (siehe Abschnitt 7) solche Genotypen aufgenommen, die (i) in den an der LfL durchgeführten Vorarbeiten eine Korrelation zwischen der Expression von Zielgenen mit agronomisch relevanten Parametern gezeigt hatten (siehe hierzu auch Abschlussbericht des TP06) und die (ii) sich im Rahmen von CLIMATE CHANGE in agronomischen Parametern wie Kornertrag oder Tausendkorngewicht und in Fahnenblattgehalten von Tocopherolen, Zucker, Stärke und Aminosäuren unterschieden hatten. Dazu gingen zur Abgrenzung des Zuchtmaterials auch einige wenige Landrassen mit den gewünschten Eigenschaften in die Kollektion ein.

Die ausgesuchten Genotypen sollten in unterschiedlichen Umwelten (Klimakammern, ROS) angezogen und zu definierten Zeitpunkten unterschiedlichen Kombinationen von Hitze- und

Trockenstress ausgesetzt werden. Morphologische Parameter (Ertrag, Tausendkorngewicht, Strohbiomasse, Körner pro Ähre), biochemische Daten aus Fahnenblättern und Körnern (Stärke, Zucker, Aminosäuren, Antioxidantien, Enzymaktivitäten) sowie physiologische Parameter (relativer Blattwassergehalt, Photosystem II-Intaktheit) sollten miteinander korreliert werden, um die biochemischen Größen zu bestimmen, die mit Kornertrag bzw. Kornqualität korrelieren.

Um die Robustheit gefundener Assoziationen zu bestimmen und weitere Assoziationen aufdecken zu können, sollten möglichst viele verschiedene Umwelten und Stressbedingungen getestet werden. Durch die Kooperation mit dem TP06 der LfL konnten Pflanzen beprobt werden, die viel näher unter wirtschaftlich relevanten Bedingungen (Feldbedingungen) wuchsen. Die Analyse der Feldversuche im ROS spielten daher eine zentrale Rolle bei den Analysen des TP05. Da im ROS jedoch nur die Wasserverfügbarkeit, nicht aber die Umgebungstemperatur kontrolliert werden kann, sollten in Klimakammerversuchen die zuvor gewonnen Erkenntnisse noch erweitert und ergänzt werden. Unter den in Tabelle 1 gelisteten Bedingungen sollten die relevanten kombinierten Stressversuche durchgeführt werden. Mittels Bodensonden konnte bereits im CLIMATE CHANGE Vorprojekt gezeigt werden, dass die Bodenwassersättigung (=Feldkapazität) sehr gut mit dem Topfgewicht korreliert. Somit konnten über das gravimetrische Einstellen des Topfgewichts durch kontrolliertes Gießen sehr leicht verschiedene Feldkapazitäten eingestellt werden, um die Versuchspflanzen Trockenstress auszusetzen.

**Tabelle 1:** Referenzbedingungen für die Anzucht von Gerstenpflanzen in Klimakammern.

<b>Stressszenario</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Feldkapazität</b>
Kontrolle	20°C Tag / 16°C Nacht	100%
Trockenstress	20°C Tag / 16°C Nacht	20%
Hitze- und Trockenstress	26°C Tag / 22°C Nacht	20%

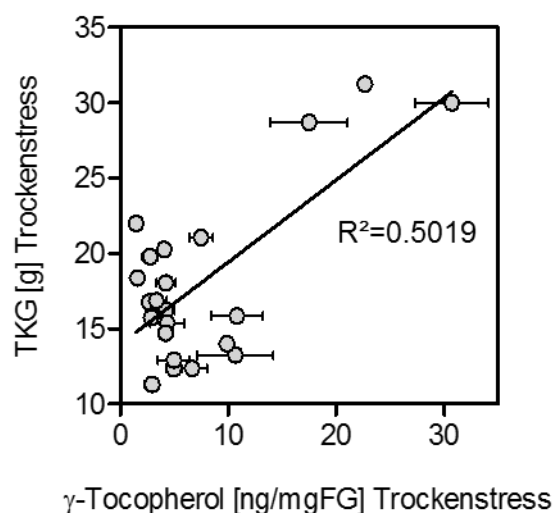
### 3.2.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt und im Korn

Die Tocopherol-Biosynthese wurde zu Projektbeginn als der Zielprozess festgelegt, der primär untersucht werden sollte. Von den vier natürlich vorkommenden Tocopherolspezies, die zusammen mit den vier natürlich vorkommenden Tocotrienolspezies zur Metabolitgruppe der Vitamin E-Komponenten gezählt werden, stellen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol die wirtschaftlich relevantesten Isoformen dar. Im menschlichen Körper weist  $\alpha$ -Tocopherol mit Abstand die höchste Vitamin E Aktivität auf [14].  $\gamma$ -Tocopherol ist das Edukt für die Biosynthese von  $\alpha$ -Tocopherol und je nach Pflanzengewebe ist das Verhältnis beider Isoformen auf Grund mangelnder Enzymaktivität hin zum für die menschliche Nahrung weniger relevanten  $\gamma$ -Tocopherol verschoben. Die finalen Schritte der Tocopherol-, aber auch Tocotrienol-Biosynthese werden in der inneren Membran der Plastiden katalysiert [15].

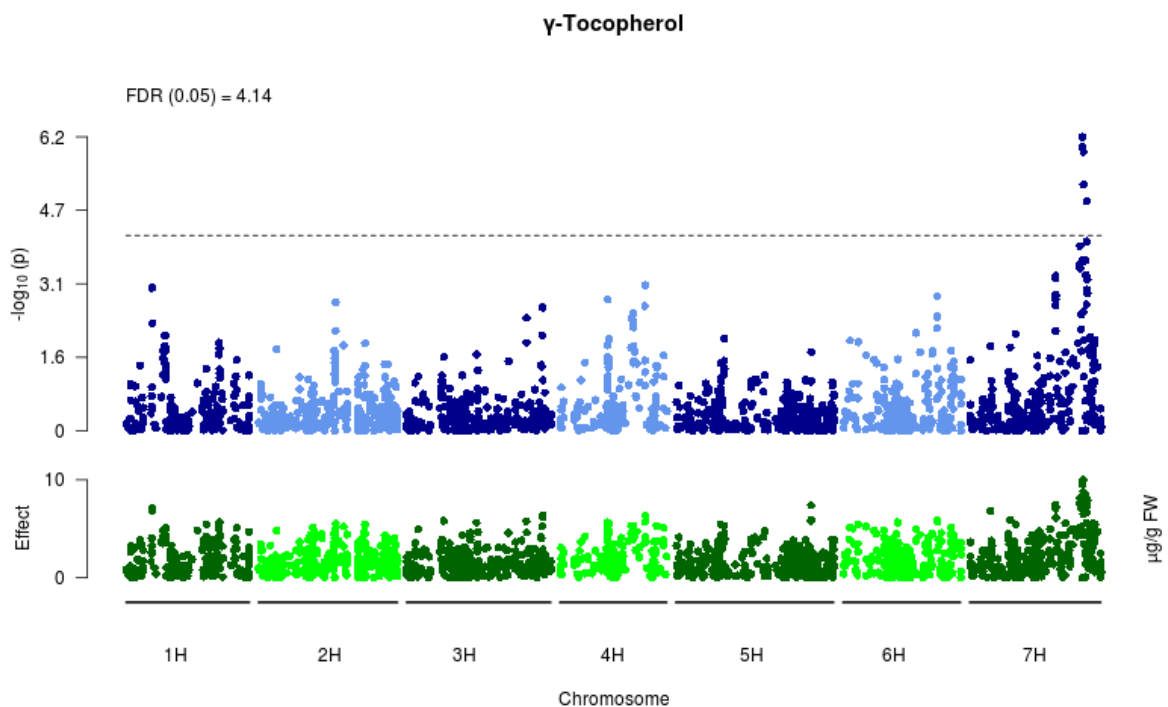
Molekular sind alle Vitamin E-Isoformen am Schutz der Biomembranen vor oxidativen Schäden beteiligt. Freie Radikale, die in Zellen vor allem unter Stressbedingungen akkumulieren,

können Lipidperoxidation auslösen. Diese radikalische Kettenreaktion kann Membranlipide im großen Maßstab schädigen. Tocochromanole (Sammelbegriff aller Vitamin E-Formen) können die Lipidperoxidation stoppen, indem sie den Fettsäure-Peroxidradikalen Protonen zur Verfügung stellen und dadurch selbst zu Radikalen werden. Über die wasserlöslichen Antioxidationssysteme der Zelle können die Tocochromanolradikale wieder recycelt werden. Sie stellen somit eine Brücke zwischen oxidativen Schäden im fettlöslichen Milieu der Biomembranen und den wasserlöslichen Antioxidationssystemen der Zelle dar. Die genauen molekularen Mechanismen sind beispielsweise in [16] zusammengefasst. In Anlehnung an die molekularen Charakteristika wurde für das TP05 postuliert, dass Pflanzen mit einem erhöhten Blatt-Tocopherolgehalt potentiell besser oxidativen Schäden unter abiotischen Stressbedingungen entgegenwirken können.

Im CLIMATE CHANGE Vorprojekt wurde bereits eine positive Korrelation zwischen dem  $\gamma$ -Tocopherolgehalt von Fahnenblättern mit dem Tausendkorngewicht (TKG) von deutschen Zuchtlinien gefunden (Abbildung 1). Sorten, die unter Trockenstress einen erhöhten Metabolitgehalt zeigten, wiesen demnach höhere Werte für einen wichtigen Ertragsparameter auf. Dies kann als Hinweis für eine gesteigerte Fitness der Pflanzen interpretiert werden. Die nachfolgende assoziationsgenetische Analyse der Metabolit- und Genotypisierungsdaten konnte einen potentiellen mQTL (*metabolomic Quantitative Trait Locus*) für  $\gamma$ -Tocopherol auf dem Gerstenchromosom 7H zwischen 120,8 und 125,3 cM aufdecken (Abbildung 2) [9]. Wie in Arbeitspaket 1 erneut validiert wurde (Abschnitt 4.1), ist in dieser Region eine Homogentisat-Phytyl-Transferase (HPT) codiert, ein entscheidendes Enzym der Tocopherol-Biosynthese. Es liegt also nahe, allelische Varianten des HPT-Gens als Ursache für die unterschiedliche Größe und Zusammensetzung des Tocopherol-Pools in Gerstensorten zu vermuten.



**Abbildung 1:** Korrelation zwischen dem  $\gamma$ -Tocopherolgehalt in Fahnenblättern von trockengestressten Gerstensorten und dem Tausendkorngewicht (TKG) nach Reife derselben Pflanzen. Jeder Datenpunkt stellt eine beprobte Gerstensorte dar.

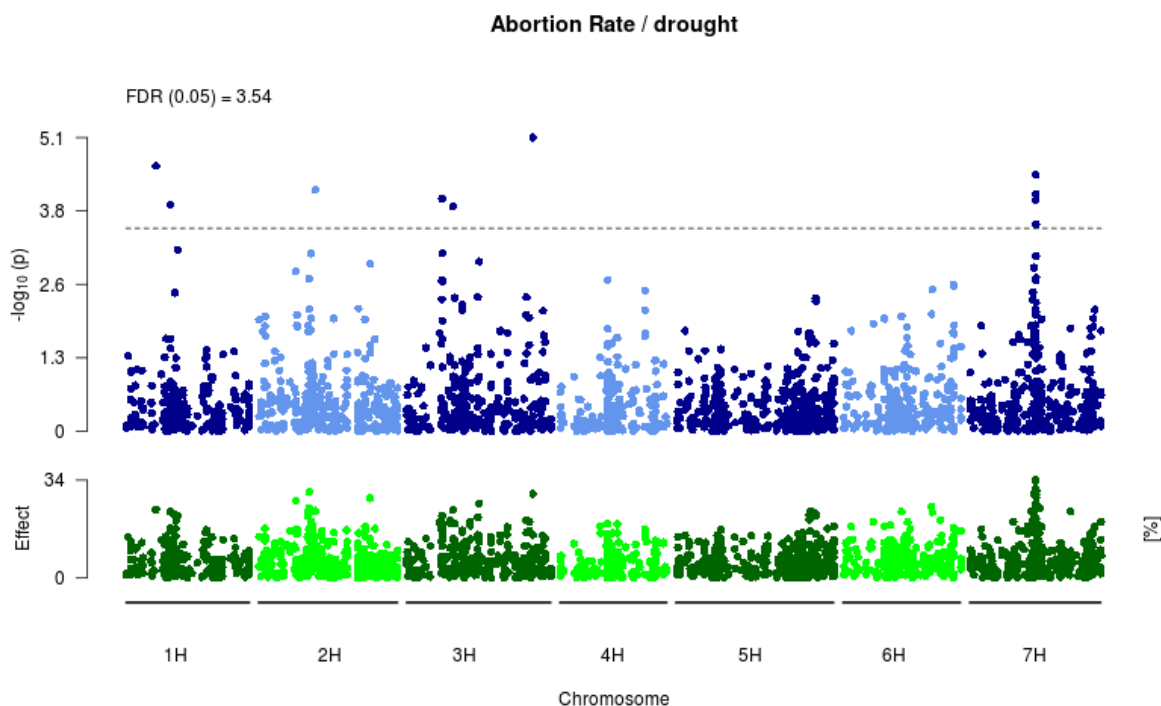


**Abbildung 2:** Manhattan-Plot zur assoziationsgenetischen Analyse zwischen SNP-Marker-Allelen (blau) und  $\gamma$ -Tocopherolgehalten (grün). Die negativ dekadischen Logarithmen der Irrtumswahrscheinlichkeiten für Assoziationen (blau) der  $\gamma$ -Tocopherolgehalte in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht (FW) (grün) mit den SNP-Allelen sind als Punktepaare entlang der Position der SNP-Marker im Gerstengenom aufgetragen, wobei die einzelnen Chromosomen durch horizontale Striche gekennzeichnet und farblich abgesetzt sind. Die Signifikanzschwelle mit einer *false discovery rate* (FDR) von 5% ist als gestrichelte Linie dargestellt.

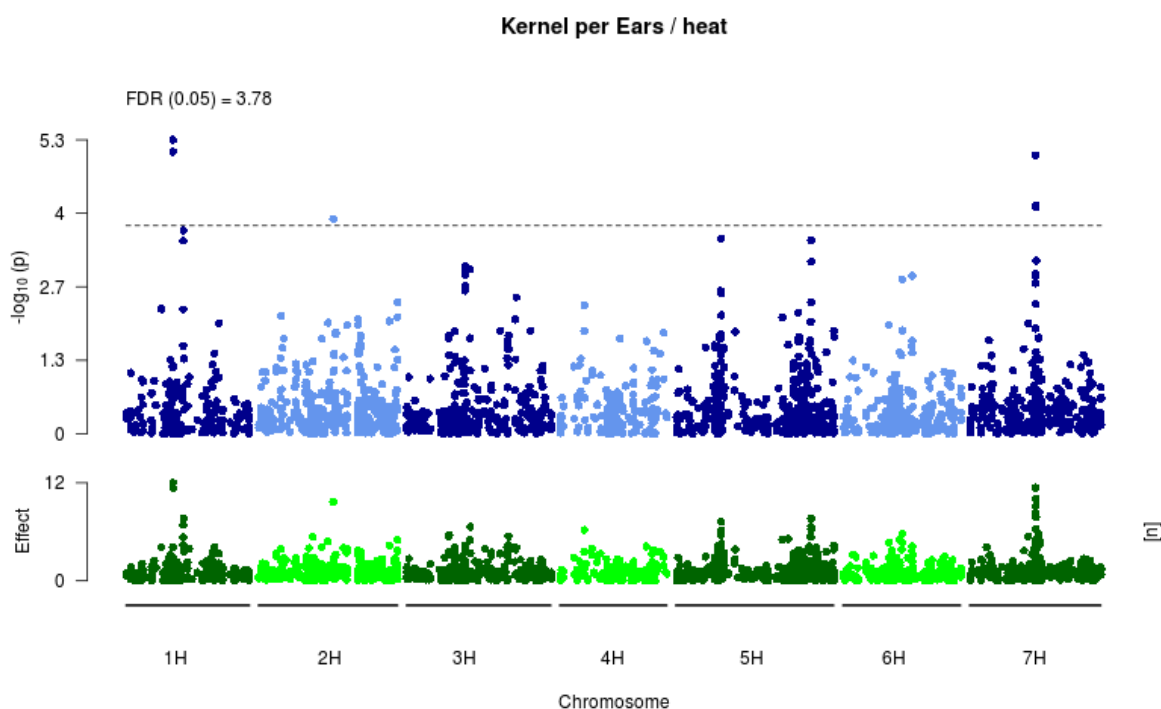
### 3.2.2 Stärke Biosynthese im Korn

Die Stärke-Biosynthese im Korn spielt für den Ertrag eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass das Korngewicht sehr stark mit dem Gehalt an Stärke im Korn korreliert [7]. Wie in Abschnitt 2 bereits dargestellt steht die Stärke-Biosynthese im Korn oft stressbedingt unter transkriptioneller Regulation. Eine Senkung der Biosyntheserate kann dabei aus zweierlei Hinsicht negative Auswirkungen auf den Kornertrag haben. Primär ist bei niedriger Biosyntheserate jedes Korn stärkeärmer und leistet weniger Beitrag zum Ertrag. Sekundär können einzelne Körner bei einer schlechten Versorgung mit Assimilaten komplett das Wachstum einstellen. Um die übrigen Körner mit ausreichend Energie zu versorgen, werden Körner, die in einer initialen Phase des individuellen Wachstums nicht schnell genug wachsen, komplett vom Wachstum ausgeschlossen (man spricht von *Abortion*). Somit sinkt zusätzlich die Anzahl der Körner pro Ähre. Die Energieversorgung der Körner hängt dabei von zwei prominenten Faktoren ab, der *Source*- und der *Sink*-Stärke. Die *Source*-Stärke ist

die Fähigkeit der pflanzlichen Organe, die Assimilate im Überschuss besitzen und netto exportieren können (*Source*-Gewebe, hier: photosynthetisch aktive Blätter), diese Assimilate für den Transport durch die Leitgewebe bereitzustellen. Die *Sink*-Stärke ist analog die Fähigkeit der Gewebe, die Assimilate netto importieren (*Sink*-Gewebe, hier: Körner), diese effektiv zu verarbeiten, so dass es zu keinem Assimilatstau kommt, was wiederum die Aufnahme verringern würde. Im Mittelpunkt der Beobachtungen sollten deshalb der Aufbau der Stärke, also des Endprodukts, aber auch die primäre Verarbeitung der im Phloem transportierten Saccharose durch Invertasen und Saccharose-Synthasen (Susy) stehen. Bei erhöhter Aktivität können diese Prozesse für eine gesteigerte *Sink*-Stärke sorgen, da (i) die Saccharose aus dem Phloem besser verarbeitet wird, und (ii) der Aufbau der osmotisch inaktiven Stärkekörner die importierten Zucker aus dem Gleichgewicht nimmt. Während Stärkesynthasen zusammen mit Verzweigungsenzymen für den letztlichen Aufbau der Stärke verantwortlich sind, wird die dafür benötigte ADP-Glucose von der ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGPase) bereitgestellt. Bereits in Abschnitt 2 wurde auf die Relevanz dieses Enzyms eingegangen. In Mais wurden hitzesensitive Formen entdeckt, die mit Abbruch der Kornentwicklung in Verbindung gebracht wurden [12]. Es ist bekannt, dass eine Isoform mit den entsprechenden Charakteristika wie in Mais auch in Gerstenkörnern aktiv ist [17]. In den assoziationsgenetischen Analysen des CLIMATE CHANGE Vorprojekts wurde ein QTL für den Abbruch der Kornentwicklung unter Trockenstress und der Anzahl der Körner pro Ähre unter kombiniertem Trocken- und Hitzestress auf Chromosom 7H entdeckt, der mit dieser AGPase-Isoform kolokalisiert (Abbildung 3 und Abbildung 4). Dies ließ die Vermutung zu, dass allelische Variationen in diesem Gen die Hitzesensitivität beeinflussen. Über diese prominenten Kandidaten hinaus, sind eine Vielzahl weiterer Enzyme wie beispielsweise Metabolitransporter an der Stärkebiosynthese beteiligt.



**Abbildung 3:** (vorherige Seite) Manhattan-Plot zur assoziationsgenetischen Analyse zwischen SNP-Marker-Allelen (blau) und der Rate des Kornabbruchs (grün, engl.: *Abortion rate*) von trockengestressten Gerstengenotypen. Die negativ dekadischen Logarithmen der Irrtumswahrscheinlichkeiten für Assoziationen (blau) der Kornabbruchsraten in % (grün) mit den SNP-Allelen sind als Punktepaare entlang der Position der SNP-Marker im Gerstengenom aufgetragen, wobei die einzelnen Chromosomen durch horizontale Striche gekennzeichnet und farblich abgesetzt sind. Die Signifikanzschwelle mit einer *false discovery rate* (FDR) von 5% ist als gestrichelte Linie dargestellt.



**Abbildung 4:** Manhattan-Plot zur assoziationsgenetischen Analyse zwischen SNP-Marker-Allelen (blau) und der Kornanzahl pro Ähre (grün, engl.: *Kernel per Ears*) von trocken- und hitzestressten Gerstengenotypen. Die negativ dekadischen Logarithmen der Irrtumswahrscheinlichkeiten für Assoziationen (blau) der Kornanzahl pro Ähre (grün) mit den SNP-Allelen sind als Punktepaare entlang der Position der SNP-Marker im Gerstengenom aufgetragen, wobei die einzelnen Chromosomen durch horizontale Striche gekennzeichnet und farblich abgesetzt sind. Die Signifikanzschwelle mit einer *false discovery rate* (FDR) von 5% ist als gestrichelte Linie dargestellt.

### 3.2.3 Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner)

Ebenso wie die Stärkebiosynthese im Korn beruht die Umsteuerung der Assimilatverteilung auf einem komplexen Netzwerk involvierter Gene. Von allen drei zu Beginn definierten Zielprozessen ist dies der Prozess, der in seiner Fülle bis jetzt am wenigsten untersucht ist. Da im Rahmen dieses Projektes vor allem die praxisnahe Anwendung im Vordergrund stand, sollte primär die Stickstoff Remobilisierung betrachtet werden. Hier konnten Studien belegen, dass eine verminderte Stickstoff-Recyclingrate in *Source*-Gewebe einen negativen Einfluss auf das Wachstum der *Sink*-Gewebe haben kann. Einen starken Anteil an der Remobilisierung haben dabei vor allem die Glutamin-Synthetasen [18].

### 3.2.4 RNAseq

Durch modernste *next generation sequencing* (NGS) Methoden sollte darüber hinaus getestet werden, ob durch die Erstellung des Transkriptoms einiger ausgewählter Genotypen ein tiefer Einblick in die regulatorischen Eigenheiten der genetisch und umweltbeeinflussten Genexpression möglich ist. Im Fokus sollten Gerstensorten stehen, die sich in den verschiedensten Umweltbedingungen besonders auffällig gut oder schlecht verhielten, also Extreme darstellten und potentiell somit deutliche und relevante Unterschiede im Transkriptom aufweisen. Dadurch sollte es möglich sein, Komplexe regulatorische Netzwerke als Reaktion auf gewählte Stressbedingungen zu identifizieren, die potentiell Stresstoleranz vermitteln und somit weitere potentielle Zielprozesse darstellen. Darüber hinaus sah die ursprüngliche Projektplanung *exome capture* Analysen vor. Das Exom ausgewählter Genotypen sollte dabei möglichst komplett abgedeckt werden, um die maximale Bandbreite relevanter Sequenzvariationen im Sortensortiment erfassen zu können. Durch die Transkriptomanalysen, die ebenfalls Sequenzinformationen der kodierenden Bereiche liefern, wurden die Exomsequenzierungen zurückgestellt.

## 3.3 Arbeitspaket 3: Identifizierung von Allelen, die erhöhte Ertragsstabilität unter Stress vermitteln

In den beiden zuvor beschriebenen Arbeitspaketen wurden zum einen die Gene der untersuchten Stoffwechselwege im Genom der Gerste annotiert und lokalisiert (Arbeitspaket 1) und zum anderen wurden die Stoffwechselleistungen ausgewählter biochemischer Prozesse mit agronomischen Parametern unter variablen Stressbedingungen korreliert (Arbeitspaket 2). Nun sollten die Informationen dieser beiden Datensätze zusammengebracht werden, um die unterschiedlichen ertragsrelevanten Stoffwechselleistungen der Genotypen unter Stress der Ausprägung bestimmter Gene zuzuordnen. Ziel dieses Arbeitspaketes war also die Erstellung einer Liste von Genen, deren Ausprägung mit der Ertragsleistung unter Trockenstress bzw. unter kombiniertem Stress korreliert. Dabei wird sich die Ausprägung der Zielgene vor allem durch die allelische Variation unterscheiden. Allele eines Gens können sich dabei im kodierenden Bereich aber auch im nicht-kodierenden Bereich, z.B. im Promotorbereich, unterscheiden. Durch ersteres wird die Qualität des exprimierten Genproduktes, durch zweites die Quantität der Genexpression beeinflusst.

Bei der Annotation und Lokalisation der Gene in Arbeitspaket 1 wurden vorhandene Sequenzinformationen der Gerstenkultivare Morex, Barke und Bowman verwendet. Relevante Gene konnten deshalb sehr schnell nach Sequenzunterschieden durchmustert werden, um initiale Aussagen über allelische Variationen zu treffen: Unterscheidet sich bereits die Sequenzinformation dieser Referenzsorten, besteht die Chance, dass Sorten, die sich im Rahmen des Projekts auffällig verhalten haben, ebenso allelische Variationen tragen. Über PCR-basierte Sequenzierungsmethoden konnten hier neue Allele identifiziert und zugeordnet werden. Die in Arbeitspaket 2 über NGS-Methoden generierten Sequenzdaten ermöglichten hier ebenso einen sehr effizienten Einblick über die allelische Diversität prinzipiell aller Gene der ausgewählten Genotypen und stellen somit ein wertvolles Datenreservoir dar.

### **3.4 Arbeitspaket 4: Ableitung und Validierung von molekularen Markern für die Gerstenzüchtung**

Die in Arbeitspaket 3 charakterisierten Allele der Zielgene sollten dazu genutzt werden, molekulare Marker aus den identifizierten Sequenzunterschieden zwischen den Allelen abzuleiten. Idealerweise werden SNP-Marker oder PCR-basierte STS-Marker erstellt.

Im letzten Jahr sollte die Eignung der erstellten Marker validiert werden. Hierzu sollten die ausgewählten Marker in möglichst vielen unterschiedlichen Umwelten (= Stresskombinationen) mit Ertragsdaten korreliert werden. Dabei wurden sowohl die Ausgangspopulation als auch Gerstengenotypen getestet, die im Laufe des Projektes aus den Zuchtprogrammen der assoziierten Zuchtbetriebe hinzugenommen wurden. Die Ausweitung der untersuchten Genotypen und getesteten Umwelten war wichtig, um die Anwendbarkeit der entwickelten Marker in der Gerstenzüchtung zu überprüfen. Ggf. kann es notwendig sein, die Marker für die einzelnen Zielgene aufgrund neu gewonnener Allelinformationen aus den hinzugenommenen Genotypen zu verändern, um eine breitere Zuverlässigkeit zu gewährleisten. Schließlich wurden die generierten Marker an aktuellem Gerstenmaterial aus dem Zuchtsortiment der assoziierten Betriebe in gleicher Weise getestet. Damit wurde die Praxistauglichkeit der entwickelten Marker anhand der physiologischen Eigenschaften und Ertragsdaten von den Versuchsfeldern der Zuchtbetriebe überprüft. Nach Abschluss dieser Arbeiten war der Einsatz der entwickelten Marker im laufenden Zuchtbetrieb möglich, um deren Tauglichkeit für die Züchtung klimaangepasster Sorten erneut zu validieren.

### 3.5 Ursprünglicher Zeitplan und Meilensteinplanung

**Tabelle 2:** Im Projektantrag vorgeschlagener Zeitplan zur Verteilung der Arbeiten um die gesetzten Meilensteine (M1-M4) zu erreichen.

Projektjahr	2016				2017				2018				
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
<b>1): Annotation von Zielgenen und deren Verankerung im Gerstengenom</b>													
Annotation der Zielgene				M 1									
Verankerung der Zielgene im Gerstengenom				M 1									
<b>2): Korrelation der Ertragsleistung mit Stoffwechseleigenschaften unter Stressbedingungen</b>													
Etablierung einfacher und kombinierter Stressbedingungen in Klimakammerversuchen			M 2										
Klimakammerversuche mit veränderten Umweltbedingungen													
<b>3): Identifizierung von Allelen, die eine erhöhte Ertragsstabilität vermitteln</b>													
Identifizierung der Expressionshöhe und der Sequenz von Allelen durch RNA-Seq							M 3						
Identifizierung von allelischen Varianten in unabhängigen Genotypen und neuen Umweltbedingungen durch NGS													
<b>4): Ableitung und Validierung molekularer Marker für die Gerstenzüchtung</b>													
Ableitung molekularer Marker in verschiedenen Umweltbedingungen								M 4					
Validierung molekularer Marker in unabhängigen Genotypen													

### 3.6 Meilensteine

M1: Die zu Beginn des Projekts definierten Zielgene sind annotiert und im Genom verankert.

M2: Die Etablierung der Trockenstress- und kombinierten Hitze- & Trockenstressbedingungen ist abgeschlossen.

M3: Die Analyse der RNA-Seq-Daten ist abgeschlossen und differentiell exprimierte Allele aus den zu Projektbeginn definierten zellulären Zielprozessen sind identifiziert.

M4: Der erste Satz an molekularen Markern liegt vor.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

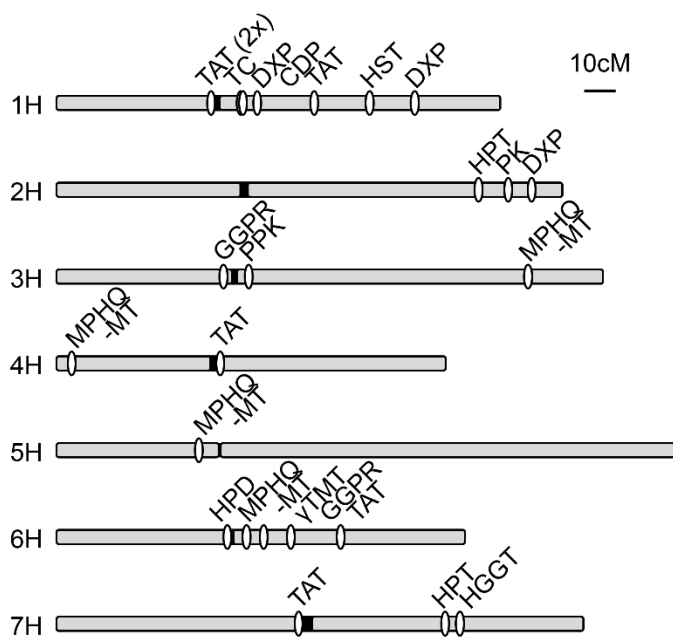
### 4.1 Arbeitspaket 1: Annotation von Zielgenen und deren Verankerung im Gerstengenom

Wie in Abschnitt 3.1 dargestellt wurde, ist die Annotation und Verankerung der Zielgene ein elementarer Bestandteil zur Aufklärung der genetischen Struktur der Zielprozesse. Sie gibt Aufschluss darüber, ob und in welcher Anzahl strukturgebende und regulatorische Gene, sowie Enzyme im Gerstengenom codiert sind. Komplexe Stoffwechselprozesse mit mehreren enzymatischen Schritten werden dementsprechend von mehreren Genen kodiert und reguliert. Darüber hinaus werden einzelne enzymatische Reaktionen innerhalb dieser Stoffwechselwege oft von mehreren Enzymisoformen katalysiert, die selbst von individuellen Genorten (Orthologe und Paraloge) codiert werden. Dies erweitert die Komplexität. Sind die vorhandenen Sequenzinformationen jedoch vollständig, können während der Annotation über die Identifizierung von Signal-, und Transitpeptiden bereits Vorhersagen über die potentielle intrazelluläre Kompartimentierung der Isoformen getroffen werden. Somit kann die bestehende Palette an Isoformen leichter den gewünschten Zielprozessen zugeordnet und damit die Fülle der Zielgene eingeschränkt werden.

Ein Teil der gesuchten Zielgene ist in den verschiedenen Versionen des Gerstengenoms bereits korrekt annotiert. Um sicherzustellen, dass die in Abschnitt 3.1 zu Projektbeginn definierten Stoffwechselprozesse möglichst lückenlos annotiert sind, wurden die Annotationen jedoch erneut validiert. Ausgangspunkt dafür waren immer funktionell bereits charakterisierte und annotierte Gene aus anderen Organismen, vor allem die des sehr gut annotierten Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* aber auch die zur Gerste nahen Verwandten Reis, Weizen und Mais. Mit dem tBLASTn-Algorithmus wurden zunächst cDNA-Datenbanken und vorhergesagte Transkriptsequenzen auf Sequenzhomologien auf Proteinebene durchsucht, da diese für die funktionelle Homologie zweier Proteine relevant ist. Der *Barley BLAST Server* des IPK Gatersleben ([https://webblast.ipk-gatersleben.de/barley\\_ibsc/](https://webblast.ipk-gatersleben.de/barley_ibsc/)) sowie die Phytozome-Plattform des *Joint Genome Institutes* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) erlaubten zuverlässigen Zugang zu den verschiedenen Iterationen der im Laufe des Projektes verfügbaren Assemblierungen des Gerstengenoms. Die manuelle Kuratation zeigte sich als besonders relevant bei einigen Zielgenen, die über eine große Anzahl an Genkopien verfügten. Ein Beispiel hierfür ist die Familie der Invertasen, die in drei Untergruppen mit insgesamt 34 Genkopien eingeteilt werden (siehe Anhang). Darüber hinaus mussten die Invertasegene von Enzymen der Fruktanbiosynthese abgegrenzt werden, die sehr ähnlich sind. Anschließend wurden diese Sequenzen dann auf Ebene der genomischen DNA verankert. Hier wurden sowohl das aktuelle, 2017 publizierte Morex Referenzgenom ([19], [20]), also auch die WGS\_contigs der drei Genotypen Morex, Barke und Bowman berücksichtigt [21]. Das Referenzgenom gibt dabei Aufschluss über die physikalischen Positionen der Gene (in Basen) während die WGS\_contigs anhand einer Rekombinationskarte (in cM) das Gerstengenom sortieren. Wie in Abschnitt 3.1 dargestellt eignet sich die Sequenzinformation der drei Kultivare Morex, Barke und Bowman deshalb nicht nur für die Identifizierung von Allelen in Arbeitspaket 3, sondern auch, um mögliche Züchterfolge abzuschätzen: Gene, die entkoppelt vorliegen, können prinzipiell leichter aus mehreren Ursprungsgenotypen in einer neuen Sorte

vereint werden. Zusätzlich eignet sich die verwendete Rekombinationskarte besser, um mit den Markerdaten und somit den GWAS aus dem CLIMATE CHANGE Vorprojekt verglichen zu werden.

In Abbildung 5 sind anhand der genetischen Karte der Genotypen Morex, Barke und Bowman exemplarisch die Gene der Tocopherol-Biosynthese dargestellt. Diese erweitern die von [22] bereits publizierten Annotationen und Verankerungen um einige wichtige Gene, wie später in Abschnitt 4.2.5.3.1 deutlich wird. In Tabelle 7 (Anhang) sind die übrigen im Projektverlauf kartierten Gene aufgelistet, die potentiell eine relevante Rolle bei der Stärkebiosynthese im Korn spielen. Dort finden sich auch die Gene, die bei der Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem Gerstenkorn eine wichtige Rolle spielen. Hier wurden bis jetzt die für den Stickstoff Metabolismus wichtigen Glutamin Synthethasen kartiert [23]. Über diese initialen Stoffwechselprozesse hinaus wurden vereinzelt weitere Gene kartiert, für die es aktuelle Hinweise in der Fachliteratur für einen Einfluss auf die Stresstoleranz gibt (ebenso in Tabelle 7 im Anhang). Somit konnte Meilenstein M1 der Projektplanung erfolgreich erfüllt werden und stellt die Grundlage für die Arbeitspakete 3 und 4 dar.



**Abbildung 5:** Lokalisation der Gene der Vitamin E-Biosynthese auf einer genetischen Karte des Gerstengenoms [21]. Die Arme der sieben Chromosomen der Gerste sind als hellgraue Balken dargestellt, verbunden durch schwarze Centromere. Der genetische Maßstab der Abbildung ist in der Ecke oben rechts angezeigt. CDP: Chlorophyll-Dephytylase, DXP: Desoxyxylulosephosphat-Synthase, GGPR: Geranylgeranyl-Dehydrogenase, GGK: Geranylgeranyl-Kinase, HGGT: Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase, HPD: Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, HPT: Homogentisat-Phytyl-Transferase, HST: Homogentisat-Solanyl-Transferase, MPHQ-MT: Methyl-Phytyl-Benzochinon-Methyltransferase, PK: Phytyl-Kinase, PPK: Phytyl-Phosphat-Kinase,  $\gamma$ TMT:  $\gamma$ -Tocopherol-

Methyltransferase, TAT: Tyrosin-Aminotransferase, TC: Tocopherol-Cyclase.

## **4.2 Arbeitspaket 2: Korrelation der Ertragsleistung mit Stoffwechsel-Eigenschaften in Einzelstress- und kombinierten Stressbedingungen**

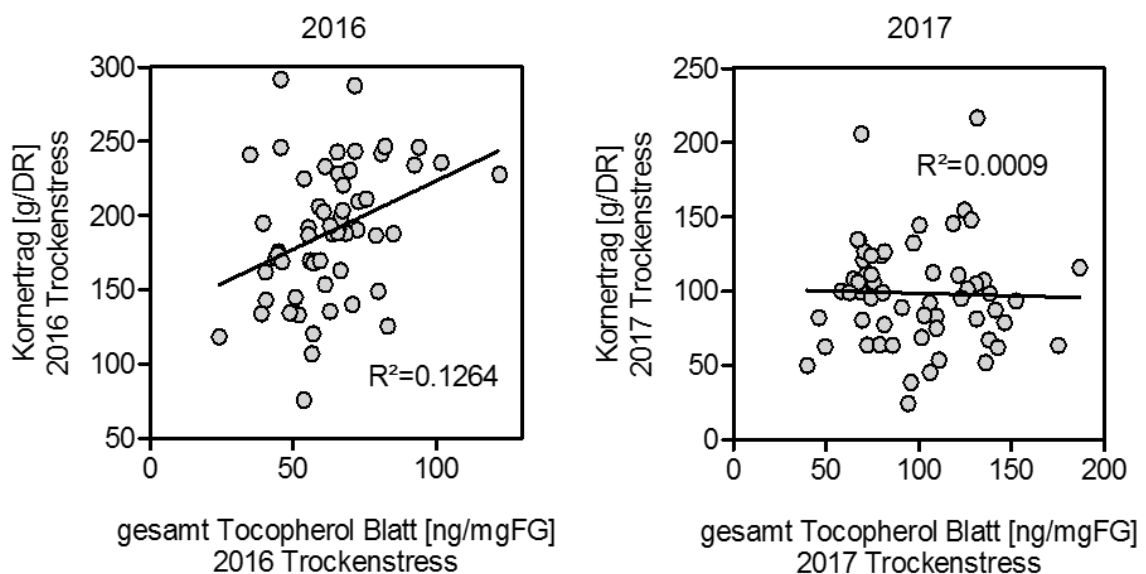
Die Validierung der Korrelationen zwischen Stoffwechselprozessen und Ertrags-eigenschaften sollte in unterschiedlichen abiotischen Stress-Szenarien erfolgen. An der FAU konnten relativ bald nach Projektstart kontrollierte Trockenstress-Bedingungen in großen Gewächshäusern und kombinierte Trocken- und Hitzestress-Bedingungen in Klimakammern etabliert werden, womit Meilenstein M2 der Projektplanung erreicht wurde. Das Trockenstressszenario in Gewächshäusern wurde dabei vor allem für die Durchmusterung des Tocopherolgehalts derjenigen ca. 60 Gerstengenotypen aus der Sortenkollektion eingesetzt, die bislang noch nicht in Vorarbeiten unter Trockenstress untersucht wurden. Darunter befinden sich auch die Linien, die von den assoziierten Zuchtunternehmen (siehe Abschnitt 7) dem Sortensortiment beigefügt wurden. Da auf Grund des beschränkten Platzangebots und der damit einhergehenden geringen Anzahl an Pflanzen die pro Genotyp angezogen werden konnten schlecht Aussagen über Ertragsleistung zu machen sind und im Hinblick für die Anwendung in der Züchtung neuer Gerstensorten die Überprüfung der potentiellen Assoziationen besonders unter Freilandbedingungen relevant ist, wurde vermehrt Fokus auf die Analyse der ROS-Versuche der LfL gelegt.

Kontrollierte Trockenstress-Versuche sind an der LfL in Freising bereits seit mehreren Jahren etabliert. Von Frühjahr bis Sommer 2016 sind 57 gezielt ausgewählte Genotypen der Sortenkollektion (111 Sorten gesamt) an der LfL unter kontrollierten Trockenstress-Bedingungen in einem ROS untersucht worden (siehe auch Bericht des TP06). Von Frühjahr bis Sommer 2017 wurde dieser Versuch mit einem neuen Set an 59 partiell überlappenden Genotypen wiederholt. Im letzten Projektjahr wurde schließlich ein reduziertes Set von 15 Genotypen erneut im ROS angebaut. Die Verringerung der Genotypenanzahl im letzten Projektjahr ermöglichte trotz der begrenzten Fläche im ROS eine Aussaat in Parzellen. Zuvor konnten lediglich Doppelreihen pro Genotyp angebaut werden. Die Doppelreihen dienten demnach vor allem der Durchmusterung, die Parzellen ermöglichten fundiertere Aussagen über die Ertragsleistung der ausgewählten Sorten.

In allen Projektjahren wurden die trockengestressten und die Kontrollpflanzen für spätere Analysen im Labor beprobt. Dafür wurden Blattproben in einer frühen Wachstumsphase (BBCH Code: 23) und Fahnenblätter -1 während der Ährenreife (BBCH Code: 77-83) vor Ort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf Trockeneis an den LS für Biochemie überführt und dort bei -80°C für spätere Analysen tiefgekühlt gelagert. Außerdem wurden im zweiten Projektjahr reife Körner beprobt, schockgefroren und ebenso tiefgekühlt gelagert. An der FAU wurde dann in ausgewählten Proben sukzessive der Gehalt an Vitamin C und E, freien Zuckern und Stärke, Succinat, Glutathion, freien Aminosäuren und Blattpigmenten gemessen. In reifen Körnern der Pflanzen des ersten Versuchsjahres wurde ebenso der Vitamin E Gehalt gemessen.

#### 4.2.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt

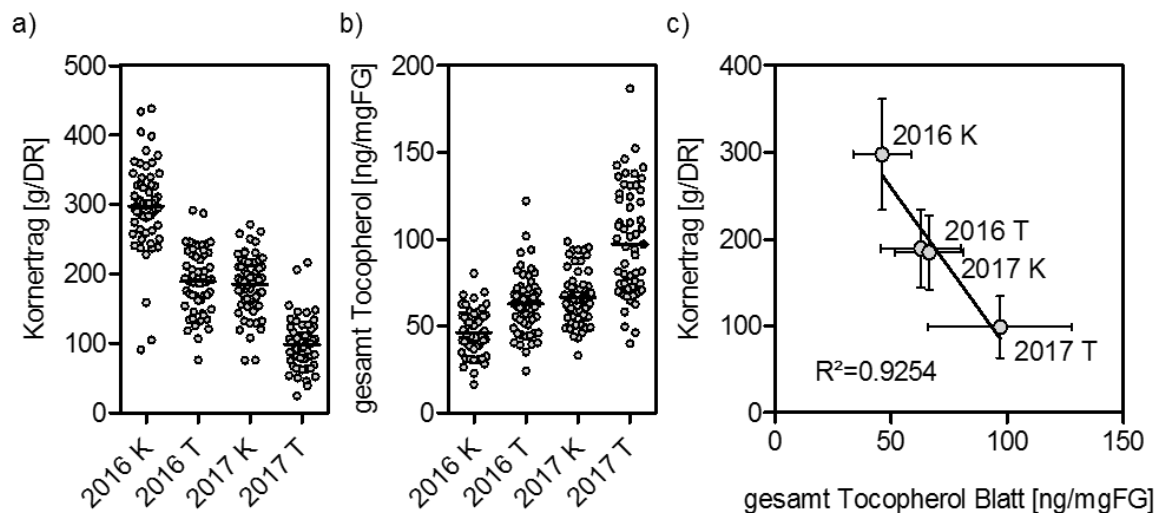
Wie berichtet wurde im CLIMATE CHANGE Vorprojekt eine positive Korrelation zwischen dem TKG und dem Gehalt an  $\gamma$ -Tocopherol im Fahnenblatt für deutsche Zuchtlinien unter Trockenstress gefunden (Abbildung 1). Für alle Sorten der ROS-Anzuchten 2016 und 2017 wurde deshalb der Tocopherolgehalt im Fahnenblatt -1 mittels HPLC-Methoden bestimmt (nach [24]). Die Erhebung von Ertragsparameter unter anderen morphologischen und physiologischen Eigenschaften erfolgte durch die LfL in Freising. Wie in Abbildung 6 anhand des gesamt-Tocopherolgehalts und des Kornertrags unter Trockenstressbedingungen für alle Genotypen beispielhaft dargestellt ist, konnten in beiden Jahren keine direkten Hinweise gefunden werden, dass Sorten mit hohem Tocopherolgehalt einen höheren Ertrag oder Ertragsstabilität (nicht gezeigt) aufweisen. Auch die alleinige Betrachtung der deutschen Zuchtlinien wie im CLIMATE CHANGE Vorprojekt konnte keine Korrelation hervorbringen (nicht gezeigt), was, wie dort postuliert, für eine spezielle physiologische Antwort des Zuchtmaterials abseits der Landrassen gesprochen hätte. Für die einzelnen Isoformen  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherol zeichnen sich dabei identische Tendenzen ab, weshalb sie hier nicht gezeigt sind. Die weiteren quantifizierten Tocochromanol-Formen waren im Blatt nur in Spuren messbar.



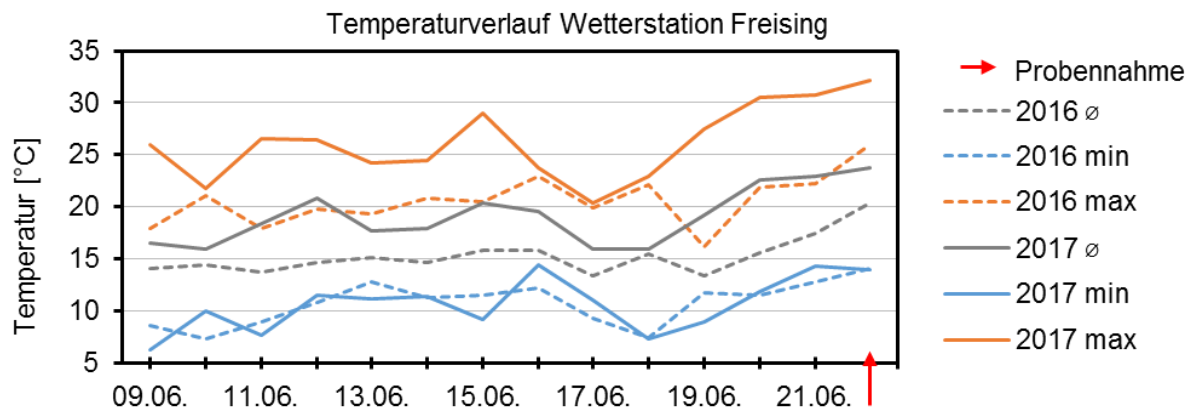
**Abbildung 6:** Korrelation zwischen dem gesamt Tocopherolgehalt [ng/mgFrischgewicht(FG)] in Fahnenblättern -1 von trockengestressten Gerstensorten, die im ROS der LfL Freising in den Jahren 2016 (links) und 2017 (rechts) gewachsen sind, zum Kornertrag pro Doppelreihe [g/DR] nach Reife derselben Pflanzen. Jeder Datenpunkt stellt eine beprobte Gerstensorte dar.

Dies bedeutet, dass der Tocopherolgehalt in Fahnenblättern-1 zum Zeitpunkt des Ährenschiefens keinen direkt erkennbaren genotypspezifischen positiven Einfluss auf den Ertrag oder dessen Stabilität hat. Der Ertrag ist jedoch durch viele Faktoren beeinflusst und es ist schwer, wie bereits in Abschnitt 2 diskutiert, den Beitrag eines einzelnen Parameters zu entschlüsseln. Betrachtet man die gemessenen Tocopherol-Werte (Abbildung 7a) zunächst ge-

trennt von den Ertragsdaten über beide Jahre hinweg (Abbildung 7b) ist ein negativer Trend zu erkennen: Wie erwartet induziert der applizierte Trockenstress in beiden Versuchsjahren in allen Genotypen eine Zunahme des Gesamt-Tocopherolgehalts (Abbildung 7a). Ebenso resultiert der Trockenstress in beiden Jahren in Ertragseinbußen (Abbildung 7b). Auffällig hierbei ist, dass sowohl die Werte für Tocopherol, also auch die des Kornertrags in Kontrollpflanzen in 2017 bereits die Werte aus den trockengestressten Pflanzen in 2016 aufwiesen. Die Werte für trockengestresste Pflanzen in 2017 waren mit Abstand am höchsten, bzw. niedrigsten. Der Unterschied zwischen beiden Versuchsjahren ist vermutlich den unterschiedlichen Durchschnittstemperaturen geschuldet (Abbildung 8). So hatten aufgrund der höheren Temperaturen im Jahr 2017 die Gerstenpflanzen nicht nur Trocken-, sondern auch Hitzestress. Die Kombination führte dann vermutlich zu den höheren Tocopherolgehalten. Vergleicht man die Mittelwerte des Tocopherolgehalts und des Ertrags aller Genotypen über beide Jahre hinweg kommt es zu einem stark negativen linearen Zusammenhang (Abbildung 7c). Offensichtlich konnte die Tocopherol-Akkumulation demnach nicht die stressinduzierten Ertragseinbußen stoppen.



**Abbildung 7:** Tocopherolgehalt (a) und Kornertrag (b) von Kontroll- (K) und trocken gestressten (T) Gerstenpflanzen gewachsen im ROS der LfL Freising in zwei Jahren (2016, 2017). Jeder Datenpunkt stellt eine untersuchte Gerstensorte dar. Die Mittelwerte aller Sorten (schwarze horizontale Balken in (a) und (b)) korrelieren stark negativ miteinander: (c) Je größer der stressinduzierte Ertragsverlust ist, desto mehr Tocopherol akkumuliert.

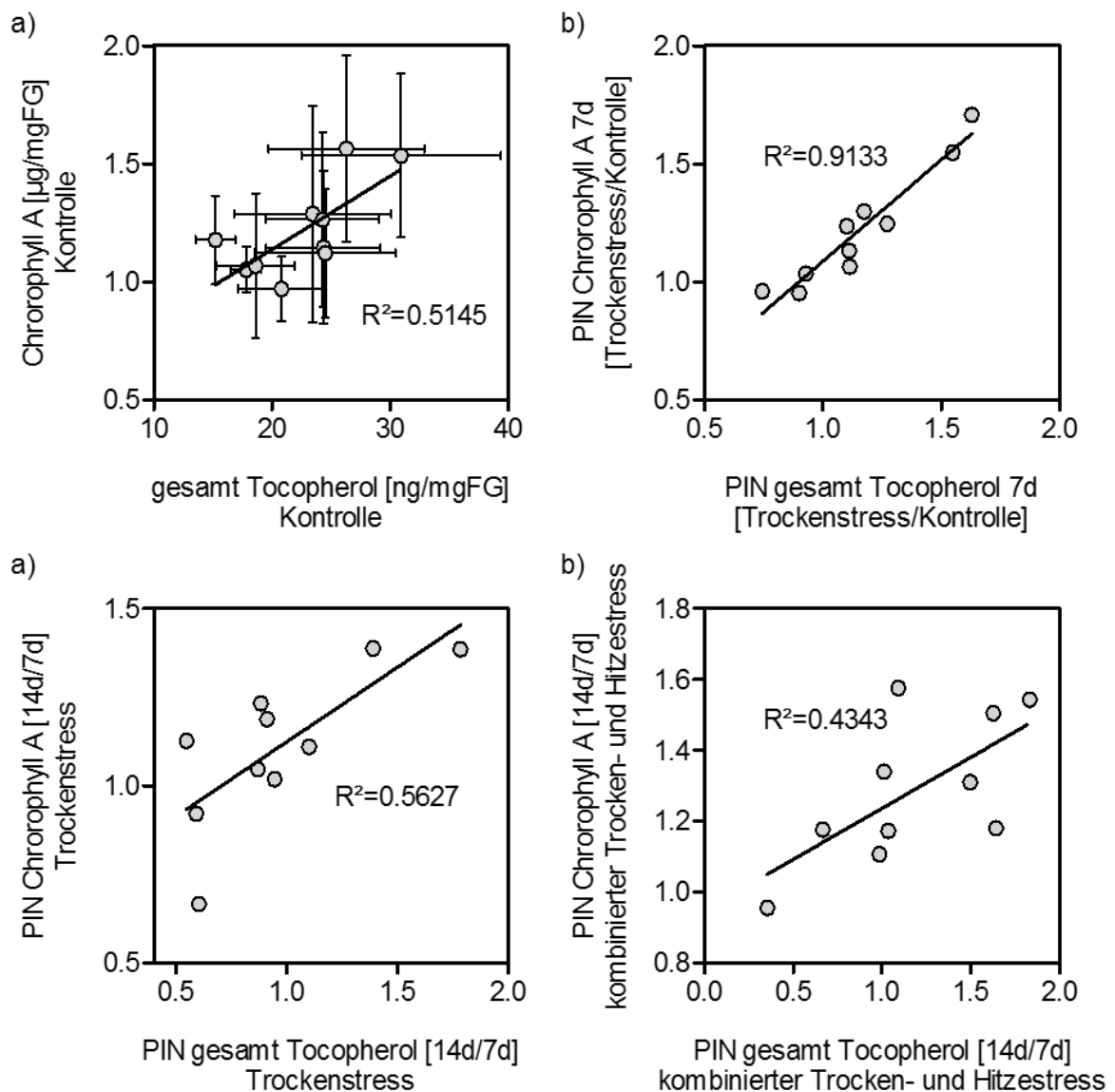


**Abbildung 8:** Temperaturverlauf der Wetterstation Freising. Gezeigt sind die Tageshöchstwerte (max), Tagestiefstwerte (min) und Tagesmittelwerte ( $\emptyset$ ) [°C] in beiden Jahren in denen im ROS bis jetzt Pflanzen analysiert wurden. Die Probennahme fand in beiden Jahren am 22.06. statt. Vor allem in den vier Tagen vor der Probennahme wurden im Jahr 2017 besonders hohe Temperaturen verzeichnet. Diese stellen für die Pflanzen einen weiteren abiotischen Stressfaktor dar.

Auf Grund des stark linearen Zusammenhangs zum Stressniveau (repräsentiert durch Ertragsverlust - Abbildung 7c) scheint die Tocopherol-Akkumulation einer stringenten Regulation zu unterliegen und es lässt erahnen, dass die Pflanzen gezielt quantitativ auf den Stress mit der Metabolit-Akkumulation reagieren. Wie später in Abschnitt 4.3.1 (Arbeitspaket 3) dargestellt wird ist die Transkriptmenge der Homogentisat-Phytyl-Transferase auf Chromosom 7H (HPT-7H) ein entscheidender regulatorischer Faktor der Tocopherolmenge im Blatt. Eine relevante biologische Bedeutung für die Stressadaptation sollte demnach nicht ausgeschlossen werden.

Da der direkte positive Einfluss auf den Ertrag nicht detektierbar ist, sollte getestet werden, ob positive Auswirkungen auf intrazelluläre Faktoren messbar sind. Unter Trocken- und kombiniertem Trocken- und Hitzestress (Tabelle 1) wurden deshalb gezielt 10 Genotypen in Klimakammern angezogen. Da die Tocopherol-Biosynthese in der inneren Chloroplasten-hüllmembran verläuft [15] und dementsprechend in Chloroplasten große Vitamin E Mengen vorhanden sind, wurde der positive Einfluss des Tocopherols auf den Chlorophyllgehalt gemessen. Unter Kontrollbedingungen war der nach [25] bestimmte Chlorophyllgehalt dabei deutlich positiv mit dem Tocopherolgehalt korreliert (Abbildung 9a). Während kein direkter genotypspezifischer Einfluss unter Trocken- und kombiniertem Trocken- und Hitzestress auf die absolute Chlorophyllmenge gefunden werden konnte (nicht gezeigt), zeigten die prozentualen Änderungen von nichtgestressten zu gestressten Pflanzen und zwischen den verschieden langen Stressdauern deutliche Korrelationen (Abbildung 9b-d). Nach sieben Tagen Trockenstress konnten die Pflanzen, die eine höhere prozentuale Tocopherol-Akkumulation gegenüber den Kontrollpflanzen aufwiesen (*performance index* PIN, Quotient aus Trockenstress/Kontrolle), auch mehr Chlorophyll A akkumulieren (Abbildung 9b). Bei Vergleich der 14 und 7 Tage lang trockengestressten Pflanzen ist ebenso eine positive Korrelation aus Tocopherol-Akkumulation und Stabilität des Chlorophyll A Gehalts zu erkennen (Abbildung 9c). Dieselbe Aussage kann über Pflanzen gemacht werden, die 14 und 7 Tage kombinier-

tem Trocken- und Hitzestress ausgesetzt wurden (Abbildung 9d). Für die Menge an Chlorophyll B konnten ähnliche Zusammenhänge gefunden werden (nicht gezeigt). Wie hier gezeigt wurde ist die alleinige Betrachtung des Tocopherolgehalts oft nicht ausreichend, um positive Effekte auf physiologische Parameter zu identifizieren. Vielmehr muss die Dynamik der Parameter in der initialen Phase des Stresses und an späteren Zeitpunkten andauernden Stresses untersucht werden. Weitere Untersuchungen müssen letztlich zeigen in welchem Maß die Stabilisierung der Chlorophyllmenge für den Ertrag eine relevante Rolle spielt. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die stressinduzierte Tocopherol-Akkumulation auch weiterhin für die Steigerung der Pflanzenfitness in Betracht gezogen werden sollte.

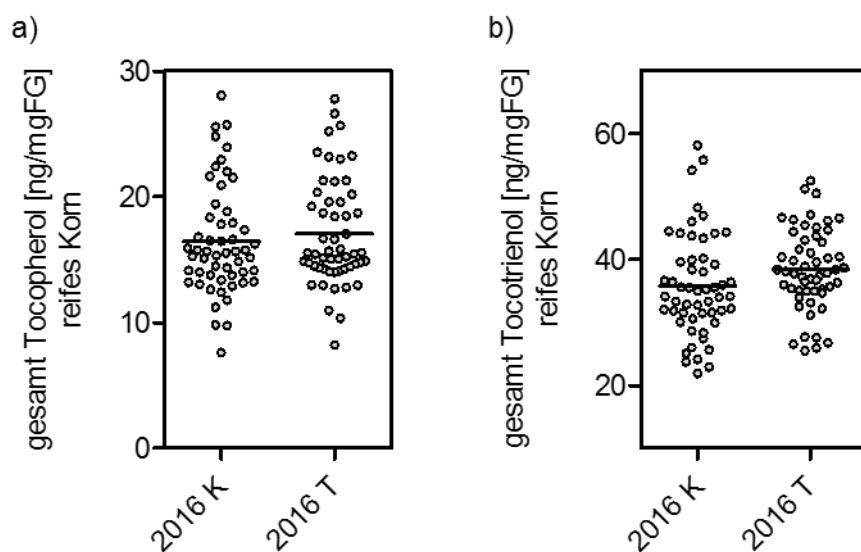


**Abbildung 9:** Korrelation zwischen dem Tocopherolgehalt von abiotisch gestressten Gerstensorten gewachsen in Klimakammern und dem Chlorophyll A Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{mgFG}$ ] derselben Pflanzen. Jeder Datenpunkt stellt eine beprobte Gerstensorte dar. a) gesamter Tocopherolgehalt in Korrelation zum Chlorophyll A-Gehalt unter Kontrollbedingungen (Zeitpunkt: 2 Tage (d) nach Stressbeginn). b) relativer Anstieg des gesamten Tocopherolge-

halts von Kontrolle zu Trockenstress (*performance index* (PIN)) in Korrelation zum PIN für Chlorophyll A an Tag 7 nach Stressbeginn. c) PIN des gesamten Tocophergehalts von trockengestressten Pflanzen von 7d zu 14d in Korrelation zum entsprechenden PIN für Chlorophyll A. d) wie c) für Pflanzen die unter kombiniertem Trocken- und Hitzestress gewachsen sind (Tabelle 1).

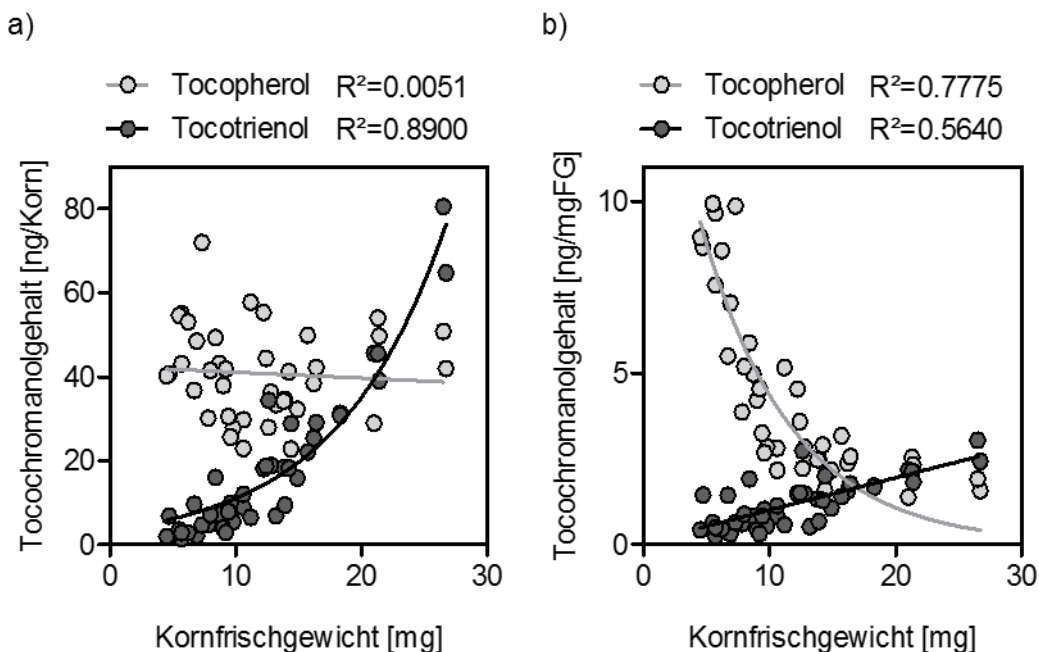
#### 4.2.2 Die Tocopherol-Biosynthese im Korn

Reife geerntete Körner der Pflanzen aller Genotypen, die im ersten Versuchsjahr im ROS wuchsen, wurden für Metabolit-Messungen herangezogen. Gemäß Literatur [26] akkumulieren in reifen Körnern zu einem Großteil Tocotrienol-Formen (Abbildung 10). Weder für den Tocopherol-, noch für den Tocotrienolgehalt konnten relevante Korrelationen zu den von der LfL erhobenen morphologischen und agronomischen Parametern identifiziert werden (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Blattproben konnte darüber hinaus kein signifikanter Anstieg der Tocochromanolgehalte in Körnern verzeichnet werden, die von trockengestressten Pflanzen geerntet wurden. Ob dies für den gesamten Kornreifungsprozess zutrifft kann anhand dieser Proben nicht beantwortet werden. Ähnlich den Blattproben gibt es auch in den reifen Körnern genotypspezifische Unterschiede im Tocopherol- und Tocotrienolgehalt. Assoziationsgenetische Studien konnten bereits potentielle Kandidaten für limitierende genetische Determinanten der Vitamin E-Biosynthese in Gerstenkörnern postulieren [22]. Erhöhte Vitamin E-Gehalte können sich dabei vor allem positiv auf die Lagerfähigkeit und damit Keimfähigkeit der Körner auswirken. So konnte in *Arabidopsis thaliana* Deletionsmutanten gezeigt werden, dass Samen ohne Vitamin E bereits nach kurzen Phasen der Lagerung ihre Keimfähigkeit verlieren, was auf oxidative Schäden innerhalb des Samens zurückgeführt wurde [27]. Neben dem Erhalt der Keimfähigkeit für den Bauern bei der Aussaat ist eine gute Keimungsrate auch für hochwertige Malzeigenschaften relevant. So konnten erhöhte Vitamin E-Gehalte im Korn mit erhöhten Vitamin E-Werten im Malz in Verbindung gebracht werden [28]. Für diese wiederum konnten bereits positive Einflüsse auf das Wachstum von Brauereien gezeigt werden [29].



**Abbildung 10:** (vorherige Seite) Tocopherolgehalt (a) und Tocotrienolgehalt (b) reifer Körner von Kontroll- (K) und trocken gestressten (T) Gerstenpflanzen gewachsen im ROS der LfL Freising im Jahr 2016.

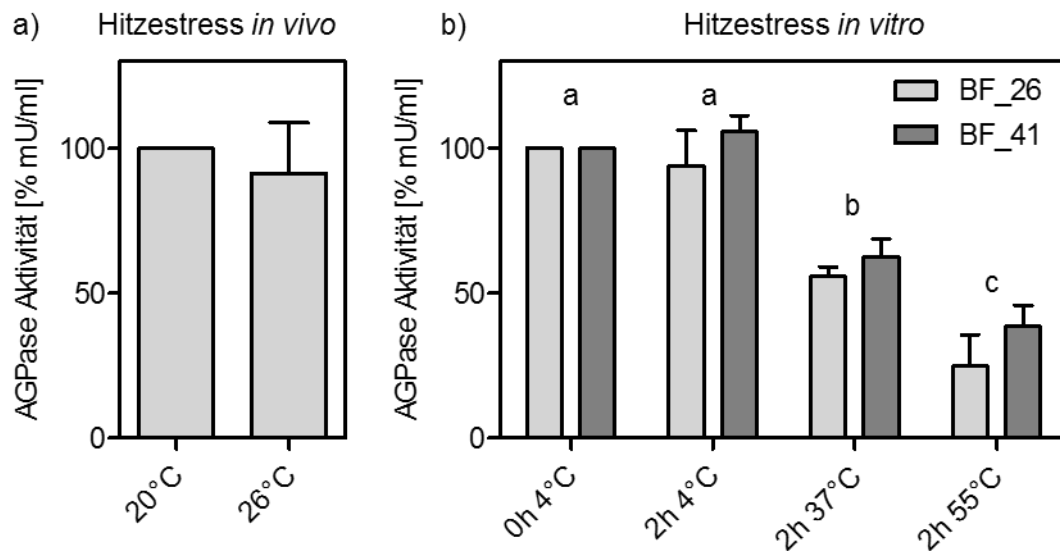
Die Tocochromanol-Dynamik in reifenden Körnern wurde anhand von Proben aus dem ROS-Versuch 2017 untersucht. Hier wurden von 10 Genotypen unreife Körner in der Milch- bis Teigreife (BBCH: 73-83) beprobt. Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Ähren aufgrund von unterschiedlichen Zeitpunkten der Bestäubung erschwerten die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Genotypen und den Wachstumsbedingungen. Es stellte sich heraus, dass das Alter der Körner einen sehr großen Einfluss auf die verschiedenen Tocopherol- und Tocotrienol-Formen hat. So akkumulieren wachsende Körner stetig Tocotrienole, während der Gehalt an Tocopherolen in diesen Stadien nicht mehr zuzunehmen scheint (Abbildung 11a). Der Gewichtsanteil der Tocopherole am Gewicht der wachsenden Körner nimmt dabei sogar ab, während der Gewichtsanteil der Tocotrienole konstant steigt (Abbildung 11b). Soweit es die durch die Entwicklungsstadien hervorgerufenen Unterschiede zuließen, konnte keine stressbedingte Zunahme des Vitamin E-Gehalts beobachtet werden. Die wachsenden Körner scheinen demnach von der Pflanze effektiv vom Trockenstress abgeschirmt zu werden, womit die stressbedingte transkriptionelle Aktivierung wie im Blatt (später in Abschnitt 4.3.1) nicht stattfindet. Über die verschiedenen genetischen Determinanten der Tocochromanol-Biosynthese, die später in Abschnitt 4.3 im Rahmen des Arbeitspakets 3 dargestellt werden, kann für diese Proben auf Grund des starken Einflusses des Entwicklungsstadiums keine Aussage getroffen werden.



**Abbildung 11:** Tocopherol- und Tocotrienolgehalt unreifer Körner von Gerstenpflanzen gewachsen im ROS der LfL Freising im Jahr 2017. a) der Tocochromanolgehalt pro Korn [ng/Korn] in Relation zum individuellen Kornfrischgewicht der Körner. b) der am Frischgewicht anteilige Tocochromanolgehalt in Relation zum individuellen Kornfrischgewicht.

### 4.2.3 Die Stärkebiosynthese im Korn

Um den vermuteten und in Abschnitt 3.2.2 erläuterten Einfluss der Hitzestabilität der AGPase im Korn zu untersuchen, wurden Genotypen mit unterschiedlichen Ertragsleistungen in Klimakammern Hitzestress ausgesetzt. Wachsende Körner hitzestresser Pflanzen wurden beprobt und mittels optisch-gekoppelter Enzymtests auf AGPase-Aktivität untersucht (Abbildung 12a). Dabei zeigte sich, dass Pflanzen in den gewählten Hitzestressszenarien (Tabelle 1) keine veränderte AGPase-Aktivität im Korn aufweisen. Der Hitzestress wurde dabei immer zwei Tage vor Probennahme appliziert, um eine vergleichbare Kornentwicklung bis zu diesem Zeitpunkt zu ermöglichen. Ebenso wie bei den Tocopherolmessungen der Kornproben der ROS-Pflanzen (Abschnitt 4.2.2), zeigte sich, dass das Alter der Körner einen limitierenden Faktor für die Vergleichbarkeit der Proben darstellen kann, weshalb eine Vielzahl der Messungen inkonsistente Ergebnisse hervorbrachten. Unterschiede in der Aktivität konnten innerhalb der Genotypen oft nicht reproduziert werden, weshalb meist nur die prozentualen Veränderungen interpretiert wurden. Zusätzlich zum *in vivo* applizierten Hitzestress wurden die Protein-Rohextrakte vor der Messung verschiedenen Hitzeinkubationsschritten ausgesetzt (*in vitro* Hitzestress). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität bei steigender Temperatur abnimmt (Abbildung 12b). Selbiges trifft auf unterschiedliche Inkubationszeiten zu (nicht gezeigt). Auch hier konnten keine genotypspezifischen Unterschiede entschlüsselt werden. Die gewählten Temperaturen des *in vitro* Hitzestresses sind für *in vivo* Anwendungen jedoch nicht relevant. Wie in den Analysen des Arbeitspakets 3 festgestellt wurde, tragen fast ausschließlich alle Genotypen dasselbe Allel des AGPase Gens, das in Abschnitt 3.2.1 als potentiell Zielgen identifiziert wurde (Abschnitt 4.3.3). Somit konnten für diesen Zielprozess keine biochemischen Parameter identifiziert werden, die potentiell einen Einfluss auf die Ertragsleistung von Gerstenpflanzen haben.



**Abbildung 12** Messungen der AGPase Aktivität wachsender Gerstenkörner. Prozentuale Werte der Aktivitäten pro Extraktvolumen [% mU/ml] referenziert auf a) Kontrollbedingungen und b) die Messung zum Zeitpunkt 0h. a) Gerstenpflanzen wuchsen unter Kontrollbedingungen (20°C) in einer Klimakammer. Zwei Tage vor der Probennahme wurde ein Teil in eine Hitze-

kammer (26°C) gestellt. Es sind keine signifikanten durch die Hitze hervorgerufenen Unterschiede messbar. b) Die Gerstenpflanzen wuchsen unter Kontrollbedingungen auf. Zunächst wurde die AGPase-Aktivität der beprobten Körner direkt nach Extraktion gemessen (0h 4°C). Teile der Extrakte wurden für 2h unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und dann erneut vermessen. Es konnte eine signifikante Abnahme der AGPase-Aktivität durch die Hitzeinkubation der Extrakte identifiziert werden (Student's t-test,  $p < 0.05$ ). Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen wurden nicht gefunden.

#### **4.2.4 Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner)**

Die Umsteuerung der Assimilatverteilung konnte bis zur Projektprotokollierung nicht betrachtet werden. Trotz der initialen Eingrenzung auf die Stickstoff-Remobilisierung wurden keine gezielten Analysen durchgeführt, die diese Fragestellung aussagekräftig hätten beantworten können.

#### **4.2.5 RNAseq**

##### **4.2.5.1 Allgemeine Struktur des Datensatzes**

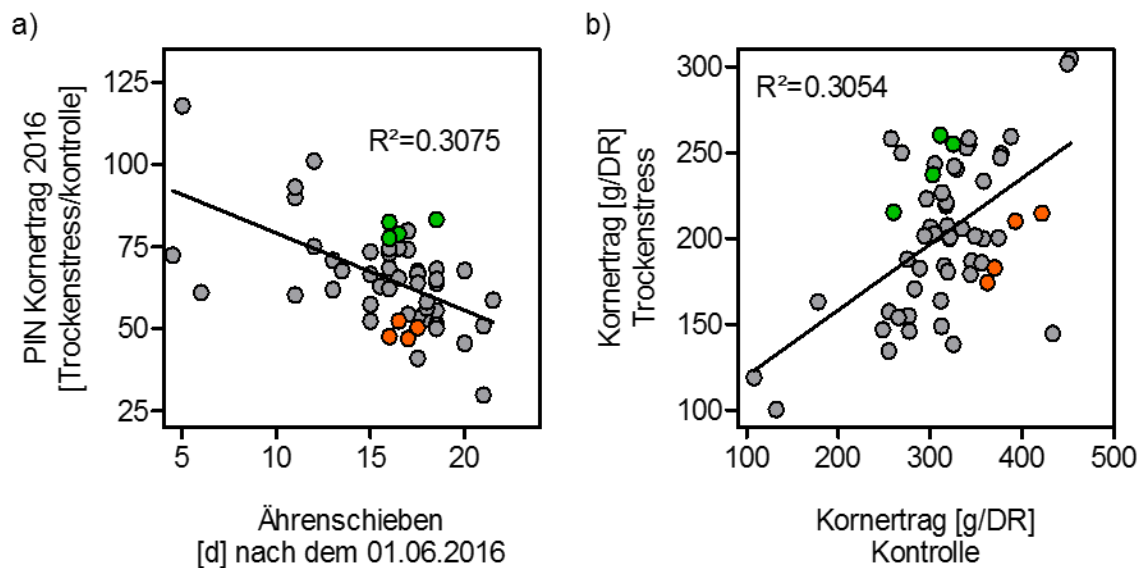
Die zu Projektbeginn geplanten NGS-Analysen sollten Aufschluss über (i) die genetische Diversität des verwendeten Genpools, sowie über (ii) transkriptionelle Regulatoren der Ertragsleistung geben. Es bestand Grund zur Annahme, dass komplexe genotypspezifische regulatorische Netzwerke aufgedeckt werden können, die Ertragsstabilität unter Stressbedingungen ermöglichen. Denkbar wären hier stressinduzierte Prozesse, die erst bei auftretendem Stress aktiviert bzw. reprimiert werden, oder Prozesse, die bereits vor der Stressbedingung aktiv/inaktiv sind und der Pflanze eine Voradaption darstellen. Sind diese Prozesse identifizierbar, können sie über die generierten SNP-Informationen direkt potentiellen Allelen zugeordnet werden. Um relevante, quantitativ beeinflusste Zielgene zu identifizieren, sah die Projektplanung bereits in der frühen Phase des Projekts die Analysen ausgewählter Genotypen per RNA-Seq vor. Über *exome capture* sollten dann Genotypen bzgl. ihres genetischen Profils durchmustert werden.

Ziel der RNA-Seq Analysen war, sowohl die allgemeine Ertragsleistung aber auch die Ertragsstabilität unter Stressbedingungen zu untersuchen. Auch hier wurde der Fokus auf Pflanzen gelegt, die unter Feldbedingungen aufwuchsen. Pleiotrope Effekte einer Klimakammer-Aufzucht sollten unbedingt vermieden werden. Die Ertragsdaten der ROS-Anzucht des ersten Projektjahres lieferten hier bereits gute Kandidaten für eine Auswahl zu untersuchender Genotypen. Die Ertragsdaten sowie die bis dahin analysierten Metabolite aus Blättern und reifen Körnern ermöglichten darüber hinaus zu entscheiden ob Blatt-, oder Kornproben analysiert werden sollten. Auch wenn die *Sink*-Stärke einen entscheidenden Einfluss auf den Ertrag haben kann, zeigte sich, dass stressinduzierte transkriptionelle Regulation im Korn in den hier getesteten Pflanzen womöglich ausbleibt, was beispielsweise sehr deutlich an der fehlenden Akkumulation der Tocochromanole in Körnern ablesbar ist (Abbildung 10). Somit wäre bei Betrachtung von Kornproben potentiell keine differentielle transkriptionelle Regulation in Körnern von trockengestressten Pflanzen aufdeckbar. Außerdem zeigte sich

durch Klimakammerversuche recht früh, dass es sehr schwierig ist, homogenes Material von wachsenden Körnern zu erhalten, die in einem ähnlichen Entwicklungsstadium sind. Dies kann wiederum auch recht deutlich durch die Betrachtung des Tocochromanol-Verlaufs in wachsenden Körnern abgeschätzt werden (Abbildung 11). Deshalb wurde beschlossen, Blattproben zu analysieren, da diese über eine längere Zeit in einem Gleichgewichtsstadium verweilen, sich nicht mehr aktiv teilen und somit bessere Vergleiche zwischen Genotypen ermöglichen. Da sich aufgrund anderer Analysen der Start der RNA-Seq Vorbereitung verzögerte, konnten letztlich noch die Pflanzen des zweiten ROS-Experiments in die Überlegungen mit einfließen. Wie bereits im Abschnitt 4.2.1 diskutiert, riefen die gesteigerten Temperaturen im zweiten Jahr Ertragseinbußen hervor. Aus der Literatur ist bekannt, dass Hitze einen sehr dominanten Einfluss auf das Transkriptom von Pflanzen hat. So konnte in *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gezeigt werden, dass die Anzahl der differentiell exprimierten Gene in Einzel- und kombinierten biotischen und abiotischen Stressszenarien immer dann groß ist, wenn Hitzestress appliziert wird [1]. Durch den Hitzestress werden die transkriptionellen Regulationen der anderen Stressszenarien überdeckt. Für die Betrachtung des Transkriptoms wurden deshalb die Proben der ROS-Anzucht 2017 ausgeschlossen. Die Befürchtung war, dass auch hier die hohen Temperaturen die Kontroll- und trockengestressten Pflanzen soweit beeinflussen, dass die Effekte des Trockenstresses nicht mehr dechiffrierbar sind, und alle Pflanzen nur auf den Hitzestress reagieren, und es so im Transkriptom keine Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und trockengestressten Pflanzen gibt.

Trotz der aktuellen Preisentwicklung war die Anzahl der möglichen Sequenzierreaktionen bei einem externen Sequenzieranbieter stark eingeschränkt. Um die Validität der Analysen zu maximieren, wurde eine Kumulierung der Mittel, die für RNA-Seq und *exome capture* vorgesehen waren, beschlossen und vom Projektträger bewilligt. Bei dem gewählten Sequenzieranbieter konnten somit acht Genotypen mit den jeweils angestrebten vier Replikaten pro Wachstumsbedingung per RNA-Seq analysiert werden.

Da die Ertragsstabilität im Vordergrund stand, wurden jeweils vier Genotypen mit hoher und niedriger Ertragsstabilität gewählt. Wie in Abbildung 13a zu erkennen ist, wurden *Escape*-Phänotypen mit sehr früher Kornreife nicht bearbeitet. Alle gewählten Genotypen befinden sich in einem sehr ähnlichen Entwicklungsstadium. Erwähnenswert ist, dass die als instabil definierten Sorten unter Kontrollbedingungen zunächst einen deutlich erhöhten Ertrag aufwiesen (Abbildung 13b). Unter Stressbedingungen war der Ertrag jedoch sogar geringer als in den als ertragsstabil definierten Sorten. Trotz der initial besseren Performance sind diese Genotypen nicht in der Lage einen höheren Ertrag aufrecht zu erhalten. Sie sind also sehr anfällig gegenüber Trockenstress.



**Abbildung 13:** Auswahl der Genotypen für RNASeq-Analysen. a) Der relative Ertrag (PIN Ertrag Trockenstress / Ertrag Kontrolle) = Ertragsstabilität von Gerstengenotypen gewachsen im ROS der LfL Freising im Jahr 2016 in Korrelation zum Zeitpunkt des Ährenschiebens. Die Korrelation zeigt, dass frühe Reife die Ertragsstabilität verbessern kann, da die Pflanzen weniger lange den Stress tolerieren müssen. Dies geht jedoch oft mit generell sehr niedrigen Erträgen einher. Es wurden acht ähnlich reifende Genotypen gewählt, vier, die unter Trockenstress eine hohe Ertragsstabilität aufwiesen (grün) und vier, die ertrags sensitiv sind (orange). b) Unter Kontrollbedingungen weisen die ertragsinstabilen Sorten einen erhöhten Ertrag auf (Aufteilung auf der x-Achse); unter Trockenstress kommt es zu so hohen Ertragseinbrüchen, dass sie sogar weniger Ertrag haben als die ertragsstabilen Sorten (Aufteilung auf der y-Achse). Sie reagieren also sehr anfällig auf Trockenstress.

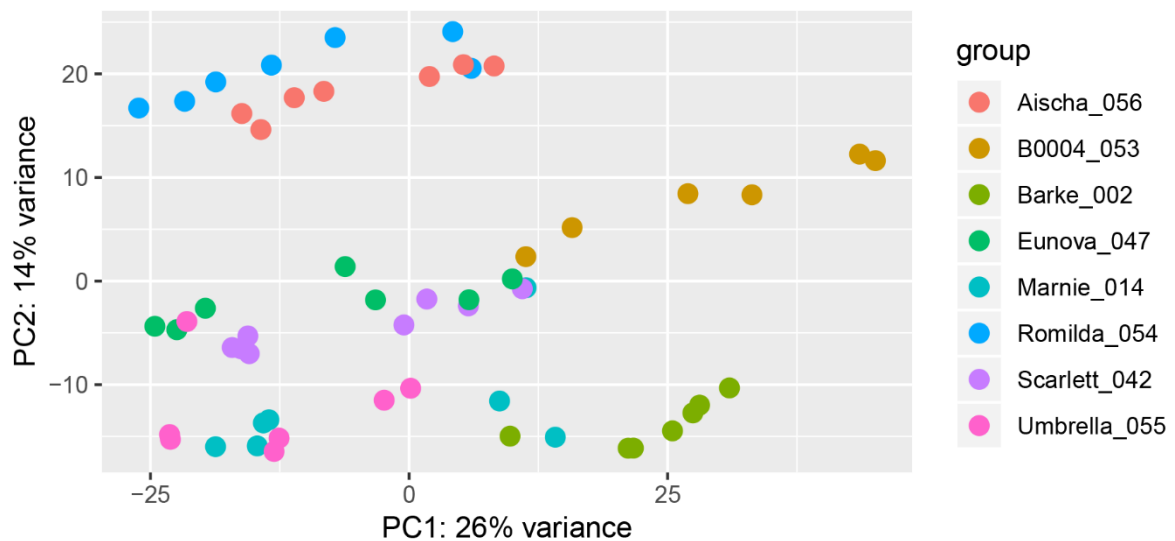
Um die geforderten Qualitätskriterien des externen Sequenzierdienstleisters zu erfüllen, wurde die Extraktion der Blatt RNA nach einer modifizierten Guanidinium-Thiocyanate-basierten Methode (adaptiert von [30]) mit zusätzlichen LiCl Fällungen durchgeführt. Die GATC Biotech AG, Konstanz (jetzt Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg) führte die weiteren Vorbereitungsschritte (*poly(A)-enrichment*, strang-spezifische Erstellung der cDNA *library*) und die letztliche Illumina *Paired-End* Sequenzierung mit einer *read*-Länge von 150bp bei mindestens 30 Millionen reads durch. Die Lieferung erfolgte in Form von FastQ-Dateien.

Um maximale Flexibilität bei der Auswertung der Daten zu haben, wurden die Daten anschließend nicht wie im Projektantrag vorgeschlagen in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Chris-Carolin Schön (TP02) und Manuel Spannagl (Helmholtz-Zentrum, München) analysiert. Eine intern bereits geschaffene Analyse-Plattform für RNAseq Daten wurde den speziesspezifischen Eigenschaften des Gerstengenoms angepasst. Dadurch besteht jederzeit die Möglichkeit die Analyse-Parameter nachträglich zu verändern, ohne auf externe Quellen angewiesen zu sein. Im Überblick stellte sich der bioinformatische Arbeitsablauf wie in Tabelle 3 gezeigt dar.

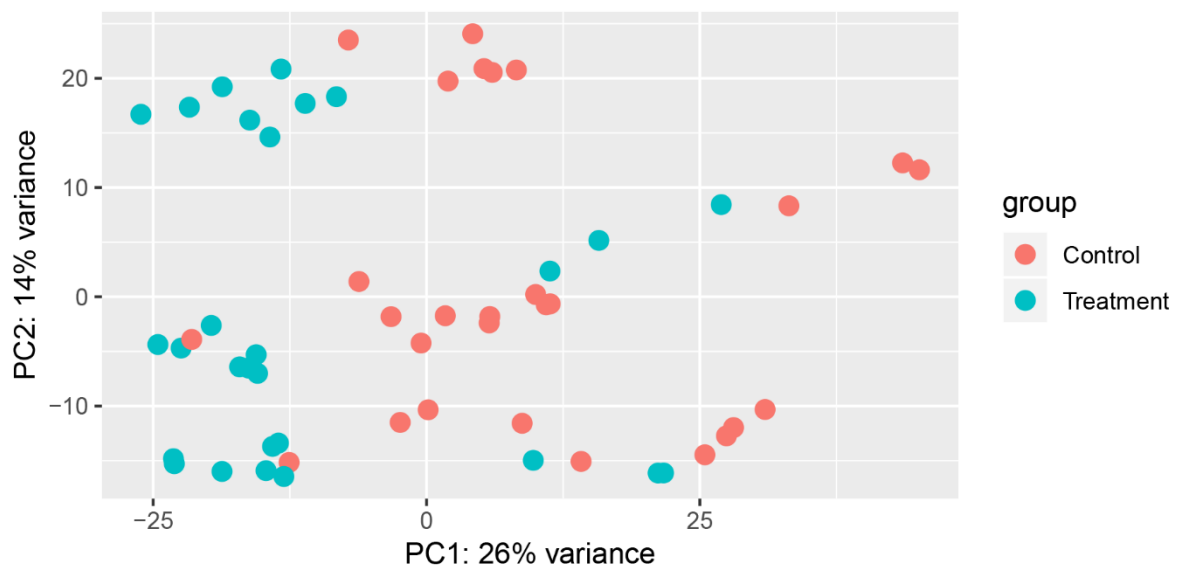
**Tabelle 3:** Analyse der differentiellen Genexpression auf Basis von RNASeq FastQ-Daten. Aktuelles Gersten-Referenzgenom [19], [20]. Der Input für den DESeq2-Algorithmus kann ein beliebiger morphologischer Parameter oder der Gehalt eines Metabolits sein. Hier können somit schnell neue Korrelationen entdeckt werden.

Arbeitsschritt	Programm + Beschreibung
Input	FastQ-Daten
Qualitäts- Check	<b>FastQC</b> (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Erkennt aufgrund der <i>tile</i> und <i>lane</i> Zuordnung aller <i>reads</i> systematische Probleme bei der Sequenzierung (z.B. Kratzer oder Unreinheiten auf dem Illumina Chip)</li> </ul>
Adapter- und Qualitäts- trimming	<b>Bduk</b> (auf MS-DOS Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Entfernt Sequenzieradapter und bibliothekspezifische Indexsequenzen</li> <li>- Entfernt Reads mit niedriger Qualität (FastQ und FastQC Qualität)</li> </ul>
Qualitätscheck	<b>FastQC</b> (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validierung des Trimmings</li> </ul>
Mapping	<b>STAR</b> (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mapping der einzelnen <i>reads</i> auf das aktuelle Morex-Referenzgenom</li> </ul>
Counting	<b>featureCounts of Subread</b> (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Für jeden vorhergesagten Genlokus des aktuellen Morex-Referenzgenoms werden die dort gemappten <i>reads</i> gezählt (<i>counts</i>)</li> </ul>
Mapping Vi- sualisierung und <i>count</i> Verifizierung	<b>IGV</b> (auf Java Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualisierung des Mappings aller <i>reads</i></li> <li>- Verifizierung des <i>Countings</i></li> <li>- Schneller visueller Zugang zu den SNP-Mustern der verschiedenen Genotypen (für Arbeitspaket 4)</li> </ul>
Expressions- Analyse	<b>DESeq2</b> (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Normalisiert die <i>read counts</i> auf Basis der <i>read</i>-Verteilung und Menge aller Gene und berechnet signifikante statistische Zusammenhänge zwischen den normalisierten <i>read counts</i> und den zu analysierenden Parametern, die als Input gesetzt werden</li> </ul>

Die Betrachtung der Daten gestaltete sich aufgrund der Größe des Datensatzes als herausfordernd. Eine Hauptkomponentenanalyse (engl. *PCA*) zeigte jedoch, dass eine deutliche Ordnung im Datensatz vorhanden ist (Abbildung 14 bis Abbildung 17). So gruppieren bei Analyse der normalisierten *counts* aller annotierten Gene die einzelnen Replikate jedes Genotyps jeweils auf eine lineare Weise (Abbildung 14).



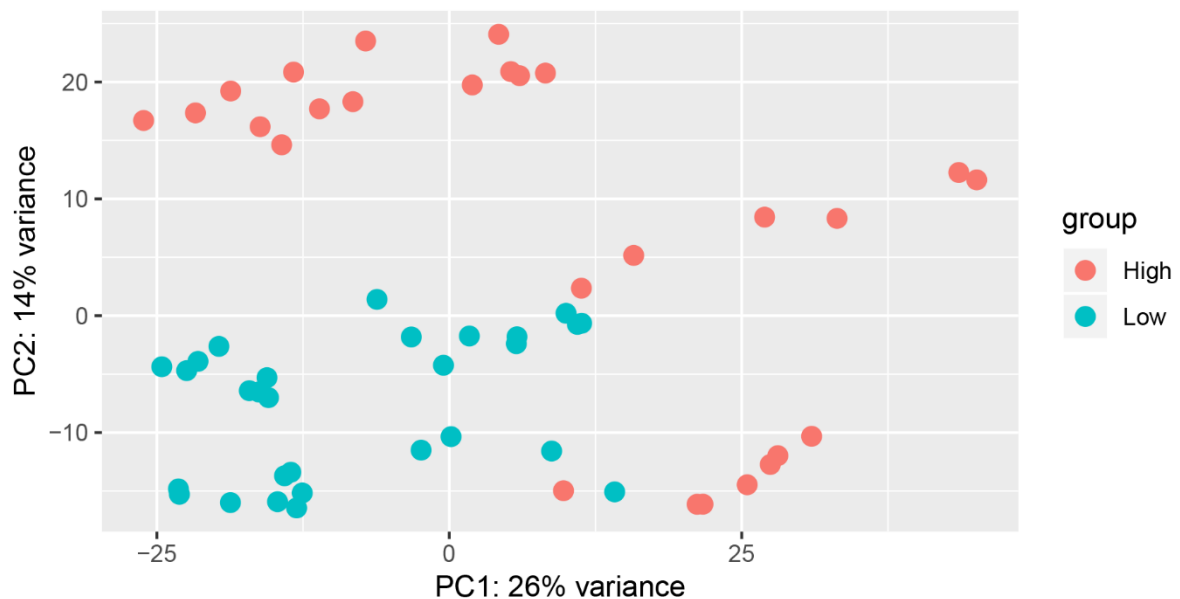
**Abbildung 14.** Hauptkomponentenanalyse aller normalisierten RNASeq-counts für alle Proben. Hauptkomponente 1 (PC1) erklärt 26% der gesamten im Datensatz vorhandenen Varianz. Hauptkomponente 2 (PC2) erklärt weiter 14% der gesamten im Datensatz vorhandenen Varianz. Die einzelnen Proben wurden entsprechend des Genotyps eingefärbt.



**Abbildung 15:** Identische PCA wie in Abbildung 14. Hier wurden lediglich die einzelnen Proben entsprechend der Wachstumsbedingung eingefärbt. Control = Kontrollbedingung, Treatment = Trockenstress.

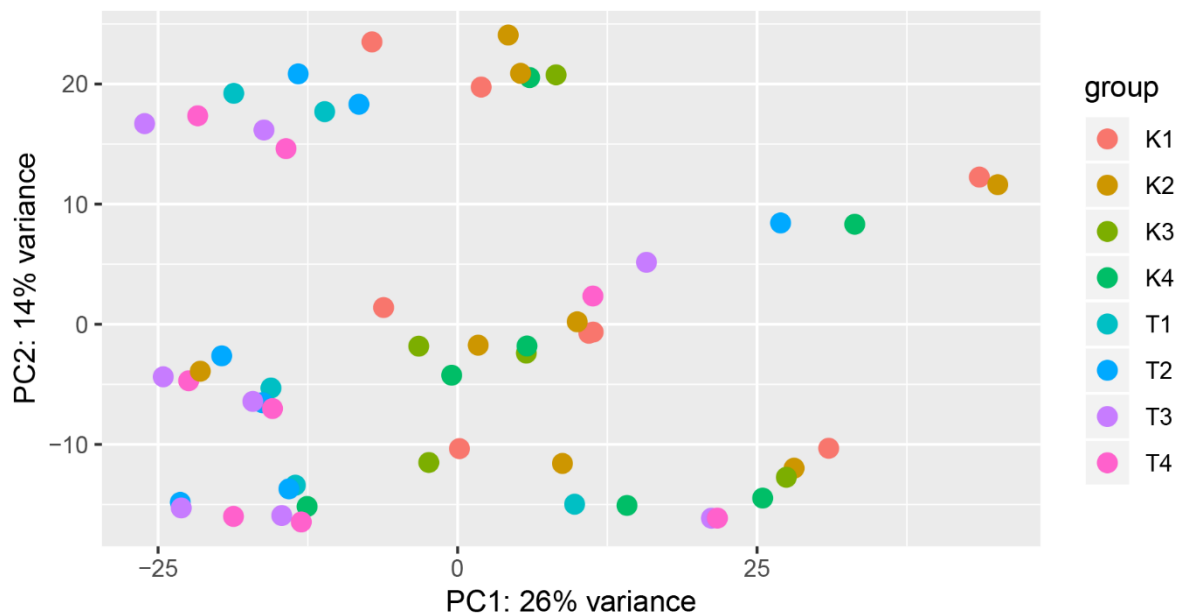
Dabei gruppieren innerhalb jeden Genotyps jeweils die Replikate der trockengestressten Pflanzen und die Replikate der Kontrollpflanzen (Abbildung 15). Darüber hinaus gibt es eine deutliche Trennung zwischen Sorten die zuvor als hoch- und Sorten die als niedrig-ertragsstabil definiert wurden (Abbildung 16). Hier trennt die Hauptkomponenten 1 (PC1) zunächst die Sorten Barke und B0004 von den übrigen 6 Sorten ab. Dann trennt die Hauptkomponente 2 (PC2) die beiden übrigen hochertragsstabilen Sorten Romilda und Aischa von

den niedrigerertragsstabilen Sorten ab. Zusätzlich trennt die Hauptkomponente 2 noch die Sorten Barke und B0004.



**Abbildung 16** Identische PCA wie in Abbildung 14. Hier wurden lediglich die einzelnen Proben entsprechend der Klassifizierung der Ertragsstabilität eingefärbt (siehe auch Abbildung 13). High = stabiler Ertrag unter Trockenstress, Low = instabiler Ertrag unter Trockenstress.

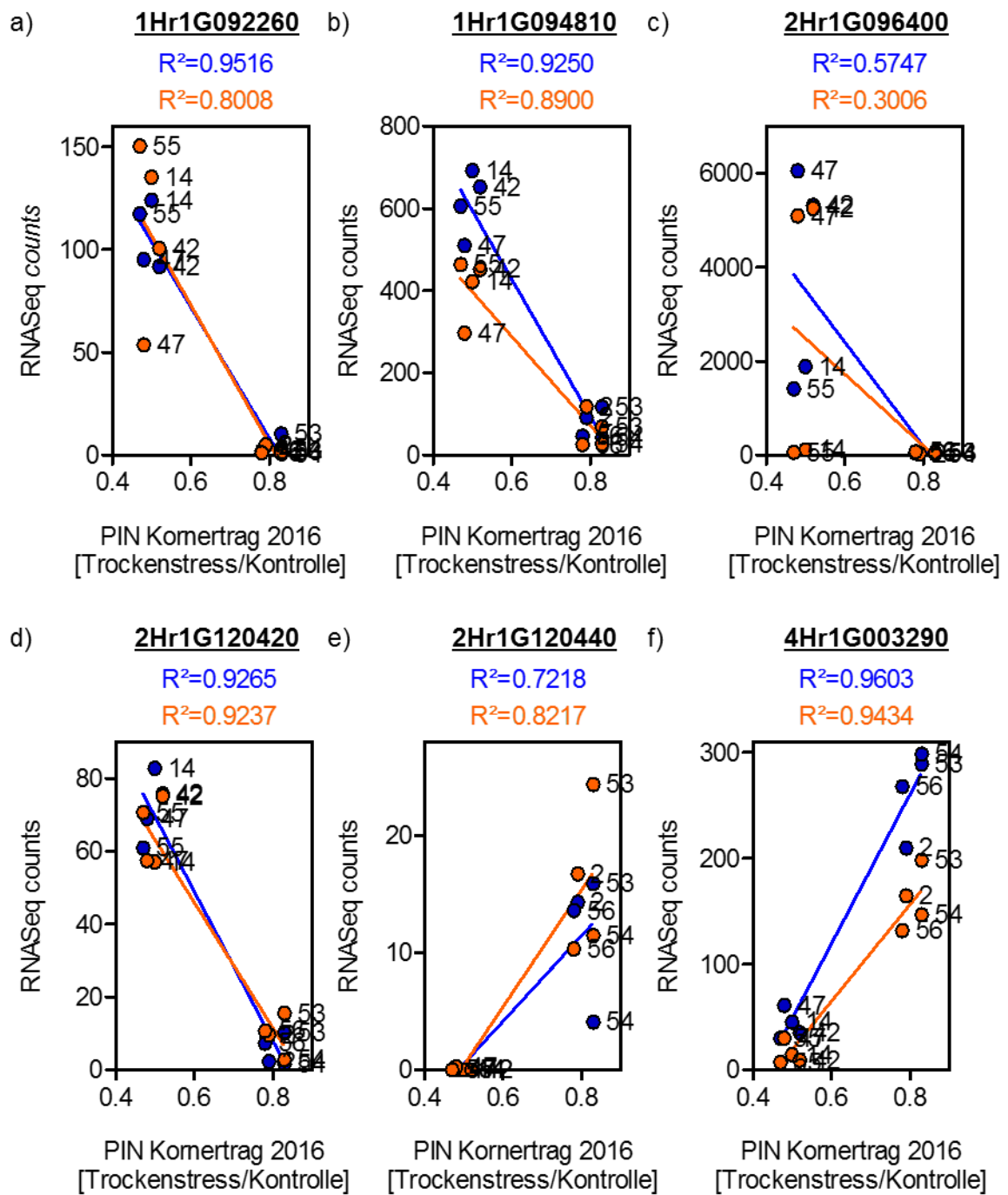
Dies lässt zunächst die einfache Interpretation zu, dass bereits 40% der Varianz im gesamten Transkriptom die regulatorischen Unterschiede zwischen ertragsstabilen und -instabilen Sorten erklären. Darüber hinaus gibt es innerhalb der ertragsstabilen Sorten mindestens zwei unterschiedliche globale Transkriptom-Profile. Das erste, das durch die PC1 und das zweite, das durch die PC2 abgetrennt wird (Abbildung 16). Die Sorte B0004 trennt sich dabei in beiden Hauptkomponenten von den übrigen 3 ertragsstabilen Sorten. Hier könnte es bereits zu einer züchterischen Kombination beider Profile gekommen sein. Letztlich erfolgte noch die Betrachtung nach Beprobungszeitpunkten. Bei der Beprobung aller 56 Genotypen im ROS wurde zunächst für alle Genotypen Kontrollreplikate 1 beprobt. Erst danach wurde Trockenreplikate 1 für alle Genotypen beprobt, gefolgt von den übrigen Replikaten immer im Wechsel, Kontrolle gefolgt von Trocken. Auf Grund der Probenfülle konnte ein Beprobungszeitfenster von einem gesamten Nachmittag nicht vermieden werden. Jedoch wurde der Einfluss der Tageszeit möglichst gleichmäßig auf alle Genotypen und beide Wachstumsbedingungen verteilt. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist scheint der Probennahmezeitpunkt ein entscheidender Faktor für die lineare Auftrennung der einzelnen Replikate innerhalb jedes Genotyps entlang der PC1 zu sein, da je Bedingung die ersten Replikate hin zu den letzten Replikaten in Richtung der PC1 von rechts nach links geladen werden.



**Abbildung 17:** Identische PCA wie in Abbildung 14. Hier wurden lediglich die einzelnen Proben entsprechend der Replikate gefärbt. K = Kontrolle, T = Trockenstress. Probenahme erfolgte in Reihenfolge K1 > T1 > K2 > T2 > K3 > T3 > K4 > T4.

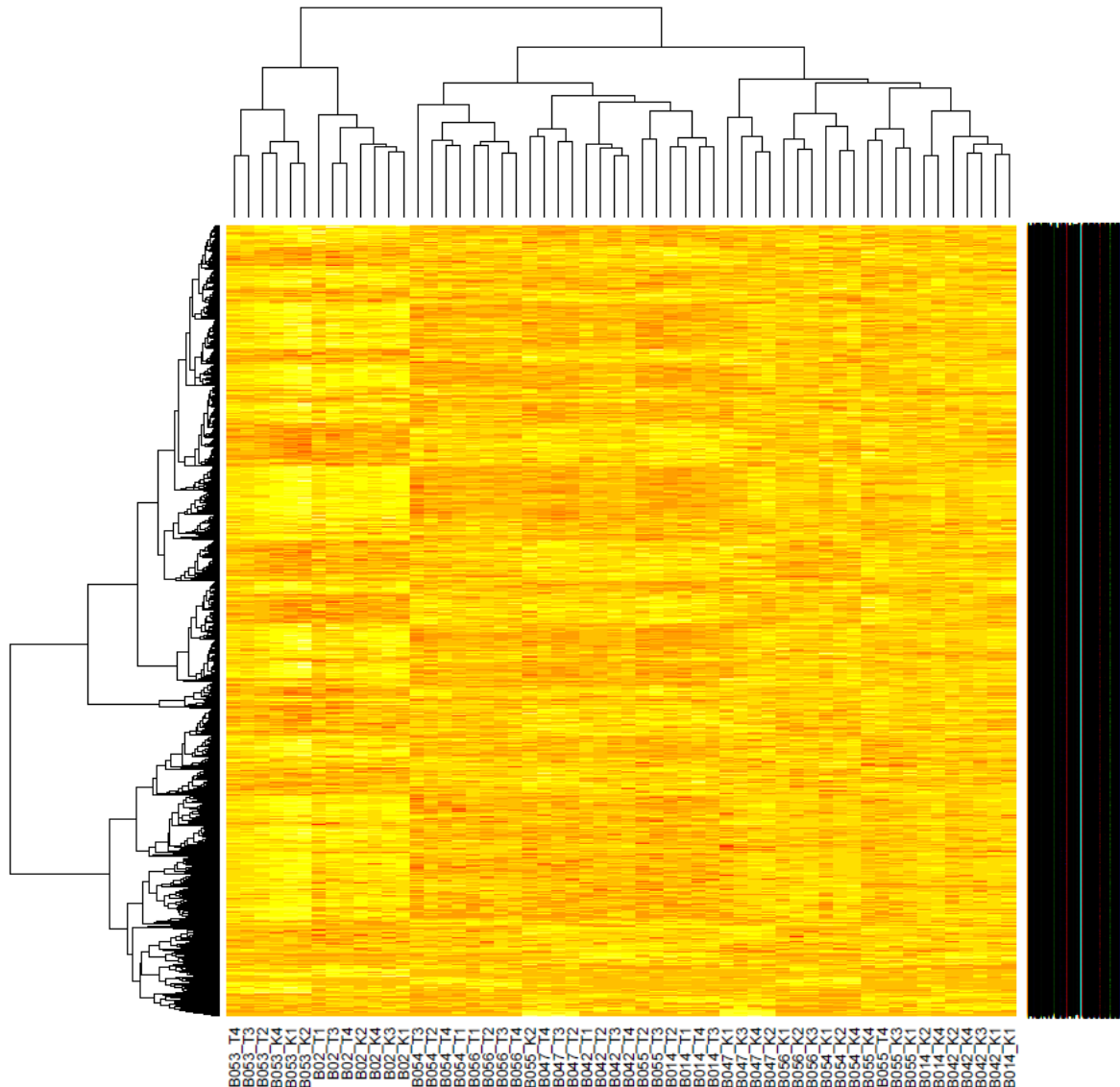
#### 4.2.5.2 Differenziell exprimierte Gene in Korrelation zum Ertragsverlust

Anschließend folgte die Analyse der differentiellen Genexpression. Der DESeq2-Algorithmus normalisiert dabei die *counts* und berechnet Korrelationen zu gewünschten Input Parametern. Zunächst wurde die Ertragsstabilität als Input gesetzt. Von den 39.735 im aktuellen Gerstenreferenzgenom ([19], [20]) postulierten Genorten konnten lediglich für 27.755 Gene eindeutig kartierte *reads* gefunden werden (*counts*). Die übrigen weisen demnach keine Expression auf, bzw. es konnten ihnen nicht eindeutig *reads* zugewiesen werden. Von den 27.755 zeigen 5.055 eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Korrelation der normalisierten *counts* zur Ertragsstabilität (%). Abbildung 18 zeigt dabei beispielhaft sechs Gene deren *count*-Zahl signifikant mit der Ertragsstabilität korreliert. Dabei gibt es solche, die in ertragssensitiven Sorten stark exprimiert werden (Abbildung 18a,b,c,d) und solche, die in ertragsrobusten Sorten stark exprimiert werden (Abbildung 18e,f). Der DESeq2-Algorithmus detektiert dabei auch Gene die nicht für alle Genotypen einer Kohorte stark korrelieren (Abbildung 18b). Demnach können trotz genotypspezifischer Ausnahmen Gene identifiziert werden, die aufgrund der klaren Aufteilung der übrigen Genotypen mit Ertragsstabilität korrelieren. Diese sechs dargestellten Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung. Aufgrund der großen Anzahl der differentiell exprimierten und korrelierten Gene sind zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussagen über mögliche Zielgene möglich. Hier müssen zunächst weitere bioinformatische Analysen zeigen, ob die Daten weitere inhärente Strukturen aufweisen. Festzustellen ist, dass die hier gezeigten Beispiele auf eine Voradaptation der Pflanzen hinweisen. Die Gene sind unabhängig von der Wachstumsbedingung mit der Ertragsstabilität korreliert. D.h. sie werden nicht erst bei Trockenstress aktiviert/reprimiert.



**Abbildung 18:** Durch den DESeq2-Algorithmus identifizierte Genen, deren RNaseq-counts mit Ertragsstabilität (PIN Ertrag) korrelieren. Für die hier gezeigten Gene trifft dies sowohl auf die Transkriptmenge von Pflanzen zu, die unter Kontroll- (blau) als auch unter Trockenstressbedingungen (orange) gewachsen sind. Nummerierung der Sorten entsprechend der Sortenkollektion des Projektverbundes. Die hier gezeigten Gene dienen lediglich der Veranschaulichung der Analyseparameter. Die biologische Relevanz dieser und anderer Zielgene muss noch untersucht werden.

Ein erster Ansatzpunkt wird hier die manuelle Betrachtung von Clusteranalysen wie die in Abbildung 19 dargestellte Heatmap sein. Anhand einer Farbskala ist die Expression aller 5.055 durch den DESeq2-Algorithmus detektierten differentiell exprimierten Gene zu sehen. Die einzelnen Proben wurden dabei anhand des Transkriptprofils dieser 5.055 Gene geclustert. Deutlich zu sehen ist dabei, dass die beiden Genotypen, die bereits in der PCA aller (!) Transkripte durch die PC1 von den anderen Genotypen getrennt wurden (Abbildung 14ff) (BF\_053 = B0004; BF\_002 = Barke) auch hier ein getrenntes Cluster bilden (Abbildung 19). Das bedeutet, dass diejenigen Gene, die durch den DESeq2 Algorithmus als differentiell exprimiert in Bezug auf die Ertragsstabilität identifiziert wurden, wahrscheinlich bereits einen sehr großen Anteil am Clustering des gesamten Transkriptprofils (PCA Abbildung 14ff) hatten. Analog hatten die Gene, die nicht differentiell transkriptionell reguliert sind, am Clustering der Sorten in der PCA wahrscheinlich keinen Anteil. Diese deutlichen Parallelen unterstreichen die Potenz des Datensatzes. Letztlich werden nur wenig Gene für das Clustering aller Proben verantwortlich sein. Im Bezug auf die Fragestellung sind das diejenigen, die die Ertragsstabilität am besten erklären. Hier wird auch die genauere Betrachtung der einzelnen Cluster eine Rolle spielen. Wie zu erkennen ist, sind einige Gencluster in den Genotypen B0004 und Barke genau invers zu den anderen Sorten transkriptionell reguliert. Womöglich häufen sich Gene bestimmter Stoffwechselwege vermehrt in einzelnen Clustern. Diese Co-Regulation wird Aufschluss über mögliche regulatorische Netzwerke geben können. Auf Grund der deutlichen transkriptionellen Trennung der verschiedenen Ertragskohorten und der generellen Qualität der Sequenzdatensätze werden die Erfolgsaussichten als sehr hoch eingeschätzt, neue Zielprozesse identifizieren zu können, die den Pflanzen helfen die klimawandelbedingten Stressszenarien zu überstehen. Die zu Beginn gesetzten Projektziele wurden demnach erreicht.



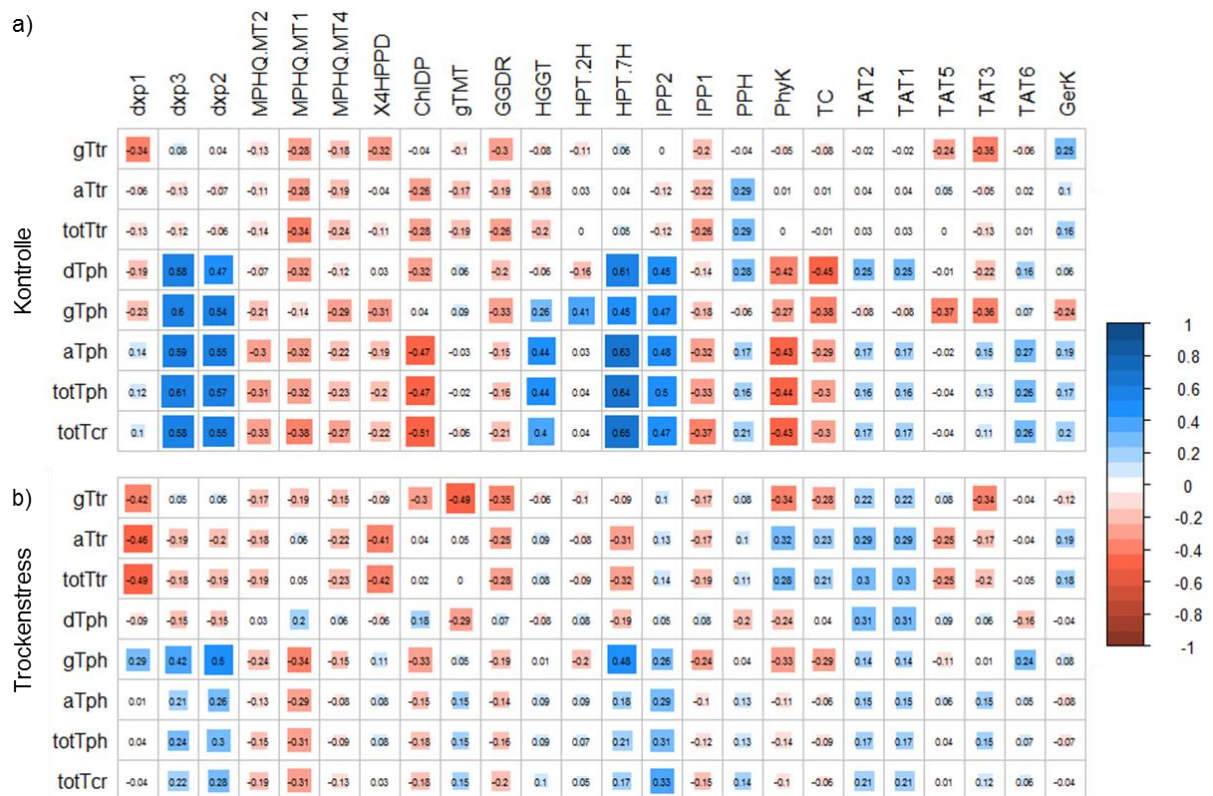
**Abbildung 19** Heatmap einer hierarchischen Clusteranalyse der durch den DESeq2-Algorithmus identifizierten 5.055 Transkripte, die mit der prozentualen Ertragsstabilität korrelieren. Die RNASeq-count-Anzahl jedes Gens wird durch die Farbcodierung rot (hoch) bis gelb (niedrig) repräsentiert. Auf Grund der errechneten Distanz clustern im Dendrogramm oben die einzelnen RNASeq-Proben (Beschriftung unten). Im Dendrogramm links ist die Clusteraufteilung der Gene (Beschriftung rechts) abgebildet. Die Probennummer entspricht der Nummerierung der Genotypen in der Sortenkollektion des Projektverbundes. K: Kontrolle, T: Trockenstress.

#### 4.2.5.3 Gezielte Analysen vordefinierter Zielprozesse

Neben den globalen quantitativen statistischen Korrelationsanalysen, die in Abschnitt 4.2.5.2 behandelt wurden, können die RNASeq-counts auch für die Betrachtung von bereits annotierten Stoffwechselwegen herangezogen werden, wie es für den Meilenstein 3 der Projektplanung vorgesehen ist.

#### 4.2.5.3.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt

Für die RNASeq-*counts* der in Abbildung 5 dargestellten Gene der Tocochromanol-Biosynthese wurden Korrelationen zu den Blatt-Tocochromanolgehalten berechnet. Die Berechnung erfolgte getrennt für beide Wachstumsbedingungen (Abbildung 20). Unter Kontrollbedingungen konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge von drei Genen (*dxp1*, *dxp2*, *IPP2*) des Methylerythritolphosphatwegs (DOXP-Weg) und dem Gehalt aller gemessenen Tocopherol-Isoformen gefunden werden (Abbildung 20a). Der DOXP-Weg ist eine Quelle der Prenyl-Verbindungen, die für die Tocopherol-Biosynthese benötigt werden. In Mais wurde über RNAseq-Analysen bereits eine positive Korrelation für die Transkriptmenge einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (*dxp*) und dem Vitamin E-Gehalt identifiziert [31]. Für einen quantitativen Einfluss einer Isopentenyl Diphosphate Isomerase (IPP) auf den Vitamin E-Gehalt konnten bis jetzt keine Hinweise gefunden werden. Eine Chlorophyll Dephytylase (ChIDP) und eine Phytyl Kinase (PhyK = *vte5*) zeigten negative Korrelationen. In seneszenten *Arabidopsis*-Blättern konnte für diese Enzyme eine Beteiligung beim Prenyl-Recycling während des Chlorophyllabbaus hin zur Tocopherol-Biosynthese nachgewiesen werden [32]. In nicht seneszenten Blättern ist dieser Biosyntheseweg offenbar nicht für die Tocopherol-Biosynthese relevant. Wie in Abschnitt 4.3.1 berichtet wird, konnte bereits über gezielte qPCR-Analysen ein positiver Einfluss des HPT-7H-Transkriptlevels auf den Tocopherolgehalt nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen wurden demnach hier validiert. Für die Tocotrienole wurden keine starken Korrelationen identifiziert. Diese sind im Blatt jedoch auch nur in Spuren vorhanden und haben fast keinen Anteil am gesamten Tocochromanolgehalt. Unter Trockenstress korrelieren nur eine der *dxp*-Isoformen und die *HPT-7H* mit dem Gehalt an  $\gamma$ -Tocopherol (Abbildung 20b). Der stressinduzierte Anstieg des Tocopherolgehalts scheint zu einem gewissen Anteil also nicht nur von der *HPT-7H* sondern auch von dem *dxp2*-Gen vermittelt zu werden (siehe auch Abschnitt 4.3.1).

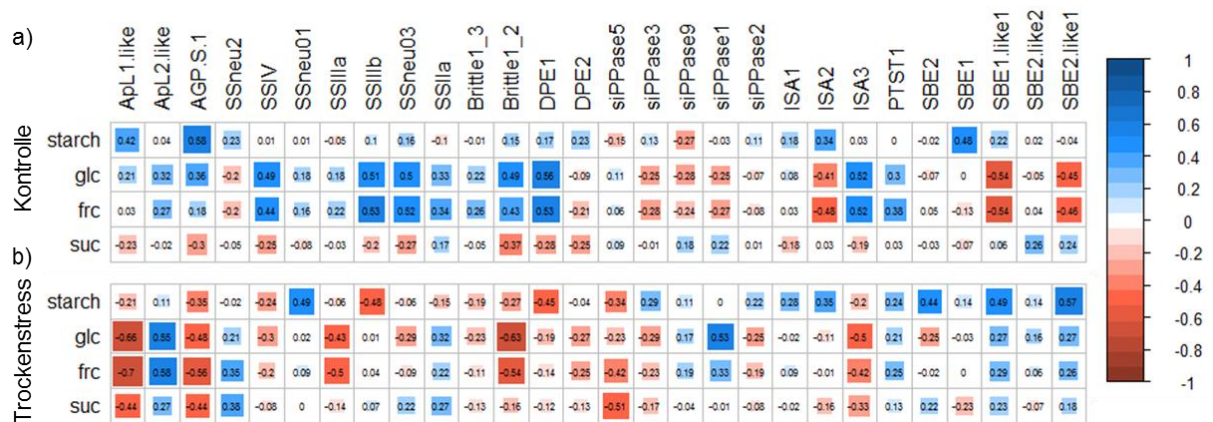


**Abbildung 20** Korrelationsmatrix für ausgewählte Gene der Tocopherolbiosynthese. Getrennt für a) Kontrollbedingungen und b) Trockenstress wurden die RNASeq-counts der gezeigten Gene (oben) mit den Tocochromanolgehalten (rechts) korreliert. Die Genabkürzungen entsprechen denen in Abbildung 5. gTtr:  $\gamma$ -Tocotrienol, aTtr:  $\alpha$ -Tocotrienol, totTtr: gesamt Tocotrienol, dTph:  $\delta$ -Tocopherol, gTph:  $\gamma$ -Tocopherol, aTph:  $\alpha$ -Tocopherol, totTph: gesamt Tocopherol, totTcr: gesamt Tocochromanol. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson werden dabei auch anhand der Farbskala rechts und der Größe des farbigen Quadrates repräsentiert.

#### 4.2.5.3.2 Der Stärke- und Saccharose-Metabolismus im Blatt

Während der Fluss von Photoassimilaten im Korn hauptsächlich von der importierten Saccharose hin zur Stärke gerichtet ist, ist die Verteilung im Blatt anders reguliert. Während Saccharose kontinuierlich synthetisiert und für den Transport durch die Leitgewebe exportiert wird, wird Stärke im Verlauf des Tages lediglich in Form von transitorischer Stärke aufgebaut, um nachts für die Energiegewinnung und die Synthese von Saccharose wieder abgebaut zu werden. Somit kann ein effizienter Aufbau von Saccharose für die Versorgung der Körner relevant sein. Ist hingegen der Aufbau der transitorischen Stärke tagsüber eingeschränkt, steht den Blättern nachts nicht genug Energie für einen ausreichenden Saccharose-Export zur Verfügung, was ebenso Ertragseinbußen zur Folge haben kann. Demnach ist für gleichmäßiges Kornwachstum tagsüber eine effiziente Verteilung der Photoassimilate im Blatt wichtig. Abbildung 21 zeigt die Korrelationsfaktoren einiger wichtiger bei der Stärke-Biosynthese beteiligten Gene zum Blattstärke-Gehalt und zu den freien Zuckern Glukose,

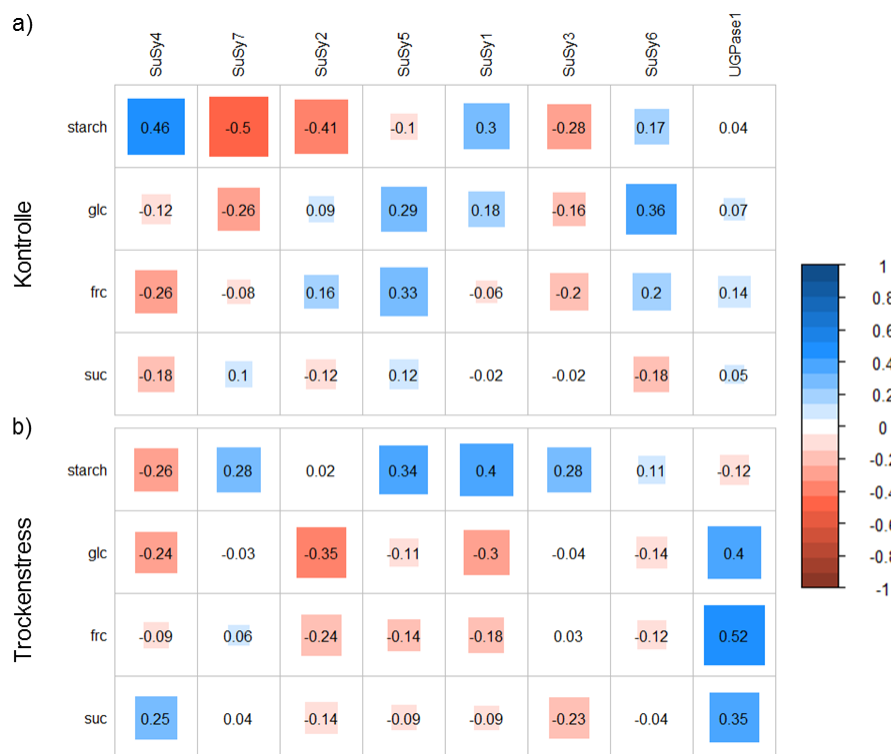
Fruktose und Saccharose. Analog zeigt Abbildung 22 Korrelationen von Genen, die bei der Saccharose-Biosynthese beteiligt sind.



**Abbildung 21:** Korrelationsmatrix für ausgewählte Gene der Stärkebiosynthese. Getrennt für a) Kontrollbedingungen und b) Trockenstress wurden die RNASeq-counts der gezeigten Gene (oben) mit dem Gehalt an Stärke (starch), Glukose (glc), Fruktose (frc) und Saccharose (suc) korreliert. ApL und AGP: Isoformen der AGPase, SS: Isoformen der löslichen Stärkesynthesen, DPE: Disproportionating enzyme, siPPase: anorganische lösliche Pyrophosphatasen, ISA; Isoamylasen, PTST: Protein Targeting To Starch, SBE: stärkeverzweigende Enzyme. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson werden dabei auch anhand der Farbskala rechts und der Größe des farbigen Quadrates repräsentiert.

Die Transkriptmengen der kleinen Untereinheit S1 der AGPase (AGP.S.1) und der großen Untereinheit ApL1-like zeigen zusammen mit einem stärkeverzweigenden Enzym (SBE1) eine positive Korrelation zum Stärkegehalt unter Kontrollbedingungen (Abbildung 21a). Unter Stressbedingungen zeigen drei andere stärkeverzweigende Enzyme und eine lösliche Stärkesynthase eine positive, eine Glucanotransferase (DPE1) und eine andere lösliche Stärkesynthase eine negative Korrelation (Abbildung 21b). Bei Betrachtung der transkriptionellen Regulation der Saccharosesynthesen fällt auf, dass diese keinen Einfluss auf den Saccharosegehalt hat (Abbildung 22). Jedoch hat die transkriptionelle Regulation zweier Saccharosesynthesen unter Kontrollbedingungen einen Einfluss auf den Stärkegehalt (Abbildung 22a). In Kombination lässt sich an dieser Stelle die Hypothese aufstellen, dass der Saccharosegehalt des Blattes womöglich deshalb nicht mit der transkriptionellen Regulation der Saccharosesynthase-Gene zusammenhängt, da er hauptsächlich durch die Exportrate der Saccharose bestimmt wird. Hier könnte die transkriptionelle Regulation der bis jetzt schlecht kartierten Klasse der Zuckertransport-Gene Aufschluss geben. Die negative Korrelation der Saccharosesynthesen mit dem Stärkegehalt (Abbildung 22a) könnte auf einen kompetitiven Mechanismus der Assimilatverteilung zwischen Stärke- und Saccharoseaufbau hinweisen. Unter Kontrollbedingungen wird das Verhältnis dabei von den Saccharosesynthesen hin zur Saccharose-Biosynthese verschoben, was negative Auswirkungen auf den Stärkegehalt hat (Abbildung 22a). Unter Stressbedingungen veranlassen hingegen die AGPasen eine Verschiebung weg vom Saccharoseaufbau (Abbildung 21b). Für den Stärkegehalt wird auch die

genauere Betrachtung der am Stärkeabbau beteiligten Enzyme eine entscheidende Rolle für mögliche Interpretationsmöglichkeiten spielen. In diese initialen Überlegungen flossen noch nicht die durch den Tagesverlauf verursachten Effekte ein, die bereits in Abschnitt 4.2.5.1 diskutiert wurden, und Auswirkungen vor allem auf den Gehalt der transitorischen Stärke und der Stärke-Biosynthese-Gene haben können.



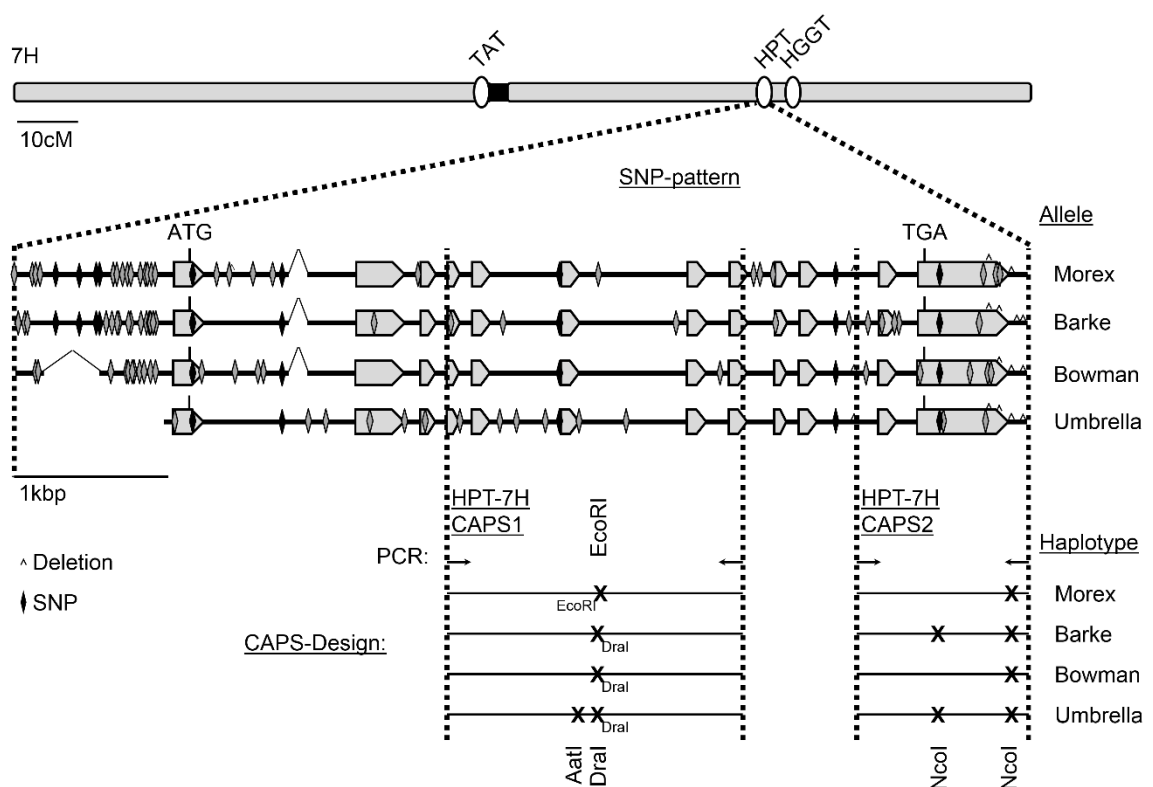
**Abbildung 22:** Korrelationsmatrix für ausgewählte Gene der Saccharose-Biosynthese. Getrennt für a) Kontrollbedingungen und b) Trockenstress wurden die RNASeq-counts der gezeigten Gene (oben) mit dem Gehalt an Stärke (starch), Glukose (glc), Fruktose (frc) und Saccharose (suc) korreliert. SuSy: Saccharose-Synthase, UGPase: UDP-Glucose Pyrophosphorylase. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson werden dabei auch anhand der Farbskala rechts und der Größe des farbigen Quadrates repräsentiert.

Durch die Zuordnung der Genexpression der zu Beginn festgelegten Zielprozesse konnte ein wichtiger Schritt für das Erreichen des Meilensteins 3 der Projektplanung gemacht werden. Die Zuordnung der Allele ist in Abschnitt 4.3.5 beschrieben.

### 4.3 Arbeitspaket 3: Identifizierung von Allelen, die erhöhte Ertragsstabilität unter Stress vermitteln

#### 4.3.1 Die Tocopherol-Biosynthese im Blatt

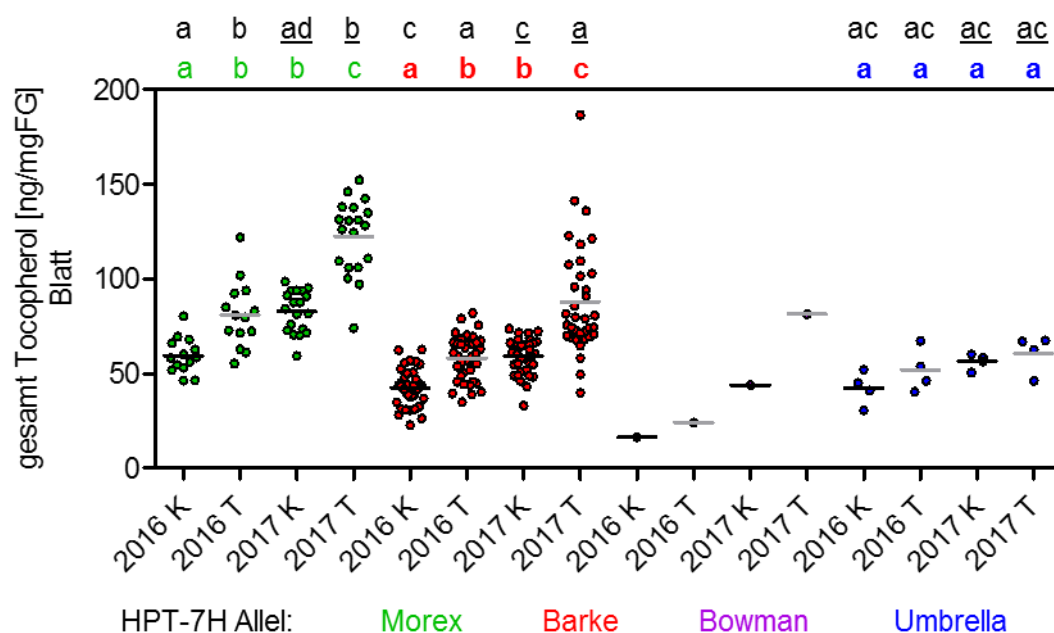
Die Relevanz gesteigerter Tocochromanolwerte wurde bereits in Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2 diskutiert. Die assoziationsgenetischen Studien des CLIMATE CHANGE Vorprojekts (Abbildung 2) ließen vermuten, dass allelische Variationen der HPT-7H den Tocopherolgehalt im Blatt beeinflussen [9]. Auf Basis der Sequenzinformationen der WGS\_Contigs der drei Gerstenkultivare Morex, Barke und Bowman wurden gezielt Abschnitte des Genlokus mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Dafür wurde zunächst die Sequenzvariabilität dieser drei Kultivare validiert. Auf Basis der Tocopherol-Akkumulation wurden weitere 12 Sorten ebenso gezielt sequenziert. Ein drittes, bis dahin unbekanntes Allel, konnte identifiziert werden und wurde entsprechend einem der Genotypen benannt, in denen es gefunden wurde (Umbrella). Auf Basis der Sequenzinformationen konnten CAPS-Marker abgeleitet werden, die zur schnellen und kostengünstigen Durchmusterung der übrigen Sorten der Sortenkollektion genutzt werden konnten (Abbildung 23).



**Abbildung 23** Design eines HPT-7H CAPS-Markers. Der genomische Lokus der HPT auf Chromosom 7H wurde schrittweise per PCR amplifiziert und sequenziert. Auf Grund der SNP-Muster konnten vier Allele identifiziert werden. Graue Balken stellen Exon-Bereich dar. Rauten markieren die Position von SNP-Austauschen eines Allels im Vergleich zu den anderen

Allelen. Zirkumflexe markieren Deletionen. Anhand von drei SNPs entstehen in den Allelen Restriktionsenzymchnittstellen in einer für jedes Allel eindeutigen Kombination. Nach Amplifikation des definierten Bereichs gibt die enzymespezifische Verdaubarkeit der PCR-Fragmente Aufschluss über die ursprüngliche Kombination der SNP-Muster im Genom einer Gerstensorte (CAPS-Marker).

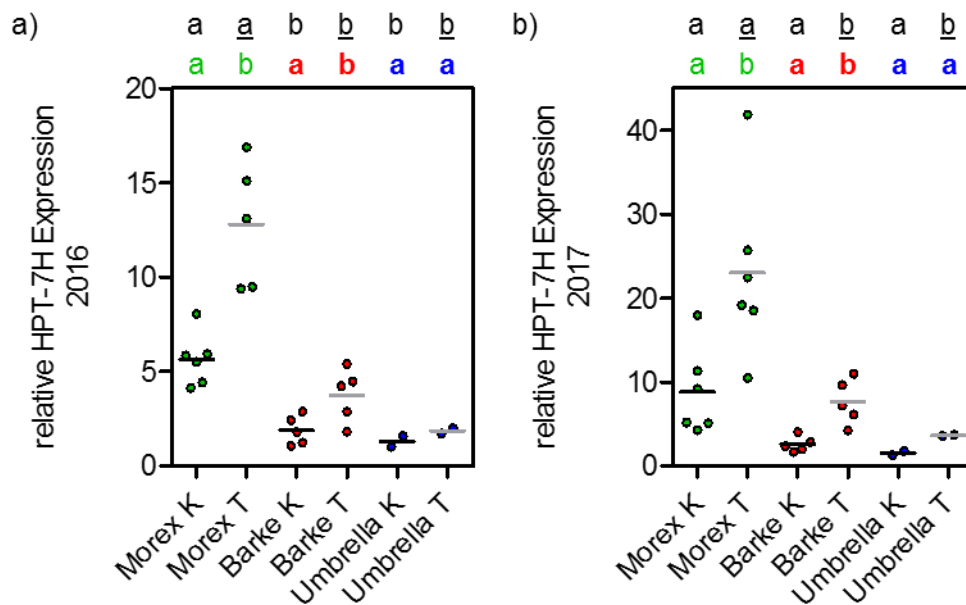
Bei Aufteilung der Tocopherol-Messwerte beider ROS-Anzuchten (Abbildung 7a) auf Basis der Allelzuordnung wurde schnell ersichtlich, dass das Morex Allele mit den höchsten Tocopherolwerten in Verbindung gebracht werden kann (Abbildung 24). Die anderen Allele sind dementsprechend mit niedrigeren Tocopherolgehalten verknüpft. Diese klare Aufteilung nach genetischer Komponente ist ein deutliches Indiz für die genetische Kopplung, die in den assoziationsgenetischen Studien identifiziert wurde. Die Analyse der SNP-Muster innerhalb des Promotorbereichs sowie der Exon- und Intronsequenzen erlaubte die Vermutung, dass nicht die Genqualität, sondern Quantität einen großen Einfluss auf die Tocopherolbiosynthese hat, denn das Morex und das Umbrella Allel sind trotz gleicher Proteinsequenz mit deutlich unterschiedlichen Tocopherolgehalten verknüpft.



**Abbildung 24:** Über CAPS-Marker wurden den Genotypen der Sortenkollektion HPT-7H Allele zugewiesen. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Sorte. Die Pflanzen wuchsen in den Jahren 2016 und 2017 unter Kontrollbedingungen (K) und unter Trockenstress (T) in einem ROS der LfL Freising. Die Signifikanzniveaus wurden in einer Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Dabei wurde auf signifikante Unterschiede innerhalb der Allele (farbig markiert) und innerhalb der beiden Versuchsjahre 2016 und 2017 (unterstrichen) getestet. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) werden durch ungleiche Buchstaben repräsentiert. Für die eine

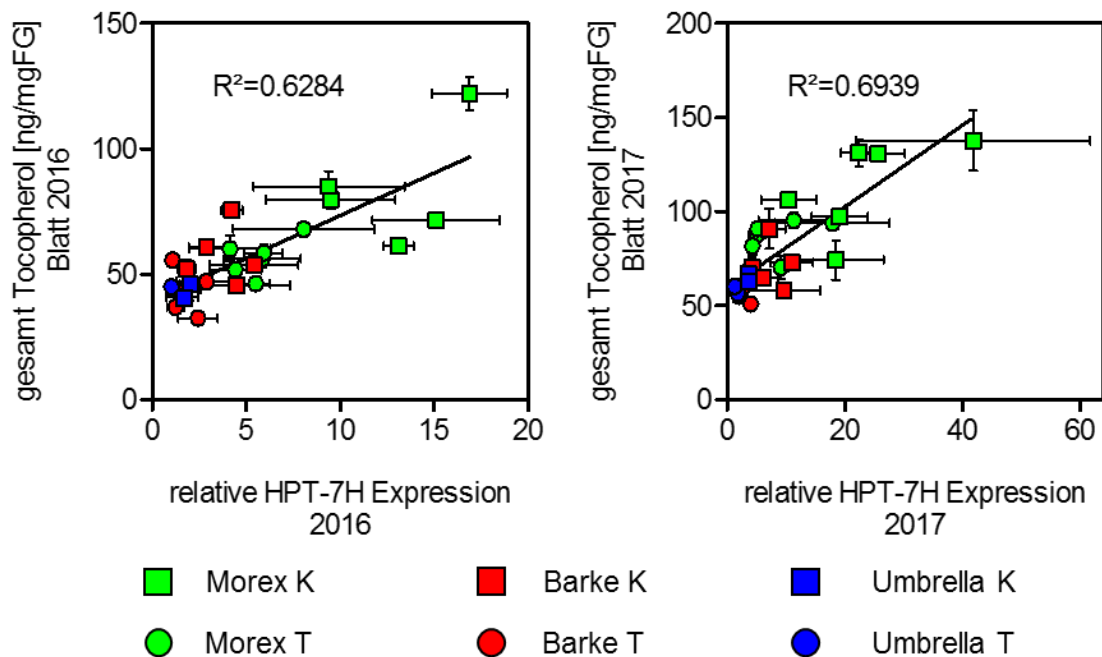
Sorte die das Bowman-Allel trägt konnte keine Varianzanalyse durchgeführt werden.

Gezielt wurde deshalb die Transkriptmenge der HPT-7H mittels qPCR in den 12 zuvor sequenzierten Sorten bestimmt. In beiden ROS-Experimenten konnte ein deutlicher Anstieg der HPT-7H Expression unter Trockenstress detektiert werden (Abbildung 25). Dabei zeigten ähnlich wie bei den Tocopherolgehalten die Sorten mit dem Morex-Allel die höchsten Werte. Das Umbrella-Allel wies dabei die niedrigste basale Expression und den niedrigsten stress-induzierten Anstieg an Tocopherol auf.



**Abbildung 25:** Mittels qPCR wurde in 12 ausgewählten Genotypen im Jahr a) 2016 und b) 2017 die Transkriptmenge der HPT-7H in Pflanzen bestimmt, die unter Kontrollbedingungen (K) und Trockenstress (T) aufwuchsen. Die Signifikanzniveaus wurden in einer ANOVA mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Dabei wurde auf signifikante Unterschiede innerhalb der Allele (farbig markiert) und innerhalb der beiden Wachstumsbedingungen (oben) getestet. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) werden durch ungleiche Buchstaben repräsentiert.

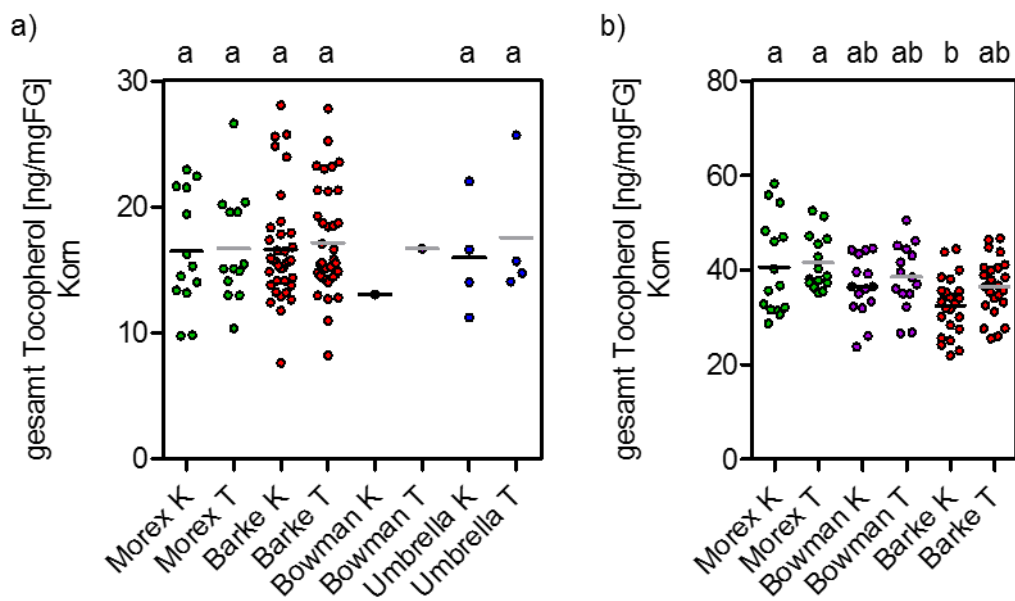
Die ähnlichen Tendenzen von Tocopherolgehalten und HPT-7H korrelieren dabei so gut (Abbildung 26), dass die Behauptung aufgestellt werden kann, dass die HPT-7H ein entscheidender Regulator der Tocopherol-Biosynthese im Gerstenblatt ist. Da die HPT-7H Regulation stark vom Allel bestimmt wird (Abbildung 25) sollte in künftigen Zuchtprogrammen primär auf das Morex-Allel selektiert werden, um die in Abschnitt 4.2.1 diskutierten positiven Effekte des Tocopherolgehalts in zukünftige Sorten zu propagieren. Somit wurden gemäß der Projektziele erfolgreich Allele identifiziert, die für die in Abschnitt 4.2.1 diskutierten Eigenschaften für züchterische Selektion wichtig sein können. Wie in Abschnitt 4.2.5.3.1 bereits dargestellt, wurde diese Korrelation nachträglich auch in RNASeq-Analysen verifiziert.



**Abbildung 26:** Korrelation von HPT-7H Expressionshöhe (aus Abbildung 25) und gesamtem Tocopherolgehalt (aus Abbildung 24).

#### 4.3.2 Die Tocopherol-Biosynthese im Korn

Assoziationsgenetische Studien schlugen sowohl die HPT-7H als auch die HGGT (Abbildung 5) als potentielle Ziele für züchterische Maßnahmen zur Beeinflussung des Vitamin E-Gehalts reifer Körner vor [22]. Analog zu den Arbeiten am Locus der HPT-7H wurde deshalb der Locus der HGGT betrachtet. Hier konnten keine weiteren Allele identifiziert, jedoch ebenso CAPS-Marker für die Durchmusterung übriger Sorten bezüglich der Allele Morex, Barke und Bowman abgeleitet werden. Bei Aufteilung der Tocopherol- und Tocotrienoldaten der reifen Körner der ROS Pflanzen aus dem Jahr 2016 ist zu erkennen, dass der Tocopherolpool zwischen Sorten die unterschiedliche HPT-7H-Allele tragen nicht signifikant schwankt (Abbildung 27a). Bei Darstellung des Tocotrienolgehalts der Sorten sortiert nach HGGT-Allel lässt sich jedoch erkennen, dass das Barke-HGGT-Allel einen signifikant niedrigeren Tocotrienolgehalt als das Morex-HGGT-Allel unter Kontrollbedingungen vermittelt (Abbildung 27b). Obwohl hier die Amplitude der Unterschiede nicht so groß ist wie bei den Tocopherolgehalten der Blattproben, wurde mit Identifizierung und Zuordnung dieser drei Allele unter den in Abschnitt 4.2.2 diskutierten Aspekten das Projektziel erfolgreich erreicht.



**Abbildung 27:** Tocopherolgehalt (a) und Tocotrienolgehalt (b) reifer Körner von Kontroll- (K) und trockengestressten (T) Gerstenpflanzen gewachsen im ROS der LfL Freising im Jahr 2016, aufgeteilt nach HPT-7H Allel (a) und HGGT Allel (b). Die Signifikanzniveaus wurden in einer ANOVA mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) werden durch ungleiche Buchstaben repräsentiert.

### 4.3.3 Die Stärkebiosynthese im Korn

Die biochemische Charakterisierung der Stärkebiosynthese im Korn beschränkte sich bis jetzt auf die Überprüfung der Hitzestabilität der AGPase-Aktivität (Abschnitt 4.2.3). Neben den dort erwähnten Beschränkungen aufgrund der Kornentwicklungsstadien zeigte die CAPS-Marker basierte Durchmusterung der Sortenkollektion, dass fast alle zweizeiligen Gerstensorten dasselbe Allel tragen (Tabelle 4). Während die sechszeiligen Sorten entweder das Morex- oder ein neu identifiziertes Allel tragen, weisen 68 von 71 genotypisierten zweizeiligen Sorten dieselben Sequenzmuster wie das Barke-Allel auf. Die modernen Zuchtprogramme scheinen bereits auf dieses Allel selektiert zu haben, oder es wurde mit genetisch gekoppelten Determinanten ungewollt mitvererbt. Die Verteilung der genetischen Diversität innerhalb der Sortenkollektion war beispielweise bei der HPT-7H und der HGGT (Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2) ausgeprägter, was auf einen geringeren Selektionsdruck hindeutet. Da keine genetischen Unterschiede etwaige auffällige biochemische Eigenschaften erklären können, muss die hier betrachtete AGPase zum jetzigen Zeitpunkt als nicht relevantes Zielgen angesehen werden. Die sechszeiligen Sorten wurden aufgrund ihrer abweichenden Kornmorphologie nicht betrachtet.

**Tabelle 4** Für den Genlocus der Aps1 wurden drei Allele identifiziert. Über einen CAPS-Marker konnten die Allele in den meisten Genotypen des Sortensortiments identifiziert werden. Das Barke Allel findet sich in einer großen Anzahl an zweizeiligen Sorten.

CAPS-Allel	zweizeilig	sechszellig
Barke	68	0
Morex	2	4
Neu	1	2

Die Stärkebiosynthese im Korn wird jedoch auch weiterhin ein relevanter Zielprozess bleiben. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden hier keine aussagekräftigen biochemischen Analysen durchgeführt. Über bioinformatische Analysen wurden, wie in Abschnitt 4.2.5.3.2 dargestellt, bereits transkriptionelle Einflüsse einiger Gene auf den Stärkegehalt im Blatt gefunden. Auch konnten bereits unterschiedliche Allele identifiziert werden (Tabelle 6). Diese stellen somit potentielle neue Zielgene dar.

#### 4.3.4 Die Umsteuerung der Assimilatverteilung zwischen grüner Biomasse (Blätter) und dem reproduktiven Wachstum (Körner)

Da die Umsteuerung der Assimilatverteilung aus Zeitgründen weder biochemisch noch molekular behandelt wurde, können auch keine Aussagen über die Identifizierung von leistungsfähigen Allelen gemacht werden.

#### 4.3.5 RNASeq

Zusätzlich zur Ermittlung der Expressionshöhe können die RNASeq-*reads* auch zur Identifizierung allelischer Variationen genutzt werden. Dafür müssen allerdings SNP-Variationen in den Exons vorliegen. Basenaustausche in Introns und im Promotorbereich eines Gens können nicht identifiziert werden. Entsprechend können für nichtexprimierte Allele auch keine SNP-Muster identifiziert werden. Ist ein Gen jedoch in allen Genotypen inaktiv, ist es für die Fragestellung zumeist auch irrelevant. Es zeigte sich jedoch, dass einige Gene in manchen Genotypen sehr stark, und in anderen Genotypen fast nicht oder gar nicht exprimiert werden (Abbildung 18). Da für diese Genotypen dann unter Umständen keine *reads* vorliegen, muss die Sequenzinformation bei Interesse auf andere Weise ermittelt werden. Die kostengünstigste Möglichkeit ist dabei die PCR-basierte Amplifikation von genomischer DNA mit anschließender Sequenzierung, wie es für die Genorte der HPT-7H, HGGT und Aps1 durchgeführt wurde (siehe Abschnitte 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3).

Für die in Abbildung 18 dargestellten Gene lassen sich die verschiedenen Transkriptgehalte teilweise sehr gut den identifizierbaren SNP-Allelen zuordnen (Gene #1-3 und #5 in Tabelle 5). Für Gen #4 konnten in einigen Sorten keine *reads* gefunden werden. Hier können also keine SNP-Muster identifiziert werden. Diese Sorten tragen entweder ein Nullallel, das keine Aktivität aufweist, oder dieser Genlocus fehlt komplett. Für die Gene #1-5 können Unterschiede im Transkriptgehalt leicht auf Unterschiede im Genlocus zurückgeführt werden. Wie anhand der plastidären Pyruvatkinase (#6, HORVU4Hr1G003290) zu erkennen ist, trifft dies

jedoch nicht immer zu. Hier vermittelt ein Allel verschiedene Expressionsmuster. Die Betrachtung des Promotorbereichs oder der Intronbereiche könnte Aufschluss geben, ob doch verschiedene Allele vorliegen. Denkbar wäre auch eine posttranskriptionelle Regulation der mRNA über RNA-Interferenz-Mechanismen, die an einer anderen Stelle im Genom derjenigen Sorten codiert sind, die einen niedrigeren Transkriptgehalt dieser Pyruvatkinase aufweisen. Ähnliche Vermutungen lassen sich über das Allel A des Gens #2 (HORVU2Hr1G096400) machen. Cis- oder trans-Elemente in den Sorten BF\_14 und BF\_55 könnten eine verringerte Expression vermitteln.

**Tabelle 5:** Allelzuordnung aufgrund der SNP-Muster in den RNASeq-reads. Für jedes Gen wurden 1-3 Allele (A, B, C oder Null) identifiziert. Die Transkriptmenge ist durch einen Farbcode repräsentiert und beruht auf der Einteilung in die drei Kategorien viel (grün), mittel (weiß) und wenig bzw. null (rot) wie sie in Abbildung 18 dargestellt ist. Die Genotypnummer entspricht der Nummerierung in der Sortenkollektion des Projektverbundes.

#	Genlokus	02	14	42	47	53	54	55	56
1	HORVU1Hr1G092260	A	B	B	B	A	A	B	A
2	HORVU2Hr1G096400	A	A	B	B	A	A	A	A
3	HORVU1Hr1G094810	A	B	B	B	C	C	B	C
4	HORVU2Hr1G120420	0	A	A	A	0	0	A	0
5	HORVU2Hr1G120440	A	B	B	B	A	A	B	A
6	HORVU4Hr1G003290	A	A	A	A	A	A	A	A

Die Gene in Tabelle 5 zeigen, dass es prinzipiell sehr leicht sein kann, verschiedene Transkriptgehalte verschiedenen Allelen zuzuordnen. Eine Zuordnung der Transkriptgehalte zu Allelen war in der Projektplanung für das Erreichen des Meilensteins 3 auch für die zu Projektbeginn definierten Zielprozesse vorgesehen. Hier wurden zunächst die Gene begutachtet, für die bereits ein quantitativer Einfluss auf verschiedene morphologische Parameter oder Metabolitdaten identifiziert werden konnte. Anhand der in Abschnitt 4.2.5.3 diskutierten Gene, deren Transkriptmengen mit dem Gehalt an Tocopherol, Stärke oder freien Zuckern korrelieren, soll gezeigt werden, dass die Zuordnung der Transkriptmenge zu Allelen nicht immer so deutlich ist wie in Tabelle 5. Von den 15 in Abschnitt 4.2.5.3 beispielhaft diskutierten Genen haben acht Gene in den acht behandelten Genotypen keine Sequenzunterschiede in den RNASeq-reads, obwohl sie offenkundig unterschiedliche Transkriptgehalte aufweisen. Für die übrigen sieben Gene ist die Allel-Verteilung und die Transkriptmenge in Tabelle 6 dargestellt. Für die Gene *dxp2*, *Apl1-like* und *SSneu01* konnte jeweils nur ein Genotyp mit einem alternativen Allel identifiziert werden. Dieses jeweilige zweite Allel vermittelte in keinem der drei Gene in beiden Wachstumsbedingungen eine deutlich veränderte Transkriptmenge (deutlich höher, oder deutlich niedriger). Für das Gen *dxp3* konnte ein Nullallel identifiziert werden, für das keine RNASeq-reads gefunden wurden. Jedoch konnten auch für die

übrigen Allele nur sehr wenige *reads* gefunden werden. Dieses Gen ist also in den untersuchten Blattproben transkriptionell nur sehr wenig aktiv, weshalb Unterschiede in der Aktivität nur schwer darstellbar sind. Die übrigen Gene ließen auch keine eindeutige Zuordnung von Allelen zu unterschiedlich hohen Transkriptgehalten zu. Sollten diese Gene einer allelspezifischen transkriptionellen Regulation unterliegen, muss dies durch Betrachtung weiterer Genotypen entschlüsselt werden. Auffällig verhielt sich letztlich nur die Saccharosesynthase *Susy4* in der Sorte BF\_047. Erstens lassen die SNP-Muster der RNASeq-*reads* darauf schließen, dass sie bezüglich dieses Gens heterozygot ist. Zweitens wies dieses Gen unter Kontrollbedingungen in dieser Sorte im Vergleich zu den anderen Sorten die geringste transkriptionelle Aktivität auf, unter Trockenstressbedingungen die höchste. Im Vergleich zu den anderen Genotypen weist das Allel C womöglich unter Stressbedingungen eine veränderte Regulation auf.

**Tabelle 6:** Allelzuordnung auf Grund der SNP-Muster in den RNASeq-*reads*. Für jedes Gen wurden 1-3 Allele (A, B, C oder Null) identifiziert. Die Transkriptmenge ist durch einen Farbverlauf repräsentiert und beruht auf der tatsächlichen *count*-Zahl des jeweiligen Gens: Von der Sorte mit den meistens *counts* (grün) hin zu der Sorte mit den wenigsten *counts* (rot). Die Genotypnummer entspricht der Nummerierung der Sortenkollektion des Projektverbundes. Die *counts* unter Kontrollbedingungen (K) und Trockenstress (T) wurden je Gen getrennt betrachtet.

Genlokus	Name	Bed.	02	14	42	47	53	54	B55	56
HORVU2Hr1G 126150	dxp2	K	A	A	A	A	A	B	A	A
		T	A	A	A	A	A	B	A	A
HORVU1Hr1G 084900	dxp3	K	A	B	0	0	A	0	0	
		T	A	B	0	0	A	0	0	
HORVU2Hr1G 121250	PhyK	K	A	B	A	C	A	A	B	A
		T	A	B	A	C	A	A	B	A
HORVU0Hr1G 014150	ApL1-like	K	A	A	A	B	A	A	A	A
		T	A	A	A	B	A	A	A	A
HORVU2Hr1G 090980	SSneu01	K	A	A	A	A	A	A	A	B
		T	A	A	A	A	A	A	A	B
HORVU2Hr1G 106410	SSIIIb	K	A	A	B	B	A	A	B	A
		T	A	A	B	B	A	A	B	A

Genlokus	Name	Bed.	02	14	42	47	53	54	B55	56
HORVU7Hr1G 030870	SuSy4	K	A	A	B	A+C	A	A	A	A
		T	A	A	B	A+C	A	A	A	A

Allgemeine Vorhersagen über die allelische Variation eines Genes sind auf Grund des Transkriptprofils nicht möglich. Ebenso ist die Zuordnung über RNASeq-reads identifizierter Allele auch nicht ausreichend, um eine Aussage über die Transkripthöhe zu machen. Jedoch konnte klar gezeigt werden, dass der Datensatz die Möglichkeit dazu bietet. Allele von Genen, für die diese klare Abtrennung zutrifft können dabei besonders schnell für die Arbeiten des Arbeitspakets 4 (Abschnitt 4.4) verwendet werden. Mit der hier beispielhaft gezeigten Zuordnung von Allelen zu den zu Projektbeginn definierten Zielprozessen wurde Meilenstein 3 der Projektplanung erfolgreich erreicht.

## 4.4 Arbeitspaket 4: Ableitung und Validierung von molekularen Markern für die Gerstenzüchtung

### 4.4.1 Ableitung molekularer Marker

#### 4.4.1.1 Zu Projektbeginn definierte Zielprozesse

In den Abschnitten 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3 wurden bereits erfolgreich molekulare Marker zur Durchmusterung der Sortenkollektion eingesetzt um SNP-Profile zu identifizieren, die eine Zuordnung zu den bis dahin bekannten Allelen der HPT-7H, HGGT und Aps1 ermöglichen. Dabei wurde die allelspezifische Kombination von drei SNPs am Genort der HPT-7H genutzt um zwischen vier verschiedenen HPT-7H Allelen zu differenzieren. Am Genort der HGGT und der Aps1 wurde jeweils die einzigartige Kombination von zwei SNPs genutzt, um jeweils drei Allele voneinander zu differenzieren. In allen drei Fällen war die Auswahl der allelspezifischen SNPs auf diejenigen beschränkt, die mindestens in einer Ausprägung eine Restriktionsschnittstelle erzeugen (CAPS-Marker). Dies ermöglichte eine kostengünstige Durchmusterung. Alle drei Gene besitzen darüber hinaus eine Vielzahl weiterer allelspezifischer SNP-Muster, die ebenso für das Erstellen eines Markers verwendet werden können, der nicht auf die Anwesenheit einer Restriktionsschnittstelle angewiesen ist (z.B. KASP-Marker). Auch eine Applikation auf einem Genchip ist denkbar.

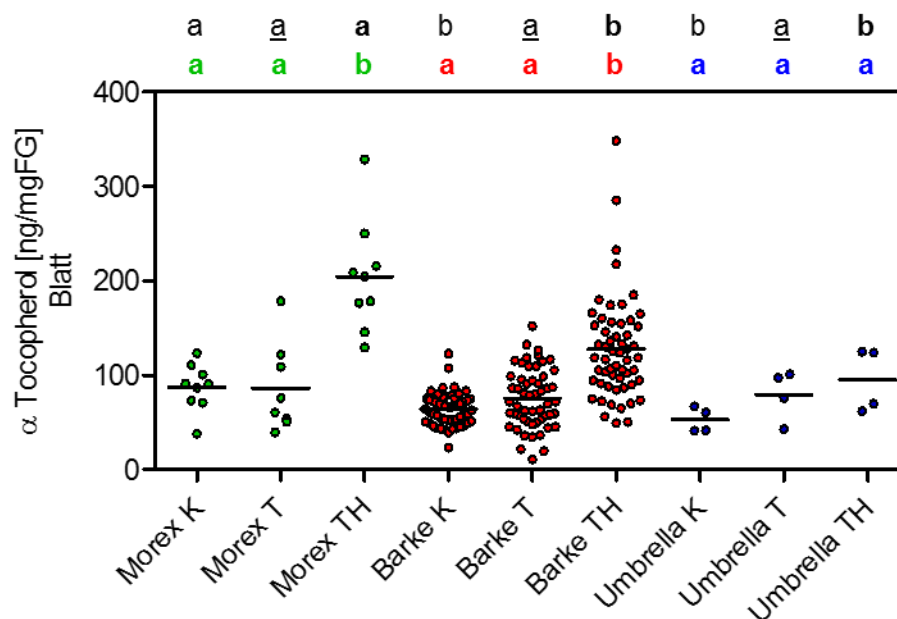
Wie in den Arbeitspaketen 2 und 3 dargestellt ist, haben dabei lediglich die HPT-7H und die HGGT für eine praxisnahe Anwendung Potential. Spätestens seit der BayKlimaFit Zwischenbilanz im Innovations- und Gründerzentrum Biotechnologie (IZB) in Planegg/Martinsried am 09.10.2017 hatten die projektassoziierten Zuchtbetrieb (Abschnitt 7) die Möglichkeit die relevanten Sequenzinformationen zu erhalten. Somit wurde Meilenstein 4 der Projektplanung erfolgreich erreicht.

#### 4.4.1.2 RNASeq-abgeleitete Marker

Auf Basis der RNASeq-Sequenzinformationen können prinzipiell sofort Marker abgeleitet werden. Wie in Abschnitt 4.3.5 dargestellt wurde, müssen hier relevante Zielprozesse zunächst noch identifiziert und validiert werden.

#### 4.4.2 Validierung molekularer Marker

Bis jetzt konnte ein Zusammenhang zwischen dem HPT-7H-Allel und dem Blatt-Tocopherolgehalt, sowie dem HGGT-Allel und dem Tocotrienolgehalt reifer Körner nachgewiesen werden. Die Validität der verwendeten HGGT-Marker wurde bis jetzt nicht in weiteren Kornproben bestätigt. Die Validität der verwendeten HPT-7H Marker wird als bestätigt gewertet, da die gefundenen Assoziation (i) in zwei unterschiedlichen Anzuchten bei zwei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen im ROS und (ii) auch nachträglich für die Pflanzen des CLIMATE CHANGE Vorprojekts gefunden wurde, also für Pflanzen, die in Klimakammern Trocken- und kombiniertem Hitze- und Trockenstress ausgesetzt waren (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Über CAPS-Marker wurden den Genotypen des CLIMATE CHANGE Vorprojekts HPT-7H Allele zugewiesen. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Sorte. Die Pflanzen wuchsen unter Kontrollbedingungen (K), Trockenstress (T) und kombinierten Trocken- und Hitzestress (TH) in Klimakammern. Die Signifikanzniveaus wurden in einer ANOVA mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Dabei wurde auf signifikante Unterschiede innerhalb der Allele (farbig markiert) und innerhalb der drei Wachstumsbedingungen getestet (oben, unterschiedlich formatiert). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) werden durch ungleiche Buchstaben repräsentiert. Das Morex-Allel vermittelt unter Kontroll- und kombiniertem Trocken- und Hitzestress gesteigerte Tocopherol-Werte.

## 5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

Voll LM, Schuy C, Sonnewald U. (2016) BarleyFit: Genomische Analyse und Validierung stress-assoziiertes biochemischer und molekularer Marker. Poster session presented at: Auftaktveranstaltung und Fachtagung des Projektverbunds Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel BAY KLIMAFIT gefördert vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz; 2016 Apr 14, D-80333 München

Sonnewald U. (2016) Hitze- und Trockentoleranz bei Gerste. Präsentation bei der Auftaktveranstaltung und Fachtagung des Projektverbunds Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel BAY KLIMAFIT gefördert vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz; 2016 Apr 14, D-80333 München

Templer SE, Ammon A, Pscheidt D, Ciobotea O, Schuy C, McCollum C, Sonnewald U, Hanemann A, Förster J, Ordon F, von Korff M, Voll LM. (2017) Metabolite profiling of barley flag leaves in drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defence. *J Exp. Bot.*; 68(7): 1697-1713.

Voll LM (2017). Allelic variation in homogentisate phytyltransferase is a major determinant of leaf tocopherol pool composition in drought stressed barley leaves. Präsentation bei der Tagung Molekularbiologie der Pflanzen (30); 2017 Feb 21-24; D-42929 Dabringhausen

Schuy C., Ammon A., Groth J., Hanemann A., Herz M., Voll LM. & Sonnewald U. (2017). Hitze- und Trockentoleranz bei Gerste. Posterpräsentation bei der Zwischenbilanz und Fachtagung des Projektverbunds Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel BAY KLIMAFIT gefördert vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz; 2017 Oct 09; D-82152 Martinsried

Sonnewald U. (2017) Hitze- und Trockentoleranz bei Gerste. Präsentation bei der Zwischenbilanz und Fachtagung des Projektverbunds Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel BAY KLIMAFIT gefördert vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz; 2017 Oct 09; D-82152 Martinsried

Schuy C, Groth J, Ammon A, Eydam J, Baier S, Hanemann A, Herz M, Voll LM, Sonnewald U (2018) Deciphering the genetic basis for vitamin E accumulation in leaves and grains of different barley accessions. Manuscript eingereicht.

## 6 Vernetzungen

Das Teilprojekt 05 („Hitze- und Trockentoleranz in Gerste“) kooperierte sehr eng mit den BayKlimaFit Teilprojekten 06 („Validierung von Markern für die Züchtung klimaadaptierter gesunder Gerstenpflanzen“, Merkus Herz, LfL Freising), 07 („Klimaabhängige Kontrolle des Wasserverlustes in Blättern“, Rainer Hedrich, Universität Würzburg) und 10 („Krankheitsresistenz klimaadaptierter Gerstenpflanzen“, Ralph Hückelhoven, TU München).

Zu Projektbeginn wurde gemeinschaftlich eine Kollektion von 111 Gerstengenotypen festgelegt, die allen genannten Teilprojekten für die Beantwortung der individuellen Fragestellungen zur Verfügung stand. Diese 111 Genotypen wurden gemeinschaftlich vermehrt (s. Kapitel 7). Anfang 2016 wurden davon in Konsens 56 Genotypen ausgewählt die unter Aufsicht des TP06 in einem ROS an der Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising (LfL) kontrolliertem Trockenstress ausgesetzt wurden. Alle genannten Teilprojekte hatten Zugang zu diesen Pflanzen, um Proben für eigene Analysen zu nehmen. Das TP06 protokollierte physiologische und morphologische Parameter und stellte die Daten den anderen Teilprojekten zur Verfügung. Anfang 2017 wurde aus den 111 ursprünglichen Genotypen gemeinschaftlich von allen Projektteilnehmern ein zweites Set bestehend aus 59 Genotypen definiert. Die Auswahl erfolgte dabei auf Grund der von allen Projektteilnehmern im ersten Projektjahr erhobenen Daten. Dieses Set wurde erneut unter Aufsicht des TP06 in einem ROS kontrolliertem Trockenstress ausgesetzt und war allen anderen Teilprojekten zugänglich. Das TP06 protokollierte erneut physiologische und morphologische Parameter und stellte sie bereit. Nach weiteren Analysen wurde für eine Anzucht im Jahr 2018 gemeinschaftlich nochmals ein verringertes Set an 15 Genotypen definiert. Diese wurden abermals in einem ROS kontrolliertem Trockenstress ausgesetzt und waren allen Teilprojekten zugänglich.

Abseits der physiologischen und morphologischen Daten, die für alle drei Jahre vom TP06 bereitgestellt wurden, stellten auch die übrigen Teilprojekte relevante Daten den anderen Teilprojekten zur Verfügung. Somit konnte für die Pflanzen im ROS ein großer gemeinschaftlicher Datensatz generiert werden, der Daten beinhaltet, die von der Expertise der einzelnen Teilprojekte profitierten.

Um die wissenschaftliche Kommunikation innerhalb der Teilprojekte zu fördern, wurde am 16.04.2018 ein Methoden-Workshop mit dem Schwerpunkt *Metabolomics* am Lehrstuhl für Biochemie angeboten. Nach einer Einführung in das Thema (Theorie, experimentelles Design, die Problematik der Probenwahl bei mehrzelligen Organismen mit verschiedenen Gewebestrukturen usw.) fand eine Führung durch das *Metabolomics*-Labor des Lehrstuhls statt. Hier wurden einzelne Analyse-Geräte (HPLC, GC, MS) im Detail vorgestellt.

## 7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligungen

Die drei bayerischen Gerstenzuchtbetriebe Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG (Herzogenaurach), Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG (Irlbach) und Saatzucht Streng-Engelen GmbH & Co. KG (Uffenheim) waren direkt in das Projekt eingebunden. Alle drei Saatzuchtbetriebe hatten mindestens 20 potentiell interessante Gerstengenotypen aus ihren aktuellen Zuchtprogrammen der gemeinsam genutzte Kollektion beigesteuert und zugesagt, sich durch die Bereitstellung von Ressourcen am Projekt zu beteiligen.

So wurden zu Projektbeginn alle 111 Genotypen auf den Feldern der Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG vermehrt. Einerseits um Saatgut in hoher Quantität für alle anstehenden Experimente der Projektpartner bereitzustellen, andererseits um eine hohe Qualität zu gewährleisten, um mögliche epigenetische Faktoren der Vorgängergeneration zu minimieren. Anfang 2017 wurde von allen Projektteilnehmern gemeinsam ein Kernset an 59 Gerstengenotypen innerhalb der ursprünglichen 111 ausgewählt. Diese Genotypen wurden erneut auf Feldern der Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG vermehrt und wurden für die Experimente im Jahr 2018 genutzt. Die erhobenen Ertragsdaten aus den großen Parzellen ergänzen die vorhandenen Ertragsdaten aus Klimakammer- und Rollgewächshaus-Anzuchten.

Zusätzlich bot die Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG an, KASP-Marker Daten zu erheben. Diese halfen bei der markergestützten Identifizierung des genomischen Bereichs, der mit dem Gehalt an Tocopherol assoziiert ist. Dies half bei der Identifikation der HPT-7H als entscheidende Komponente der Vitamin E-Biosynthese im Gerstenblatt.

## 8 Zusammenfassung

Durch die ausführlichen biochemischen, physiologischen und bioinformatischen Analysen konnten alle Meilensteine der Projektplanung erreicht werden.

Meilenstein M1 (Die zu Beginn des Projekts definierten Zielgene sind annotiert und im Genom verankert) konnte dabei fristgerecht erreicht werden. Die Arbeiten profitierten dabei auch stark von der Veröffentlichung eines neuen Referenzgenoms.

Meilenstein M2 (Die Etablierung des Trockenstress- und kombinierten Hitze- & Trockenstressbedingungen ist abgeschlossen) konnte dabei ebenso fristgerecht erreicht werden.

Meilenstein M3 (Die Analyse der RNA-Seq-Daten ist abgeschlossen und differentiell exprimierte Allele aus den zu Projektbeginn definierten zellulären Zielprozessen sind identifiziert) konnte auf Grund von Verzögerungen im experimentellen Design nicht wie ursprünglich geplant im Q3 2017 erreicht werden. Die Analysen sind im Q4 2018 jedoch so weit fortgeschritten, dass auch dieser Meilenstein bis zum Abschluss der Projektförderung erreicht wurde.

Meilenstein M4 (Der erste Satz an molekularen Markern liegt vor) konnte dabei fristgerecht erreicht werden. Die relevanten Sequenzinformationen der HPT-7H und HGGT sind für interessierte Zuchtbetriebe jederzeit abfragbar und sind in der geplanten Fachpublikation Abschnitt 5) enthalten.

## 9 Ausblick

Die in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten zeigen sehr deutlich, dass der Genpool der Gerste aus Sicht der Züchtung großes Potential hat, moderne Gerstensorten hervorzubringen, die den Anforderungen des Klimawandels gewachsen sind. Die gezielte Züchtung solcher neuer Sorten ist dabei aber stets sehr komplex. Zuchtprogramme müssen oft über Jahre geplant werden. Der Beitrag einzelner Marker zum Züchterfolg ist dabei oft schwer einzuschätzen. Das ein Projekt, wie es hier beschrieben wurde, das Potential hat effektive Marker zu entdecken, die in einigen Jahren unter Umständen von Züchtern in neuen Zuchtprogramme aufgenommen werden, wurde anhand der Vitamin E-Biosynthese gezeigt. Zu Projektbeginn wurden jedoch deutlich mehr Zielprozesse definiert, als dann effektiv bearbeitet werden konnten. Die Entwicklung solcher Marker ist also immer mit einem erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, der oft den Rahmen von Projekten überschreitet. Konkret werden die in diesem Projekt generierten Daten auch weiterhin für die Entdeckung neuer Zielprozesse verwendet werden. Vor allem die Analyse der RNASeq-Datensätze birgt sehr großes Potential. Die praxisnahe Anwendung kann letztlich nur durch die Zuchtbetriebe abgeschätzt werden. Das in diesem Projekt gewonnene Wissen wird sicherlich zum Verständnis über die stressinduzierten Mechanismen beitragen, die nicht nur in Gerste für ertragsrelevante Stoffwechselprozesse verantwortlich sind.

## Literaturverzeichnis

- [1] Prasch CM, Sonnewald U (2013) Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol.* 162: 1849-1866
- [2] Bauer H, Ache P, Wohlfart F, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Hetherington AM, Hedrich R (2013) How do stomata sense reductions in atmospheric relative humidity? *Mol. Plant* 6: 1703-1706
- [3] Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Lachmann N, Mendel RR, Bittner F, Hetherington AM, Hedrich R. (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Current Biology* 23: 53-57
- [4] Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 63: 1593-1608
- [5] Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681
- [6] von Korff M, Grando S, This D, Baum M, Ceccarelli S (2008) Quantitative trait loci (QTL) associated with agronomic performance of barley under drought. *Theor. Appl. Genet.* 117: 653-669
- [7] Worch S, Rajesh K, Harshavardhan VT, Pietsch C, Korzun V, Kuntze L, Börner A, Wobus U, Röder MS, Sreenivasulu N (2011) Haplotyping, linkage mapping and expression analysis of barley genes regulated by terminal drought stress influencing seed quality. *BMC Plant Biol.* 11: 1
- [8] Kalladan R, Worch S, Rolletschek H, Harshavardhan VT, Kuntze L, Seiler C, Sreenivasulu N, Röder MS (2013) Identification of quantitative trait loci contributing to yield and seed quality parameters under terminal drought in barley advanced backcross lines. *Mol. Breeding* 32: 71-90
- [9] Templer SE, Ammon A, Pscheidt D, Ciobotea O, Schuy C, McCollum C, Sonnewald U, Ha-nemann A, Förster J, Ordon F, von Korff M, Voll LM. (2017) Metabolite profiling of barley flag leaves in drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defence. *J Exp. Bot.* 68: 1697-1713
- [10] Muzammil S, Shrestha A, Dadshani S, Pillen K, Siddique S, Léon J, Naz AA (2018) An Ancestral Allele of Pyrroline-5-carboxylate synthase1 Promotes Proline Accumulation and Drought Adaptation in Cultivated Barley. *Plant Physiol.* 178: 771-782
- [11] Seiler C, Harshavardhan VT, Rajesh K, Reddy PS, Strickert M, Rolletschek H, Scholz U, Wobus U, Sreenivasulu N (2011) ABA biosynthesis and degradation contributing

- to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *J Exp Bot.* 62: 2615-2632
- [12] Greene TW, Hannah LC (1998) Maize Endosperm ADP–Glucose Pyrophosphorylase SHRUNKEN2 and BRITTLE2 Subunit Interactions. *The Plant Cell* 10: 1295-1306
- [13] Yamakawa H, Hirose T, Kuroda M, Yamaguchi T (2007) Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiol.* 144: 258-277
- [14] Rigotti A (2007) Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol. Aspects Med.* 28: 423-436
- [15] Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R Block MA (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 290-299
- [16] Yamauchi R (1997) Vitamin E: Mechanism of its antioxidant activity. *Food Sci Technol Int Tokyo* 3: 301-309
- [17] Rösti S, Rudi H, Rudi K, Opsahl-Sorteberg HG, Fahy B, Denyer K (2006) The gene encoding the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase in barley endosperm also encodes the major plastidial small subunit in the leaves. *J Exp Bot.* 2006; 57: 3619-3626
- [18] Moison M, Marmagne A, Dinant S, Soulay F, Azzopardi M, Lothier J, Citerne S, Morin H, Legay N, Chardon F, Avice JC, Reisdorf-Cren M, Masclaux-Daubresse C (2018) Three cytosolic glutamine synthetase isoforms localized in different-order veins act together for N remobilization and seed filling in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 69: 4379-4393
- [19] Mascher M, Gundlach H et al., Waugh R, Stein N (2017) A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544: 427-433
- [20] Beier S, Himmelbach A et al., Stein N, Mascher M (2017) Construction of a map-based reference genome sequence for barley, *Hordeum vulgare* L. *Sci Data* 4: 170044
- [21] International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–717
- [22] Graebner RC, Wise M, Cuesta-Marcos A, Geniza M, Blake T, Blake VC, Butler J, Chao S, Hole DJ, Horsley R, Jaiswal P, Obert D, Smith KP, Ullrich S, Hayes PM (2015) Quantitative Trait Loci Associated with the Tocochromanol (Vitamin E) Pathway in Barley. *PLoS One.* 10(7)
- [23] Avila-Ospina L, Marmagne A, Talbotec J, Krupinska K, Masclaux-Daubresse C (2015) The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. *J Exp Bot.* 66: 2013-2026

- [24] Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2007) Specific roles of alpha- and gammatocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 143: 1720–1738
- [25] Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1: S1
- [26] Panfili G, Fratianni A, Irano M (2003) Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3940-3944
- [27] Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell.* 16: 1419-1432
- [28] Do T, Cozzolino D, Muhlhausler B, Box A, Able A (2015) Effect of malting on antioxidant capacity and vitamin E content in different barley genotypes. *Journal of the Institute of Brewing* 121: 531-540
- [29] Zhang S, Qin X, Lu H, Wan M, Zhu Y (2016) The influence of vitamin E supplementation on yeast fermentation. *J. Inst. Brew.* 122: 289-292
- [30] Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159
- [31] Diepenbrock CH, Kandianis CB, Lipka AE, Magallanes-Lundback M, Vaillancourt B, Góngora-Castillo E, Wallace JG, Cepela J, Mesberg A, Bradbury PJ, Ilut DC, Mateos-Hernandez M, Hamilton J, Owens BF, Tiede T, Buckler E, Rocheford T, Buell CR, Gore MA, DellaPenna D (2017) Novel Loci Underlie Natural Variation in Vitamin E Levels in Maize Grain. *Plant Cell* 29: 2374-2392
- [32] Valentin HE, Lincoln K, Moshiri F, Jensen PK, Qi Q, Venkatesh TV, Karunanandaa B, Baszsis SR, Norris SR, Savidge B, Gruys KJ, Last RL (2006) The Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell.* 18: 212-224

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ABA	Abscisinsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AGP	AGPase Isoform
AGPase	ADP-Glukose Pyrophosphorylase
ANOVA	Varianzanalyse
ApL	AGPase Isoform
ApS	AGPase Isoform
ATP	Adenosintriphosphat
aTph	alpha Tocopherol
aTtr	alpha Tocotrienol
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
cDNA	complementary DNA
CDP	Chlorophyll-Dephytylase
ChIDP	Chlorophyll-Dephytylase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOXP	Methylerythritolphosphat
DPE	Disproportionating enzyme
DR	Doppelreihe
dTph	delta Tocopherol
DXP	Desoxyxylulosephosphat-Synthase
FAU	Friedrich-Alexander-Universität
FDR	false discovery rate
FG	Frischgewicht
frc	Fruktose
FW	Frischgewicht
GBSS	Korngebundenen Stärkesynthase
GC	Gaschromatographie
GGK	Geranylgeranyl-Kinase
GGPR	Geranylgeranyl-Dehydrogenase
glc	Glukose
gTph	gamma Tocopherol
gTtr	gamma Tocotrienol
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
HGGT	Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferas
HPD	Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPT	Homogentisat-Phytyl-Transferase
HPT-7H	HPT auf Chromosom 7H
HST	Homogentisat-Solanyl-Transferase
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPP	Isopentenyl Diphosphate Isomerase
ISA	Isoamylasen
KASP	Kompetitive allele specific PCR
LfL	Landesanstalt für Landwirtschaft
LS	Lehrstuhl
MPHQ-MT	Methyl-Phytyl-Benzochinon-Methyltransferase
mQTL	metabolomic Quantitative Trait Locus
MS	Massenspektrometer
mU	milli Unit (Einheit der Enzymaktivität)
NGS	next generation sequencing
PC	Hauptkomponente
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PhyK	Phytyl-Kinase
PIN	performance index
PK	Phytyl-Kinase
PPK	Phytyl-Phosphat-Kinase
PTST	Protein Targeting To Starch
qPCR	quantitative PCR
QTL	Quantitative Trait Locus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA Sequenzierung
ROS	Rollgewächshaus
SBE	stärkeverzweigende Enzyme
siPPase	anorganische lösliche Pyrophosphatasen
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SS	Stärkesnythase
STS	Sequence-Tagged Sites
suc	Saccharose
Susy	Saccharose-Synthase
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
tBLASTn	siehe BLAST
TC	Tocopherol-Cyclase
TKG	Tausendkorngewicht

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TKW	Tausendkorngewicht
totTph	gesamt Tocopherol
totTtr	gesamt Tocotrienol
totTtr	gesamt Tocochromanol
TP	Teilprojekt
TU	Technische Universität
UDP	Uridindiphosphat
UGPase	UDP-Glucose Pyrophosphorylase
WGS	Whole genome shotgun sequencing
γTMT	γ-Tocopherol-Methyltransferase

---

## Anhang

**Tabelle 7:** Die im Rahmen des Arbeitspakets 1 gemappten Gene. Der Genlokus basiert für Genorte mit dem Benennungsmuster [HORVU (Nummer des Chromosoms) Hr1G (einzigartige Nummer auf dem Chromosom)] auf [19] und [20] und für die übrigen Bezeichnungen auf [21]. Die Chromosomenzuordnung mit der Rekombinationswahrscheinlichkeit [cM] basiert auf [21]. Die Nummerierung der Iso-form dient hauptsächlich der internen Zuordnung.

Protein	Abkürzung	Isoform	Genelokus	Chromosom	cM
1-Deoxy-D-Xylose 5-Phosphate Synthase	dxp	1	HOR-VU1Hr1G060610.5	1	57.29
1-Deoxy-D-Xylose 5-Phosphate Synthase	dxp	2	HOR-VU2Hr1G126150.4	2	149.25
1-Deoxy-D-Xylose 5-Phosphate Synthase	dxp	3	HOR-VU1Hr1G084900.9	1	112.25
2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Hydroquinone Methyltransferase	MPHQ-MT	1	HOR-VU5Hr1G008980.7	5	43.76
2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Hydroquinone Methyltransferase	MPHQ-MT	2	HOR-VU4Hr1G002050.4	4	3.47
2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Hydroquinone Methyltransferase	MPHQ-MT	3	HOR-VU3Hr1G113670.1	3	148.16
2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Hydroquinone Methyltransferase	MPHQ-MT	4	HOR-VU6Hr1G060690.2	6	59.79
4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase	4HPPD	1	HOR-VU6Hr1G027650.12	6	52.76
acidic/neutral Invertase	anINV	1	HOR-VU4Hr1G019410.3	4	51.27
acidic/neutral Invertase	anINV	2	HOR-VU6Hr1G014540.1	6	43.77
acidic/neutral Invertase	anINV	3	HOR-VU2Hr1G075690.4	2	58.78
acidic/neutral Invertase	anINV	4	HOR-VU6Hr1G043010.3	6	54.89
acidic/neutral Invertase	anINV	5	HOR-VU2Hr1G072590.1	2	58.64
acidic/neutral Invertase	anINV	6	HOR-VU4Hr1G052570.1	4	51.40
acidic/neutral Invertase	anINV	7	HOR-VU3Hr1G040640	3	52.03

<b>Protein</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Isoform</b>	<b>Genelokus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>cM</b>
ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	AGPase	ApL1-like	HOR-VU0Hr1G014150.1	5	152.47
ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	AGPase	ApL2-like	HOR-VU1Hr1G091600.1	1	125.99
ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	AGPase	AGP.S.2	MLOC_57328.1	5	47.22
ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	AGPase	AGP.S.1	HOR-VU7Hr1G067620.1	7	70.68
Alpha-glucan phosphorylase		1	HOR-VU5Hr1G096390.5	5	133.86
Alpha-glucan phosphorylase		2	HOR-VU3Hr1G085420.12	3	83.63
Alpha-glucan phosphorylase		3	HOR-VU2Hr1G012630.5	?	?
Alpha-glucan phosphorylase		4	HOR-VU3Hr1G085380.5	3	?
Amylase	aAMY1	1	HOR-VU6Hr1G078360.1	?	?
Amylase	aAMY2	2	HOR-VU3Hr1G067620.1	3	57.54
Amylase	aAMY3	3	HOR-VU2Hr1G071710.5	2	58.05
Amylase	aAMY4	4	HOR-VU6Hr1G080790.1	6	87.14
Amylase	aAMY5	5	HOR-VU7Hr1G091250.3	7	77.53
Amylase	aAMY6	6	HOR-VU7Hr1G091240.1	7	76.46
Amylase	aAMY8	8	HOR-VU5Hr1G068350.1	5	
ATP-ADP antiporter	NTT1	1	HOR-VU6Hr1G036830.1	6	54.81
ATP-ADP antiporter	NTT2	2	HOR-VU3Hr1G058170.1	3	52.02
ATP-ADP antiporter	NTT3	3	HOR-VU7Hr1G057290.1	7	70.00
Beta-Amylase	BAM6-like	1	HOR-VU2Hr1G043920.3	2	58.07
Beta-Amylase	BAM3-like	2	HOR-VU1Hr1G055140.1	1	0.00
Beta-Amylase	BAM1-like	3	HOR-VU4Hr1G084390.1	4	107.37
Beta-Amylase	BAM7-like	4	HOR-VU4Hr1G000520.1	4	0.78
Beta-Amylase	BAM1-3-like	5	HOR-VU3Hr1G032160.2	3	52.03

<b>Protein</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Isoform</b>	<b>Genelokus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>cM</b>
Beta-Amylase	BAM6-like	6	HOR-VU2Hr1G043940.2	2	58.00
Beta-Amylase	BAM1-like	7	HOR-VU1Hr1G038950.2	1	?
Beta-Amylase	BAM9-like	8	HOR-VU1Hr1G038950.2	2	41.86
Beta-Amylase	BAM6-like	9	HOR-VU4Hr1G089510.3	4	?
Beta-Amylase	BAM1-like	10	HOR-VU1Hr1G038920.3	1	48.09
Beta-Amylase	BAM2-like	11	HOR-VU6Hr1G015670.15	6	?
Brittle1-like		1	HOR-VU6Hr1G037950.1	6	52.90
Brittle1-like		2	HOR-VU7Hr1G111040.2	7	121.8 1
Brittle1-like		3	HOR-VU1Hr1G025480.1	1	48.09
cell-wall Invertase	cwINV	1	AK362186	2	113.8 8
cell-wall Invertase	cwINV	2	HOR-VU2Hr1G109240.1	2	113.9 9
cell-wall Invertase	cwINV	3.1	HOR-VU2Hr1G118790.15	2	136.9 7
cell-wall Invertase	cwINV	3.2	HOR-VU2Hr1G118910.2	?	?
cell-wall Invertase	cwINV	3.3	HOR-VU2Hr1G118820.2	2	136.9 7
cell-wall Invertase	cwINV	4	HOR-VU1Hr1G086890.7	1	116.2 9
cell-wall Invertase	cwINV	5	HOR-VU4Hr1G086300.2	4	112.3 3
cell-wall Invertase	cwINV	6	HOR-VU2Hr1G073210.3	2	57.44
cell-wall Invertase	cwINV	7	HOR-VU5Hr1G123970.5	5	167.9 2
cell-wall Invertase	cwINV	8	HOR-VU3Hr1G113100.8	3	147.1 7
cell-wall Invertase	cwINV	9	HOR-VU5Hr1G124030.19	5	168.5 4
cell-wall Invertase	cwINV	10	HOR-VU6Hr1G012550.8	6	35.62
cell-wall Invertase	cwINV	11	MLOC_79313.1	?	?
cell-wall Invertase	cwINV	12	HOR-VU6Hr1G011260.19	6	28.50
cell-wall Invertase	cwINV	13	MLOC_72559.1	6	28.90

<b>Protein</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Isoform</b>	<b>Genelokus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>cM</b>
cell-wall Invertase	cwINV	14	HOR-VU3Hr1G005350.4	3	12.11
cell-wall Invertase	cwINV	15 zu 11	HOR-VU2Hr1G109120.2	2	114.38
Chlorophyll Dephytylase	ChIDP	1	HOR-VU1Hr1G064290.6	1	62.32
DEEPER ROOTING 1	Dro1	1	MLOC_3895.5	5	50.40
Disproportionating enzyme	DPE	1	HOR-VU2Hr1G021700.2	2	?
Disproportionating enzyme	DPE	2	HOR-VU2Hr1G028940.14	2	50.78
Fructan-Exohydrolasen =cwINVx16	FEH	1	MLOC_77951.3	6	
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	FBPase	1	HOR-VU4Hr1G060630.1	4	54.82
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	FBPase	2	HOR-VU7Hr1G109280.1	7	119.55
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	FBPase	3	HOR-VU3Hr1G083350.13	3	90.99
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	FBPase	4	HOR-VU1Hr1G074330.14	1	86.54
gamma-Tocopherol-Methyltransferase	gTMT	1	HOR-VU6Hr1G068410.1	6	64.31
Geranylgeranyl diphosphate reductase	GGDR	1	HOR-VU6Hr1G075900.1	6	72.95
Geranylgeranyl diphosphate reductase	GGDR	2	AK366103	3	51.55
Glucan water dikinase	GWD	1	HOR-VU7Hr1G048330.7	7	69.11
Glucose-6P-Translocator	GPT	1	HOR-VU7Hr1G062510.5	7	70.54
Glucose-6P-Translocator	GPT	2	HOR-VU2Hr1G045900.3	2	58.78
Glucose-Transporter	GLT	1	HOR-VU3Hr1G007190.1	3	15.16
Glutamin Synthetase	GS1_1	1_1	HOR-VU6Hr1G074030.1	6	68.70
Glutamin Synthetase	GS1_2	1_2	HOR-VU4Hr1G066860.5	4	59.49
Glutamin Synthetase	GS1_3	1_3	HOR-VU4Hr1G007610.1	4	?
Glutamin Synthetase	GS2	2	HOR-VU2Hr1G111300.2	2	120.04
Glutamin Synthetase	GSI-like	1_4	MLOC_59238.1	1	48.09
Glutamin Synthetase	GSIII-like	1_5	HOR-VU6Hr1G012290.6	6	33.77

<b>Protein</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Isoform</b>	<b>Genelokus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>cM</b>
Homogentisate Geranylgeranyl Transferase	HGGT	1	HOR-VU7Hr1G114330.2	7	126.56
Homogentisate Phytlyl Transferase	HPT	1	HOR-VU7Hr1G110990.1	7	121.85
Homogentisate Phytlyl Transferase	HPT	2	HOR-VU2Hr1G117600.5	2	132.45
Homogentisate Solanyl Transferase	HST	1	MLOC_16149.3	1	97.95
inorganic PPase löslich	siPPase	1	HOR-VU3Hr1G116650.3	3	154.15
inorganic PPase löslich	siPPase	2	HOR-VU6Hr1G068760.5	6	65.44
inorganic PPase löslich	siPPase	3	HOR-VU2Hr1G124650.3	2	146.53
inorganic PPase löslich	siPPase	4	HOR-VU1Hr1G005920.4	1	18.27
inorganic PPase löslich	siPPase	5	HOR-VU1Hr1G075110.4	1	90.30
inorganic PPase löslich	siPPase	7	HOR-VU1Hr1G075660.8	1	90.30
inorganic PPase löslich	siPPase	8	HOR-VU2Hr1G065020.1	2	58.05
inorganic PPase löslich	siPPase	9	HOR-VU3Hr1G116580.4	3	154.15
inorganic PPase löslich	siPPase	10	HOR-VU6Hr1G058900.2	6	54.89
inorganic PPase löslich	siPPase	11	HOR-VU7Hr1G085380.1	7	70.80
Isoamylase1-like	ISA1	1	HOR-VU7Hr1G051710.9	7	69.26
Isoamylase2-like	ISA2	2	HOR-VU1Hr1G062690.3	1	?
Isoamylase3-like	ISA3	3	HOR-VU5Hr1G070160.2	5	71.66
Isopentenyl disphosphate isomerase	IPP	1	HOR-VU2Hr1G043680.1	2	57.44
Isopentenyl disphosphate isomerase	IPP	2	HOR-VU1Hr1G064860.1	1	62.57
Limited Dextrinase	LDE	1	HOR-VU7Hr1G027860.4	7	43.34
Maltose Excess	MEX	1	HOR-VU2Hr1G101630.1	2	105.87
Pheophytinase	PPH		HOR-VU7Hr1G083370.9	7	
Phosphoglucosomerase	PGI	2	HOR-VU5Hr1G069850.14	5	68.30

<b>Protein</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Isoform</b>	<b>Genelokus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>cM</b>
Phosphoglucosmerase	PGI-like	1	HOR-VU1Hr1G006860.7	1	21.00
Phosphoglucan Phosphatase	SEX4-like		HOR-VU4Hr1G086650.5	4	?
Phosphoglucan Phosphatase	LSF1-like		HOR-VU1Hr1G093880.4	1	131.94
Phosphoglucan Phosphatase	LSF2-like		HOR-VU5Hr1G046860.2	5	44.17
Phosphoglucan Water Dikinase	PWD		HOR-VU7Hr1G008070.7	7	6.76
Phosphoglucomutase	PGM	2	HOR-VU4Hr1G007620.2	4	?
Phosphoglucomutase	pPGM	3	HOR-VU7Hr1G082990.2	7	75.21
Phytol Kinase	PhyK	1	HOR-VU2Hr1G121250.11	2	141.50
Phytyl-Phosphat Kinase	PhyPK	1	AK367002	3	59.63
ProteinTargetintoStarch1	PTST1		HOR-VU6Hr1G018500.10	6	49.08
ProteinTargetintoStarch2	PTST2		HOR-VU4Hr1G004470.10	4	14.94
Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	RuBisCO	1.1	MLOC_64679.1	5	47.01
Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	RuBisCO	1.2	AK249082.1	5	47.01
Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	RuBisCO	2	MLOC_44795.1	1	47.83
Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	RuBisCO	3	?	2	12.59
Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	RuBisCO	4	?	2	14.38
RuBisCO-Activase	RCA	1	AK252703.1	4	51.20
RuBisCO-Activase	RCA	2	AK251089.1	4	51.20
StarchBranchingEnzyme	SBE	1	HOR-VU0Hr1G022810.3	7	?
StarchBranchingEnzyme	SBE	2	HOR-VU0Hr1G022780.1	?	?
StarchBranchingEnzyme	SBE	3	HOR-VU0Hr1G022790.5	?	?
StarchBranchingEnzyme1-like	SBE1		HOR-VU7Hr1G082830.1	7	76.41

<b>Protein</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Isoform</b>	<b>Genelokus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>cM</b>
StarchBranchingEnzyme2like	SBE2	2	HOR-VU2Hr1G077120.1	2	58.92
StarchBranchingEnzyme2-like	SBE2	1	HOR-VU2Hr1G072500.34	2	57.05
Stärke-Synthase	GBSSI	1	HOR-VU7Hr1G012380.5	7	15.37
Stärke-Synthase	SSIIa	1	HOR-VU7Hr1G038420.8	7	66.94
Stärke-Synthase	SSIIIa	1	HOR-VU1Hr1G021590.5	1	48.23
Stärke-Synthase	SSIIIb	1	HOR-VU2Hr1G106410.9	2	110.9 1
Stärke-Synthase	SSIV	1	HOR-VU1Hr1G080950.5	1	101.0 6
Stärke-Synthase	SSneu01	1	HOR-VU2Hr1G090980.8	2	76.06
Stärke-Synthase	SSneu2	1	HOR-VU1Hr1G035960.15	1	48.37
Stärke-Synthase	SSneu03	1	HOR-VU7Hr1G025390.4	7	37.61
Sucrose Synthase	SuSy	1	HOR-VU7Hr1G007220.1	7	12.74
Sucrose Synthase	SuSy	2	HOR-VU4Hr1G049500.7	4	54.46
Sucrose Synthase	SuSy	3	HOR-VU7Hr1G033230.8	7	54.39
Sucrose Synthase	SuSy	4	HOR-VU0Hr1G038330.13	2	88.52
Sucrose Synthase	SuSy	5	HOR-VU6Hr1G094880.19	6	126.4 8
Sucrose Synthase	SuSy	6	HOR-VU7Hr1G120520.1	7	140.6 2
Sucrose Synthase	SuSy	7	HOR-VU2Hr1G030870.1	2	54.24
Sucrose-6-Fructosyltransferase =vacINVx11	SFT	1	MLOC_67531.6	7	0.57
SucroseTransporter	SUT1		HOR-VU4Hr1G075200.3	4	81.57
SucroseTransporter	SUT2		HOR-VU5Hr1G000010.1	5	
SucroseTransporter	SUT3		HOR-VU1Hr1G035760.3	1	47.80
SucroseTransporter	SUT4		HOR-VU6Hr1G093600.9	6	
SucroseTransporter	SUT5		HOR-	2	123.6

Protein	Abkürzung	Isoform	Genelokus	Chromosom	cM
			VU2Hr1G112080.1		5
Tocopherol Cyclase	TC	1	HOR-VU1Hr1G060090.2	1	57.29
Triosephosphat-Translocator	TPT	1	HOR-VU1Hr1G016360.5	1	?
Triosephosphat-Translocator	TPT	2	HOR-VU3Hr1G032490.1	3	52.03
Tyrosin-Aminotrasnferase	TAT	1	AK368353	1	80.24
Tyrosin-Aminotrasnferase	TAT	2	HOR-VU1Hr1G071260	1	80.24
Tyrosin-Aminotrasnferase	TAT	3	HOR-VU6Hr1G081670.1	6	88.74
Tyrosin-Aminotrasnferase	TAT	4	MLOC_76303.1	1	47.66
Tyrosin-Aminotrasnferase	TAT	5	HOR-VU4Hr1G031510.16	4	50.64
Tyrosin-Aminotrasnferase	TAT	6	HOR-VU7Hr1G082450.1	7	75.42
UDP-glucose pyrophosphorylase	UGPase	1	HOR-VU5Hr1G087810.2	5	108.14
UDP-glucose pyrophosphorylase	UGPase	2	HOR-VU2Hr1G049570.2	?	?
vacular Invertase	vacINV	1	HOR-VU2Hr1G091910.6	2	77.27
vacular Invertase	vacINV	2	HOR-VU6Hr1G004010	6	10.41
vacular Invertase	vacINV	3	HOR-VU6Hr1G004010.1	6	10.62
vacular Invertase	vacINV	4	HOR-VU6Hr1G004000.1	6	10.13
vacular Invertase	vacINV	5	HOR-VU7Hr1G000250.3	7	0.39
vacular Invertase	vacINV	6	HOR-VU7Hr1G000260.2	7	0.39
vacular Invertase	vacINV	7	MLOC_17743.1	7	?
vacular Invertase	vacINV	8	HOR-VU7Hr1G000270.1	7	0.39
vacular Invertase	vacINV	9	HOR-VU0Hr1G018850.3	7	0.39
vacular Invertase	vacINV	10	HOR-VU7Hr1G001070.17	7	0.39
Vacuolar Glucose Transporter 3-like	VGT3-like		HOR-VU5Hr1G114020.4	5	151.88
Vlt Geranylgeranol Kinase	GerK	1	HOR-VU3Hr1G087680.2	3	98.37

