

Abschlussbericht Teilprojekt 11

Trockenstresstoleranter Weizen

Projektverbund

BayKlimaFit 2 – Starke Pflanzen im Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Dr. Lorenz Hartl und Dr. Manuel Spannagl (HMGU)
Am Gereuth 8
85354 Freising
Tel: 08161 71-3814
Email: lorenz.hartl@lfl.bayern.de

Berichtszeitraum:

1. Juni 2021 bis 30. November 2024



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Kurzzusammenfassung.....	6
2 Einführung.....	7
3 Zielstellung.....	9
3.1 AP1: Erfassung der $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung als Marker für Trocken- toleranz in Weizen.....	9
3.2 AP2: Phänotypisierung ausgewählter Linien unter Trockenstress	9
3.3 AP3: Transkriptomanalyse ausgewählter Linien unter Trockenstress.....	10
3.4 AP4: Identifizierung von Markergenen und Korrelation mit phänotypischen und ... populationsgenetischen Daten	10
4 Ergebnisse und Diskussion	12
4.1 AP1: Erfassung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung als Marker für Trocken- toleranz in Weizen.....	12
4.1.1 Messung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses	12
4.1.2 Identifizierung von genomischen QTL für die Ergebnisse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - Isotopendiskriminierung	13
4.1.3 Auswahl der extremen Weizenlinien für nachfolgende Analysen.....	14
4.1.4 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse	17
4.1.5 Stellungnahme zum Projekterfolg.....	17
4.2 AP2: Phänotypisierung ausgewählter Linien unter Trockenstress	18
4.2.1 Digitale Biomasse	20
4.2.2 Tausendkorngewicht.....	21
4.2.3 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse	24
4.2.4 Stellungnahme zum Projekterfolg.....	25
4.3 AP3: Transkriptomanalyse ausgewählter Linien unter Trockenstress.....	25
4.3.1 Transkriptomanalyse.....	25
4.3.2 Genfunktionsanalyse.....	29
4.3.3 Erstellung von Co-Expressionsnetzwerken	32
4.3.4 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse	36
4.3.5 Stellungnahme zum Projekterfolg.....	36
4.4 AP4: Identifizierung von Markergenen und Korrelation mit phänotypischen und ... populationsgenetischen Daten	36
4.4.1 Korrelationsanalyse.....	37

4.4.2	Ableitung der Kandidatengene	40
4.4.3	Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse	43
4.4.4	Stellungnahme zum Projekterfolg.....	43
4.5	Aktualisierter Zeitplan.....	44
4.6	Einordnung der Projektergebnisse mit Bezug zum Klimawandel unter Berücksichtigung der Bayerischen Klima-Anpassungsstrategie	45
5	Veröffentlichungen	45
6	Vernetzungen zu weiteren Verbundpartnern bzw. zu thematisch ähnlich gelagerten Projektverbünden	46
7	Bestehende und entstandene Industriebeteiligung/-en	47
8	Zusammenfassung	48
9	Ausblick.....	49
	Literaturverzeichnis.....	50

Abkürzungsverzeichnis

A	photosynthetische Kapazität
BBCH	<u>B</u> iologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, <u>B</u> undessortenamt und <u>C</u> hemische Industrie. Die BBCH-Skala gibt Auskunft über das Entwicklungsstadium einer Kulturpflanze.
BMW	<u>B</u> ayerische <u>M</u> agic <u>W</u> heat-Population
C	<u>C</u> arbonium (Kohlenstoff)
CID	<u>C</u> arbon <u>I</u> sotope <u>D</u> iscrimination (Kohlenstoff-Isotopendiskriminierung)
CNV	Copy Number Variation (Variation der Genkopienzahl)
ds	drought stressed (trockengestresst)
eQTL	<u>e</u> xpression <u>Q</u> uantitative <u>T</u> rait <u>L</u> oci (Genompositionen welche Unterschiede in der Expression eines Gens beschreiben)
G	stomatäre Leitfähigkeit
HMGU	Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
HMGU-EUS	Helmholtz Zentrum München - Abteilung für Experimentelle Umweltsimulation
IR-MS	<u>I</u> sotope <u>R</u> atio <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometer (Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie)
IWGSC	<u>I</u> nternational <u>W</u> heat <u>G</u> enome <u>S</u> equencing <u>C</u> onsortium (Internationales Konsortium zur Sequenzierung des Weizengenoms)
LfL	Bayerische <u>L</u> andesanstalt für <u>L</u> andwirtschaft
N	<u>N</u> itrogenium (Stickstoff)
NGS	<u>N</u> ext <u>G</u> eneration <u>S</u> equencing
NPK	Dünger: N für Stickstoff, P für Phosphor und K für Kalium
PAV	Presence/Absence Variation (Variation im Vorhandensein oder in der Abwesenheit eines Genomabschnitts mit einem oder mehreren Genen, Extremform der CNV)
pF	<u>p</u> von Potenz, <u>E</u> von freier Energie des Wassers
PWP	<u>P</u> ermanenter <u>W</u> elkepunkt
QTL	<u>Q</u> uantitative <u>T</u> rait <u>L</u> oci (Genompositionen eines quantitativ vererbten Merkmals)
RNA	engl. Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SOC	<u>S</u> oluble <u>O</u> rganic <u>C</u> arbon (gelöster organischer Kohlenstoff)

TOC	<u>T</u> otal <u>O</u> rganic <u>C</u> arbon (gesamter organischer Kohlenstoff)
TKG	<u>T</u> ausend <u>k</u> or <u>n</u> g <u>e</u> wicht
WUE	<u>W</u> ater <u>U</u> se <u>E</u> fficiency (Wassernutzungseffizienz)
ww	well-watered (gut bewässert)

1 Kurzzusammenfassung

Winterweizen ist neben Mais die bedeutendste landwirtschaftliche Kulturpflanze in Bayern und reagiert auf klimatische Veränderung, wie z. B. Trockenheit, besonders empfindlich. Während den letzten Sommern wurden zum Teil dramatische Ertragseinbußen beim Winterweizen verzeichnet. Ausgehend von aktuellen Klimavorhersagen muss zunehmend mit ausgeprägten und langanhaltenden niederschlagsarmen Phasen insbesondere im Frühjahr und Frühsommer gerechnet werden. Das Merkmal „Trockentoleranz“ ist dabei von mehreren Faktoren abhängig und kann sich zwischen einzelnen Weizenpflanzen innerhalb einer Population und zwischen Pflanzen verschiedener Weizensorten sowohl im Zeitpunkt/Pflanzenstadium als auch in der Ausprägung erheblich unterscheiden.

Das Teilprojekt 11 hatte zum Ziel die molekularen Faktoren und Gene zu identifizieren, die an der Ausprägung der Trockentoleranz im Weizen beteiligt sind. Dazu wurden verschiedene für Bayern relevante Weizensorten systematisch auf Trockenstresstoleranz hin untersucht und diese Ergebnisse mit genomischen Daten korreliert. Dieses Wissen kann nun in Form von molekularen Markern für Wassernutzungseffizienz in die bestehende Züchtungsprogramme eingebunden werden.

Im Projekt wurden umfangreiche Phänotypisierungsversuche am Helmholtz Zentrum München (HMGU) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die 10 „extremsten“ Weizenlinien basierend auf ihrer im Feld gemessenen Wassernutzungseffizienz ausgewählt. Die Phänotypisierungsversuche umfassten jeweils eine Anordnung mit appliziertem Trockenstress und eine Anordnung mit Kontrollbedingungen (normale Bewässerung). Für alle Pflanzen wurden systematisch sowohl automatisiert über einen 3D-Multispektralscanner als auch manuell relevante Parameter wie Pflanzenhöhe, Kornertrag oder Biomasse bestimmt und anschließend vergleichend ausgewertet. Dabei konnten wie erwartet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Anordnungen beobachtet werden (unter anderem für Biomasse und Tausendkorngewicht), zum Teil auch zwischen den Gruppen mit hoher und niedriger Wassernutzungseffizienz. Um die den Beobachtungen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu identifizieren und besser verstehen zu können, wurde eine vergleichende Transkriptomdatenanalyse aller Weizenlinien aus dem Gewächshausversuch durchgeführt. Dabei wurden für alle Weizenlinien aus dem Trockenstressversuch Expressionsdaten erhoben und diese pro Gen zwischen den Linien sowie den Gruppen mit hoher und niedriger Wassernutzungseffizienz verglichen. Die in dieser Analyse identifizierten Gene mit signifikanten Expressionsunterschieden stellen Kandidaten für Markergene für Trockenstress(-toleranz) dar und wurden abschließend in Korrelation mit den Ergebnissen aus den Phänotypisierungsexperimenten sowie der Isotopendiskriminierungsmessung weiter charakterisiert und evaluiert.

2 Einführung

Die Toleranz der Kulturpflanzensorten gegenüber abiotischen Stressfaktoren, wie z. B. Trockenheit, Hitze oder Starkniederschläge, ist überaus bedeutsam für die nachhaltige Produktion in der Landwirtschaft. Winterweizen ist neben Mais die bedeutendste landwirtschaftliche Kulturpflanze in Bayern. Durch andauernde Züchtung wird versucht die Sorten an die sich verändernden Umweltbedingungen, bedingt durch den fortschreitenden Klimawandel, bestmöglich anzupassen und zu verbessern. Die in Bezug auf das Entwicklungsstadium des Weizens und auf die Dauer wenig vorhersagbaren Trockenstressereignisse stellen eine enorme Herausforderung für die Selektion der geeignetsten Linien dar. Diese selektierten Linien sollten dann zur Sortenzulassung und in den Sortenversuchen der Länder erfolgreich sein, um für den Anbau empfohlen zu werden.

Im Rahmen des Projekts werden Linien einer Population, die aktuelles Zuchtmaterial repräsentiert und für die bereits umfangreiche Feldversuchsdaten vorhanden sind, für detaillierte weitergehende Untersuchungen genutzt. Das Projekt stellt die Verknüpfung der im Feld erhobenen phänotypischen Daten zum $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis des Erntegutes, der Wurzelmorphologie im Rhizotron und den Expressionsdaten her. Die Integration mehrerer Weizensorten aus dem internationalen 10+Wheat Genomes-Sortiment erlaubt dabei allgemeine Rückschlüsse auf die mechanistische/molekulare Reaktion der unterschiedlichen Weizensorten auf Trockenstress, mit dem in Teilen Bayerns im Zuge des Klimawandels vermehrt zu rechnen ist.

Wesentliche Voraussetzung für die genomischen Analysen in Brotweizen sind die revolutionären und neuen genomischen Ressourcen für Weizen, an deren Erstellung die Mitglieder dieses Verbunds maßgeblich beteiligt waren. Im Rahmen mehrerer und andauernder Arbeiten wurden hier vollständige Referenzgenomsequenzen und Genkartierungen für verschiedene Weizensorten erstellt (Brenchley et al., 2012; IWGSC, 2014; IWGSC, 2018; 10+Wheat Genomes Project). Das Genom des Brotweizens besteht aus drei verschiedenen Subgenomen, seine Sequenz ist hoch-repetitiv und die Genomgröße übersteigt mit 15 Gigabasen die des menschlichen Genoms um das Fünffache. Auch im Vergleich mit anderen Getreidearten und Kulturpflanzen wie Reis, Gerste und Mais liegt das Weizengenom im Hinblick auf Genomgröße und genetische Komplexität an der Spitze. Die erwähnten genomischen Ressourcen erlauben nun erstmals präzise genomische Analysen im hochkomplexen Genom des Brotweizens und ermöglichen damit prinzipiell die Identifizierung von Markergenen und -allelen, die Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenheit haben. Dabei stellen Expressionsdaten, die in diesem Projekt für verschiedene Bedingungen (Trockenstress und Kontrolle) erhoben und analysiert wurden, im Zusammenspiel mit den Genomsequenzen ein mächtiges Instrument dar (Ramirez-Gonzalez et al., 2018).

Parallel zu den genomischen Ressourcen steht die Bayerische Magic Wheat (BMW)-Population mit 394 Linien zur Verfügung, die einen großen Teil der genetischen Variabilität im deutschen/mitteleuropäischen Zuchtmaterial erfasst (Stadlmeier et al. 2018). Für die Linien der BMW-Population stehen phänotypische Daten, u. a. zum Kornertrag aus neun Umwelten, zur Verfügung. Dabei sind auch Standorte wie Morgenrot bei Quedlinburg, die von Trockenheit beeinträchtigt waren.

Die $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung (CID) in der Biomasse (z. B. Blätter, Samen, Körner) stellt ein indirektes Auswahlkriterium für die Selektion von Pflanzen mit effizienter Wassernutzungseffizienz (WUE, engl. „Water Use Efficiency“) dar. Es existiert jedoch eine große genetische Variation im $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis unter und zwischen Pflanzenarten, die weitgehend durch genotypische Unterschiede in der stomatären Leitfähigkeit (g) und der photosynthetischen Kapazität (A) erklärt werden. Studien belegen, dass $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ eine positive und lineare Beziehung zum Verhältnis der CO_2 -Konzentration im Blattinneren und der CO_2 -Konzentration in der Atmosphäre aufweist (Condon et al 2004, Barbour et al. 2011). Dieses Verhältnis wird hauptsächlich durch die stomatäre Leitfähigkeit und die photosynthetische Kapazität beeinflusst. Es wird daher angenommen, dass ein hoher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Genotyp eine hohe stomatäre Leitfähigkeit, eine niedrige photosynthetische Kapazität oder beides ausdrückt, während bei einem niedrigen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Genotyp das Gegenteil angenommen werden kann. Es zeigte sich, dass das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis hoch vererblich ist und relativ leicht in Getreide züchterisch angepasst werden kann (Rebetzke et al. 2002). Die Messung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses ermöglicht Rückschlüsse auf grundlegende pflanzenphysiologische Prozesse und dient im vorliegenden Projekt neben allgemeinen phänotypischen Merkmalen als ein physiologisches Maß für die Anpassung an Trockenstress.

3 Zielstellung

Das Projekt hatte die Identifizierung von Markergenen für Trockentoleranz in modernen Brotweizensorten (*Triticum aestivum*) zum Ziel. Weizen ist eine der bedeutendsten Nutzpflanzen in Bayern. Während den letzten Sommern, die sich durch starke Trockenheit und Hitze auszeichneten, wurden zum Teil dramatische Ertragseinbrüche beim Winterweizen verzeichnet. Ausgehend von aktuellen Klimavorhersagen muss zunehmend mit ausgeprägten und langanhaltenden niederschlagsarmen Phasen insbesondere im Frühjahr und Frühsommer gerechnet werden. Moderne Brotweizensorten wurden lange Zeit mit dem Hauptziel der allgemeinen Ertragssteigerung gezüchtet, während im Zuge des Klimawandels nun auch die Widerstandsfähigkeit gegenüber abiotischen Stressoren zunehmend an Bedeutung gewinnt. Dabei ist das Merkmal „Trockentoleranz“ von einer Reihe an intrinsischen und extrinsischen Faktoren abhängig und kann sich innerhalb einer Population und zwischen einzelnen Weizensorten sowohl im Zeitpunkt/Pflanzenstadium als auch in der Ausprägung unterscheiden (Sallam et al., 2019). Vor diesem Hintergrund erscheint es besonders wichtig, die für diese Beobachtungen involvierten molekularen Faktoren und Gene zu identifizieren und als Marker für Trockenstresstoleranz verfügbar zu machen. Des Weiteren sollte im Projekt die Variabilität in der Trockentoleranz des für Bayern relevanten Elitezuchtmaterials systematisch untersucht werden. Die im Projekt gewonnen Erkenntnisse und Ergebnisse können dann in Form von diagnostischen Markern dazu beitragen, trockenstresstolerante Weizenlinien zu identifizieren und ihre positiven Eigenschaften in Züchtungsprogramme einzubringen.

3.1 AP1: Erfassung der $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung als Marker für Trockentoleranz in Weizen

Die Messung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses ist am HMGU etabliert (IR-MS-Labor von EUS) und wird routinemäßig für verschiedenste Pflanzenproben angewandt (z. B. Ghirardo et al. 2020). In einem ersten Schritt wurde das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis im Korn von 394 Weizenlinien der BMW-Population der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) bestimmt, die im Jahr 2019 am Standort in Morgenrot bei Quedlinburg unter Trockenstressbedingungen kultiviert wurden. Anhand dieser Messungen konnten in der LfL-Population Linien mit deutlich unterschiedlicher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur identifiziert werden. Die jeweils 5 extremen Linien (insgesamt 10) wurden für die detaillierte Phänotypisierung (in AP2) und die Transkriptomanalyse (in AP3) ausgewählt.

3.2 AP2: Phänotypisierung ausgewählter Linien unter Trockenstress

Die anhand ihrer $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur ausgewählten Linien wurden im Gewächshaus von HMGU-EUS in einer Sprossphänotypisierungsanlage (siehe Kap. 4.2, S. 16) unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und gezielt einem definierten Trockenstress ausgesetzt. Je Linie wurden 20 Töpfe bis zu einem BBCH-Stadium 31 unter gut bewässerten Bedingungen angezogen. Danach wurde die Bewässerung reduziert und die Bodenwasserspannung (Matrixpo-

tential) bis zum permanenten Welkepunkt (PWP: entspricht pF-Wert von 4,2) abgesenkt. Blattproben aller Linien wurden zu den Zeitpunkten vor Beginn des Trockenstresses (Fahnenblatt-2; F-2) und zur Kornfüllung (Fahnenblatt BBCH 71) entnommen. Sie dienten zum einen der Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur (löslicher [SOC, engl. „Soluble Organic Carbon“] und gesamt [TOC, engl. „Total Organic Carbon“] Kohlenstoff) und zur Transkriptomanalyse mittels „Next Generation Sequencing“ (NGS). Die Pflanzen wurden bis zur Kornreife kultiviert und geerntet. Die Körner wurden auf ihre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur (erlaubt den Vergleich zu den Freilanddaten aus AP1), C/N-Verhältnis und Proteingehalt hin untersucht. Am Ende des Versuchs wurden die Wurzelstöcke der Pflanzen gewaschen und biometrische Größen wie Wurzel-/Sprossverhältnis und Fein-/Grobwurzverhältnis ermittelt, um phänotypische Unterschiede und Anpassungen an den Wassermangel zu quantifizieren.

3.3 AP3: Transkriptomanalyse ausgewählter Linien unter Trockenstress

Analog zu den Versuchen in der Phänotypisierungsanlage wurden die Transkriptome der 10 ausgewählten Linien im Fahnenblattstadium analysiert. Hierbei wurde zunächst die absolute Expressionsstärke der einzelnen Gene ermittelt und diese dann in Bezug gesetzt mit Daten aus dem Weizenexpressionsatlas (Ricardo-Gonzalez et al., 2018). Zusammen mit der Einbettung der Daten in funktionale Expressionsnetzwerke (Ricardo-Gonzalez et al., 2018) erlaubte dies die Bestimmung der am stärksten differentiell exprimierten Gene zwischen den Extremlinien und damit der am stärksten korrelierten Expressionsmarker. Hinzu kamen Messungen des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses im Samen und weiterer biometrischer Eigenschaften wie in AP2 beschrieben. Die Transkriptomdaten wurden mithilfe robuster etablierter Analysepipelines und -strategien ausgewertet und sowohl mit vorhandenen Referenzgenom- als auch Transkriptomdaten des Weizens in Bezug gesetzt. Die dadurch errechneten differentiell exprimierten Gene wurden als potentielle Kandidaten weiter untersucht (siehe AP4).

3.4 AP4: Identifizierung von Markergenen und Korrelation mit phänotypischen und populationsgenetischen Daten

Im abschließenden Schritt wurden die zuvor für das Sortiment von 394 Weizenlinien erhobenen phänotypischen Daten für Trockenstress mit den bereits vorhandenen populationsgenetischen Daten (SNP-Daten für die BMW-Population aus Stadlmeier et al., 2018) und den in AP3 identifizierten Genkandidaten für Trockenstressmarker in Korrelation gebracht. Dazu wurden SNP-Daten-Haploblöcke auf dem Weizengenom analysiert und definiert. Diese Haploblöcke beschreiben für mehrere Linien gemeinsame genomische Abschnitte und wurden insbesondere (aber nicht ausschließlich) für die Bereiche der Markergenkandidaten mit den phänotypischen Daten zu Trockenstress (aus AP2) korreliert. Dies ermöglichte die Identifizierung von diagnostischen Markergenen für erhöhte oder verminderte Trockentoleranz. Als weiteres Kriterium für die Auswahl der Markergene wurde deren chromosomale Verteilung festgelegt. Die Markergene werden im Anschluss im Hinblick auf ihre genomischen Eigenschaften (Expression, Genfunktion, Single Nucleotide Polymorphisms [SNP], Genfamilie und Copy Number Variation [CNV] und Presence/Absence Variation [PAV]) charakterisiert. Neben der Entwicklung

selektiver Markergene und eQTL für Trockentoleranz in Weizen können mit der Integration der Expressionsdaten auf Netzwerkebene in Zukunft tiefe molekulare Einblicke in die Regelmechanismen gewonnen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 AP1: Erfassung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung als Marker für Trockentoleranz in Weizen

4.1.1 Messung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses

In einem ersten Schritt wurde das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis im Korn von 394 Weizenlinien der BMW-Population der LfL bestimmt, die in 2019 am Standort Morgenrot bei Quedlinburg unter Trockenstressbedingungen kultiviert wurden. Je Linie wurde an der LfL Korn gemahlen. Mehlprouben wurden in Zinkkapseln eingewogen und die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur im IR-MS-Labor von EUS am HMGU gemessen. Ergänzend dazu wurden der C- und N-Gehalt in den Proben bestimmt. Aus den N-Messungen kann dann der Proteingehalt des Korn ermittelt werden. Insgesamt wurden 394 Proben mit zwei technischen Wiederholungen gemessen. Tabelle 1 zeigt einen Auszug aus der resultierenden Ergebnistabelle.

Parzelle	Linie	ProbenID Labor	Wiederholung	Block	Probe	N-Gehalt	SD	Cv	C-Gehalt	SD	Cv	C/N	$\delta^{13}\text{C}$	SD
11001	BMW2114	GK2106038	1	1	11001	2,18	0,03	1,2	41,3	0,1	0,3	18,9	-26,91	0,08
11002	BMW2366	GK2106039	1	1	11002	1,95	0,07	3,5	40,9	0,1	0,1	21,0	-26,12	0,05
11003	BMW2300	GK2106040	1	1	11003	2,00	0,02	1,0	40,2	0,1	0,1	20,1	-25,70	0,10
11004	Reform	GK2106041	1	1	11004	2,04	0,14	6,7	40,2	0,1	0,3	19,7	-25,98	0,07
11005	BMW2453	GK2106042	1	1	11005	2,18	0,10	4,6	40,9	0,1	0,3	18,8	-26,09	0,02
11006	BMW2297	GK2106043	1	1	11006	2,10	0,00	0,0	40,7	0,0	0,0	19,4	-26,46	0,10
11007	BMW2241	GK2106044	1	1	11007	2,07	0,03	1,5	40,9	0,0	0,1	19,8	-26,21	0,05
11008	BMW2062	GK2106045	1	1	11008	2,18	0,06	2,9	41,3	0,0	0,1	18,9	-25,53	0,01
11009	BMW2307	GK2106046	1	1	11009	2,15	0,04	1,8	41,1	0,1	0,3	19,2	-26,63	0,10
11010	Julius	GK2106047	1	1	11010	2,12	0,05	2,3	41,2	0,1	0,2	19,4	-25,71	0,00
11011	BMW2237	GK2106048	1	2	11011	2,25	0,07	2,9	41,0	0,2	0,4	18,2	-25,87	0,03
11012	BMW2321	GK2106049	1	2	11012	2,01	0,05	2,3	40,4	0,2	0,6	20,1	-26,42	0,10
11013	BMW2029	GK2106050	1	2	11013	2,04	0,06	2,8	40,8	0,2	0,4	20,0	-26,34	0,02
11014	BMW2473	GK2106051	1	2	11014	1,89	0,06	3,4	40,8	0,1	0,1	21,6	-26,34	0,10
11015	BMW2290	GK2106052	1	2	11015	2,12	0,07	3,2	40,8	0,2	0,5	19,3	-26,44	0,03
11016	BMW2173	GK2106053	1	2	11016	2,36	0,10	4,4	41,0	0,3	0,6	17,4	-25,55	0,05
11017	BMW2493	GK2106054	1	2	11017	2,31	0,13	5,5	41,3	0,0	0,0	17,9	-25,79	0,01
11018	BMW2269	GK2106055	1	2	11018	2,19	0,00	0,1	41,1	0,0	0,0	18,7	-25,89	0,00
11019	BMW2426	GK2106056	1	2	11019	2,21	0,04	1,7	41,2	0,0	0,0	18,6	-26,13	0,03
11020	BMW2100	GK2106057	1	2	11020	2,27	0,04	1,8	41,2	0,0	0,0	18,1	-25,80	0,05
11021	BMW2005	GK2106058	1	3	11021	2,28	0,02	0,9	41,1	0,1	0,2	18,0	-25,97	0,04
11022	BMW2151	GK2106059	1	3	11022	2,34	0,02	0,9	41,0	0,2	0,5	17,5	-25,96	0,08
11023	BMW2179	GK2106060	1	3	11023	2,21	0,09	4,2	41,2	0,0	0,0	18,7	-26,03	0,02
11024	BMW2073	GK2106061	1	3	11024	2,14	0,04	1,7	41,2	0,1	0,3	19,2	-25,77	0,03
11025	BMW2082	GK2106062	1	3	11025	2,27	0,07	2,9	41,3	0,0	0,1	18,2	-25,92	0,02

Tabelle 1: Auszug aus der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ergebnistabelle. Es sind die Messergebnisse der ersten 25 Weizenlinien exemplarisch dargestellt.

Anhand dieser Messungen konnten in der LfL-Population Linien mit deutlich unterschiedlicher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur identifiziert werden. Die jeweils fünf extremen Linien (insgesamt 10) wurden dann für die detaillierte Phänotypisierung (in AP2) und die Transkriptomanalyse (in AP3) ausgewählt (siehe Details und zusätzliche Auswahlkriterien im Bericht nachfolgend). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die allgemeine Versuchsanordnung.

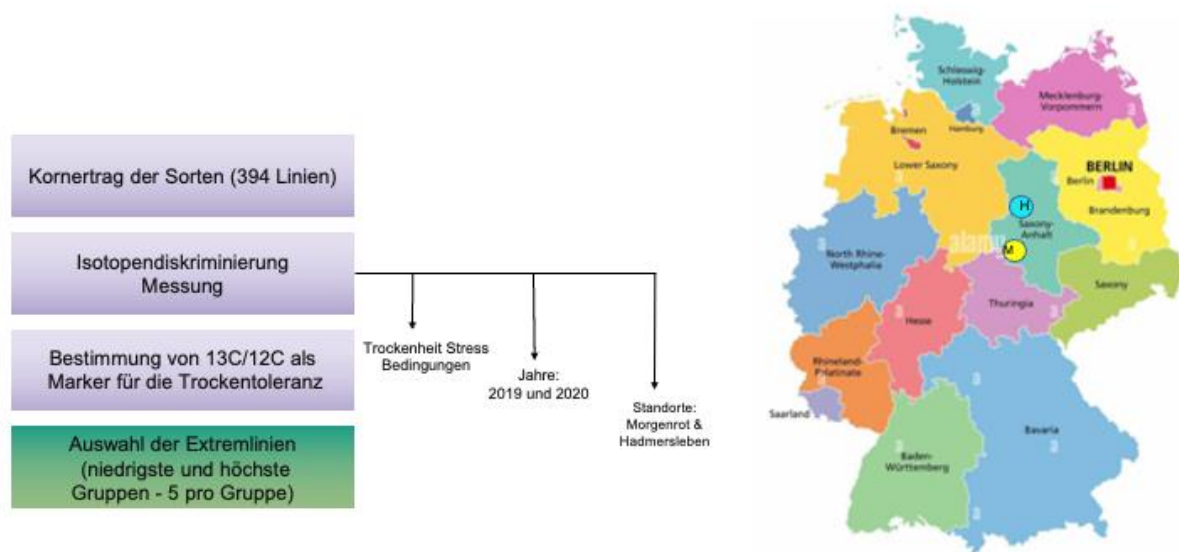


Abbildung 1: Zusammenfassung der Versuchsanordnung für die Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis im Korn von 394 Weizenlinien der BMW-Population; M bezeichnet den Standort Morgenrot bei Quedlinburg; H bezeichnet den Standort Hadmersleben.

4.1.2 Identifizierung von genomischen QTL für die Ergebnisse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Quantitative Trait Loci (QTL) und genomischen Regionen in Weizen, welche signifikant assoziiert sind mit sowohl den oben beschriebenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messwerten als auch mit den bei Feldversuchen erhobenen phänotypischen Daten.

Dazu wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messergebnisse mit den phänotypischen Daten in Korrelation gesetzt und statistisch ausgewertet. Als genotypische Daten wurden für die BMW-Population bereits bestehende Marker (sogenannte 20k SNP Marker) verwendet sowie, als genomische Datengrundlage, die Weizen-Referenzgenomsequenz mit Annotation (IWGSC RefSeq v1.1 2020). Die 20k SNP-Daten wurden zunächst wie folgt gefiltert: weniger als 10% „missing values“ (Datenpunkte mit nicht ausreichender Abdeckung durch Sequenzierungsdaten) und eine „minor allele frequency“ (relative Häufigkeit des selteneren Allels) von kleiner 0,01. Durch Anwendung dieser Filterkriterien reduzierte sich die Zahl der anwendbaren SNP-Marker auf 10.842. Bei Verwendung genau eines SNP-Markers pro Locus auf der sogenannten „linkage map“ verblieben schließlich 2.804 SNP-Marker, welche beim „Interval-Mapping“ für die QTL-Identifizierung zum Einsatz kamen. Mithilfe einer modifizierten R-Funktion aus dem mpMap Software-Paket konnten insgesamt sechs verschiedene QTL auf dem Weizengenom identifiziert werden. Diese sind in Abbildung 2 dargestellt.

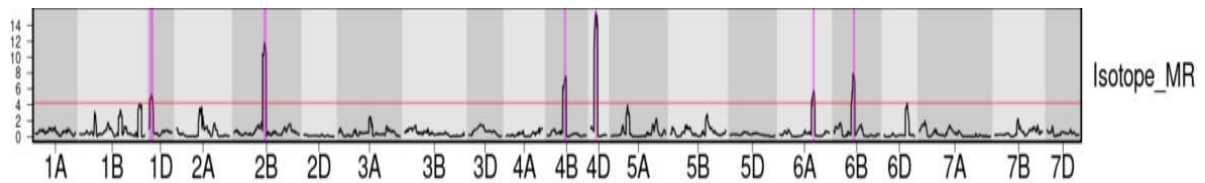


Abbildung 2: Ergebnisse der QTL-Analyse auf den 394 Weizenlinien der BMW-Population. Untersucht wurde der Zusammenhang der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messergebnisse mit den zuvor erhobenen phänotypischen und genotypischen Daten. Dargestellt sind die insgesamt 21 Chromosomen von Brotweizen – je sieben für die drei Subgenome A, B und D.

Die erfolgreiche Identifizierung von gleich sechs QTL für die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung stellte einen bedeutenden Zwischenschritt dar auf der Suche nach Markern für Trockenstresstoleranz in den 394 Weizenlinien der BMW-Population.

4.1.3 Auswahl der extremen Weizenlinien für nachfolgende Analysen

Für die Auswahl der im Hinblick auf ihre WUE, beschrieben durch ihr gemessenes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis, „extremsten“ (hoch oder niedrig) Weizenlinien wurden aufbauend auf den oben identifizierten QTL verschiedene weitere Kriterien herangezogen. Auf der Grundlage der nachfolgend dargestellten Analysen wurden jeweils 5 Weizenlinien ausgewählt (insgesamt 10), welche die beiden „Extrema“ im Hinblick auf die intrinsische WUE (hoch/niedrig) im kombinierten Datensatz abbildeten und diese zusätzlichen Kriterien erfüllten.

4.1.3.1 Allelische Fixierung der sogenannten „dwarfing genes“

Innerhalb der oben beschriebenen QTL wurden auch die *dwarfing* Gene Rht-D1 auf Chromosom 4D sowie Rht-B1 auf Chromosom 4B identifiziert. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Pflanzenhöhe und sind ein bedeutendes Merkmal in der Pflanzenzucht. In unserem Pflanzenmaterial wurden zwei verschiedene Allele für diesen Locus bestimmt, Wildtyp und mutiert. Letztere Variante führt zu Pflanzen mit niedrigerer Wuchshöhe (ein wichtiges Merkmal für bessere Standfestigkeit) und damit zu niedrigerer Transpirationseffizienz und höherer WUE. Um zu verhindern, dass dieser starke Effekt der *dwarfing* Gene andere Effekte in der WUE überdeckt, wurden nur Weizenlinien ausgewählt, welche die Wildtyp-Ausprägung für beide Gene aufweisen und damit monomorph hinsichtlich dieses Merkmals sind. Abbildung 3 zeigt einen Ausschnitt aus der Merkmalstabelle für die *dwarfing* Genes und ihrer Allele (Base innerhalb des Genes in Ausprägung G für Rht-D1 und C für Rht-B1). Die insgesamt 10 Kandidatenlinien (G – C), die für die nachfolgenden Analysen ausgewählt wurden, sind in roter Farbe dargestellt.

	name	RB1	RD1	Isotope
1	BM W2218	C	G	-25.1038711606774
2	BM W2231	C	G	-25.2238358503856
3	BM W2364	C	G	-25.2595393844228
4	BM W2007	C	G	-25.2678566349949
5	BM W2267	C	G	-25.2843986768446
6	BM W2232	C	G	-25.315022318589
7	BM W2025	C	G	-25.3376271373111
8	BM W2496	C	G	-25.3461465167217
9	BM W2296	C	G	-25.3511095822535
10	BM W2208	C	G	-25.3633692586573
11	BM W2098	C	G	-25.3742430799055
12	BM W2063	C	G	-25.3748364298429
13	BM W2162	C	G	-25.3887467810795
14	BM W2428	C	G	-25.3925878083046
15	BM W2157	C	G	-25.3982334558888
16	BM W2006	C	G	-25.4241373179877
17	BM W2041	C	G	-25.4346385625534
18	BM W2130	C	G	-25.4367393384468
19	BM W2449	C	G	-25.4398984562245
20	BM W2173	C	G	-25.4404901717434
21	BM W2061	T	G	-25.4665224158687
22	BM W2167	T	G	-25.4686076647633
23	BM W2062	T	G	-25.4725854195885
24	BM W2265	C	G	-25.4764336119541
25	BM W2163	C	G	-25.4937503300687
26	BM W2048	C	G	-26.1797065096418
27	BM W2451	C	G	-26.1816979359736
28	BM W2351	C	G	-26.1847759432343
29	BM W2144	T	G	-26.18934142685
30	BM W2286	C	G	-26.1958470627125
31	BM W2195	C	G	-26.2042059581441
32	BM W2445	C	G	-26.2231665215586
33	BM W2277	C	G	-26.2339110329806
34	BM W2468	C	G	-26.2400561754344
35	BM W2193	Y	G	-26.2454109320043
36	BM W2230	C	G	-26.2506001807959
37	BM W2340	C	G	-26.2545369225166
38	BM W2043	C	G	-26.2615702854686
39	BM W2156	C	G	-26.278895688078
40	BM W2188	C	G	-26.2831399722654
41	BM W2352	C	G	-26.3161565598379
42	BM W2190	C	G	-26.3329316652146
43	BM W2306	C	G	-26.3429081102862
44	BM W2140	C	G	-26.3499485428483
45	BM W2456	T	G	-26.3740334479374
46	BM W2089	T	G	-26.3801200425717
47	BM W2321	C	G	-26.3917003304367
48	BM W2297	C	G	-26.4076483069551
49	BM W2388	T	G	-26.4392793080994
50	BM W2095	C	G	-26.5052118038254

Abbildung 3: Ausschnitt aus der Merkmalstabelle für die unterschiedliche Ausprägung der *dwarfing* Gene Rht-D1 (RB1) und Rht-B1 (RD1). Rot markiert: ausgewählte Kandidatenlinien.

4.1.3.2 Genetische Distanz zwischen den verschiedenen Weizenlinien

Um einen hohen Grad der genetischen Distanz zwischen den ausgewählten Weizenlinien sicherzustellen, wurden die (oben beschriebenen) genotypischen Daten verglichen und mit den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messergebnissen in Verbindung gebracht. Ein hohes Maß an genetischer Distanz zwischen den Linien ist insbesondere im Hinblick auf die nachfolgenden Analysen (Phänotypisierung, AP2, Transkriptomanalyse AP3) wünschenswert, da es auch die Wahrscheinlichkeit für deutlichere Ausprägungen im Material im Hinblick auf Trockenstress-toleranz bzw. -anfälligkeit erhöht. Dazu wurde in Abbildung 4 die genetische Distanz der je 25 Weizenlinien mit höchstem und niedrigstem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Messwert berechnet und analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte eine Aufteilung der gewählten Linien in verschiedene, abgegrenzte Gruppen mit ausreichender genetischer Distanz (zu erkennen anhand der Clusterstruktur oben und rechts seitlich).

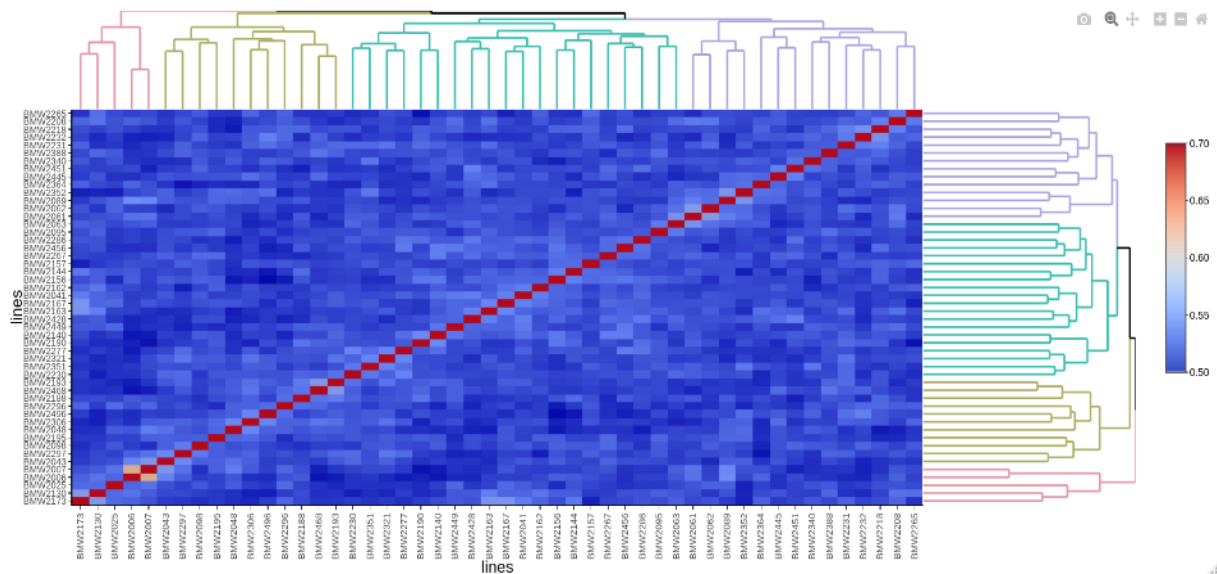


Abbildung 4: Darstellung der genetischen Distanz der je 25 Weizenlinien mit höchstem und niedrigstem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Messwert.

4.1.3.3 Unterschiede in den Messergebnissen der WUE zwischen Wiederholungen in ausgewählten Weizenlinien

Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messungen wurden in zwei Wiederholungen durchgeführt. Um die Zuverlässigkeit der Messungen bei der Auswahl der Weizenlinien sicherzustellen, wurden die Messwerte der Wiederholungen der 50 Kandidatenlinien systematisch miteinander verglichen. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Je kleiner der Unterschied zwischen den Messwerten zweier Wiederholungen, umso zuverlässiger wurde dieser Messpunkt eingeschätzt. Die unter Berücksichtigung der bisher genannten Kriterien (*dwarfing* Gene, genetische Distanz) für die weiteren Analysen ausgewählten Weizenlinien sind in Abbildung 5 (X-Achse) mit Farbe markiert und weisen hohe Übereinstimmungen bezüglich ihrer $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Messwerte auf bzw. zeigen konsistent hohe Extremata.

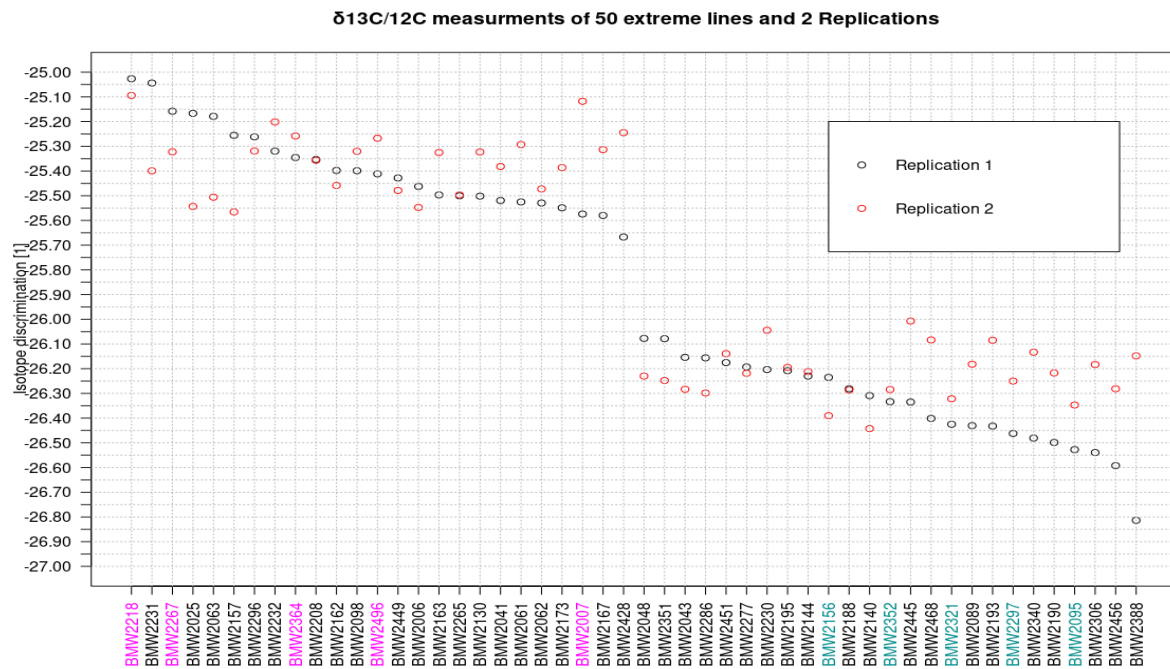


Abbildung 5: Ergebnisse der Analyse der CID ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) zwischen Wiederholungen in 50 ausgewählten Weizenlinien. Die für die nachfolgenden Analysen ausgewählte Linien zeigen konsistent hohe (pinke Farbe) bzw. konsistent niedrige $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messwerte (grüne Farbe).

4.1.4 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die in AP1 erhobenen Messungen zur intrinsischen Wassernutzungsfähigkeit der verschiedenen Weizenlinien aus der BMW-Population stellen für sich bereits ein wichtiges Ergebnis dar. Sie beschreiben die Fähigkeit der einzelnen Weizenlinien Wasser zu verwerten, was insbesondere unter Mangelbedingungen eine wichtige agronomische Eigenschaft darstellt. Unsere Ergebnisse ermöglichen eine gezielte Auswahl geeigneter Weizenlinien für bestimmte zu erwartende Standortbedingungen. Mit Hilfe der vorhandenen genetischen (SNPs) und genomischen Daten (Weizen Referenzgenomsequenz) war es uns möglich insgesamt sechs verschiedene genomische Regionen zu identifizieren welche mit dem Merkmal der Wassernutzungseffizienz assoziiert sind. Diese können direkt in der Züchtung als Marker für Trockenstresstoleranz genutzt werden, und stellen die Grundlage dar für eine spätere, detaillierte Suche nach einzelnen Kandidatengenen oder genetischen Faktoren innerhalb dieser Regionen. Darüber hinaus dienen uns die WUE Messergebnisse (in Form der jeweils „extremen“ Linien) als Ausgangspunkt für die detaillierte Aufklärung von an Trockenstresstoleranz beteiligten genetischen Faktoren (im Weiteren beschrieben).

4.1.5 Stellungnahme zum Projekterfolg

Die in AP1 geplanten Ziele wurden in Form der WUE-Messergebnisse (und der daraus gebildeten Gruppen von Weizenlinien mit hoher und niedriger WUE), QTL-Analysen mit sechs signifikant assoziierten genomischen Regionen und Marker-Kandidaten vollumfänglich erreicht.

4.2 AP2: Phänotypisierung ausgewählter Linien unter Trockenstress

Zehn ausgewählte Linien wurden im Gewächshaus des HMGU in einer Sprossphänotypisierungsanlage unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und gezielt einem definierten Trockenstress ausgesetzt. Dazu wurden die 10 ausgewählten Winterweizensorten gekeimt (Anzucht in 200 mL Töpfen), für 8 Wochen in einer Klimakammer des HMGU bei 4°C vernalisiert und anschließend über 2 Wochen an das Klima des Gewächshauses angepasst. Danach wurden die Jungpflanzen in 5,5 Liter Töpfe überführt (Kultursubstrat: Quarzsand [1:1,2 (w/w)]). Das Kultursubstrat bestand aus organischem Bodenmaterial (Hochmoortorf, Zersetzungsgrad H2-H5), Rohton, Düngemittel (kohlensauer Kalk, NPK und Einheitserde Typ1; der Quarzsand hat eine Korngröße von 0.6 – 1.2 mm).

Die Sprossanlage verfügt über insgesamt 195 Stellplätze für Töpfe (39 Träger mit je 5 Pflanzen im Topf à 5,5 Liter), die über Transport- und Lagerstrecken automatisch zwischen der Messkabine, der Bewässerungsstation und den Lagerabschnitten bewegt werden. Die Messkabine ist ausgestattet mit einem 3D-Multispektralscanner "PlantEye F500" (Phenospex, Heerlen, Niederlande) zur Erfassung oberirdischer, pflanzenrelevanter Wachstums- und Gesundheitsparameter. In der Messkabine befindet sich auch eine Waage. Die Gewichtsbestimmung dient als Steuergröße für das Bewässerungssystem. Je Linie wurden 19 - 20 Töpfe bis zu einem BBCH-Stadium 31 unter gut bewässerten Bedingungen angezogen. Danach wurde die Bewässerung für die Pflanzen, welche Trockenstress ausgesetzt werden sollten, reduziert, und die Bodenwasserspannung (Matrixpotential) bis zum permanenten Welkepunkt (PWP: entspricht pF-Wert von 4,2) abgesenkt. Blattproben aller Linien wurden zu den Zeitpunkten vor Beginn des Trockenstress (Fahnenblatt-2; F-2) und zur Kornfüllung (Fahnenblatt BBCH 71) entnommen. Sie dienten zur Transkriptomanalyse mittels NGS (siehe nächstes Kapitel). Eine zwischenzeitliche Ernte („intermediate harvest“) wurde innerhalb des Zeitfensters 21-30 Tage nach Beginn des Trockenstress durchgeführt, mit dem Ziel den frühen Effekt des Trockenstress erfassen zu können. Die Pflanzen wurden anschließend bis zur Kornreife kultiviert und geerntet („final harvest“).



Abbildung 6: Bilder der Anzucht von 10 Winterweizensorten: während der 8-wöchigen Vernalisierungsphase in einer Klimakammer des HMGU (oben links), bei Beginn des Versuchs in der Sprossphänotypisierungsanlage im Gewächshaus (oben rechts) und in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien (untere Reihe).

Die vergleichende Analyse der phänotypischen Ergebnisse dieses Versuchs wird im Folgenden ausführlicher beschrieben. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden zwei Gruppen unterschieden: Die Weizenlinien mit hoher gemessener intrinsischer Wassernutzungseffizienz („High CID“, jeweils 5 Linien; in schwarzer Farbe beschriftet; siehe Abbildungen 7 und 9) sowie mit niedriger Wassernutzungseffizienz („Low CID“, jeweils 5 Linien; in roter Farbe beschriftet; siehe Abbildungen 7 und 9). Die folgenden Ergebnisse stellen eine Auswahl der über 10 automatisiert und manuell gemessenen Pflanzenparameter dar. Diese wurden jeweils für die oben beschriebenen Gruppen vergleichend statistisch ausgewertet. Die Auswahl der hier gezeigten Parameter basiert auf der festgestellten statistischen Signifikanz sowie ihrer Bedeutung für die Pflanzenzucht. Weitere untersuchte Pflanzenparameter beinhalten unter anderem maximale und durchschnittliche Pflanzenhöhe, Blattfläche, Ährenzahl, Ährenge-
wicht und Samenanzahl.

4.2.1 Digitale Biomasse

Die digitale Biomasse beschreibt das Produkt aus Pflanzenhöhe und Blattfläche (gemessen mithilfe des 3D-Multispektralscanners). Deutlich erkennbar ist der Trockenstresseffekt (Abbildung 7), wie auch Unterschiede sowohl in der Kontrolle als auch im Stresszustand zwischen Sorten mit gemessener hoher und niedriger CID (Abbildung 8). Die digitale Biomasse wurde hierbei mit zwei komplementären Methoden quantitativ bestimmt: Aufnahmen mit einem 3D-Multispektralscanner (Phenospex) sowie manuelle Messungen. Mit Hilfe der Phenospex-Aufnahmen wird nicht destruktiv die 3-dimensionale Biomasse der individuellen Pflanzen gemessen. Die Ergebnisse beider Methoden wurden kombiniert, es zeigte sich dabei eine hohe Übereinstimmung. Die Pflanzen wurden zur Auswertung in zwei Gruppen unterteilt (hohe und niedrige CID). Aus Abbildung 7 geht der signifikante Unterschied in Biomasse zwischen den verglichenen Weizenlinien (niedrige WUE in roter Farbe; hohe WUE in schwarzer Farbe) unter Kontrollbedingungen (links in blauer Farbe) und Trockenstress (rechts in roter Farbe) klar hervor. Darüber hinaus konnten wir ebenso signifikante Unterschiede in der Biomasse zwischen den beiden Testgruppen (hohe und niedrige CID) feststellen (Abbildung 8). Während wir insgesamt signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Versuchsbedingungen als auch den Testgruppen feststellen konnten ist auch die Varianz zwischen den untersuchten Weizenlinien innerhalb einer Gruppe augenscheinlich. Diese Beobachtung wird ausführlicher in der Diskussion beleuchtet.

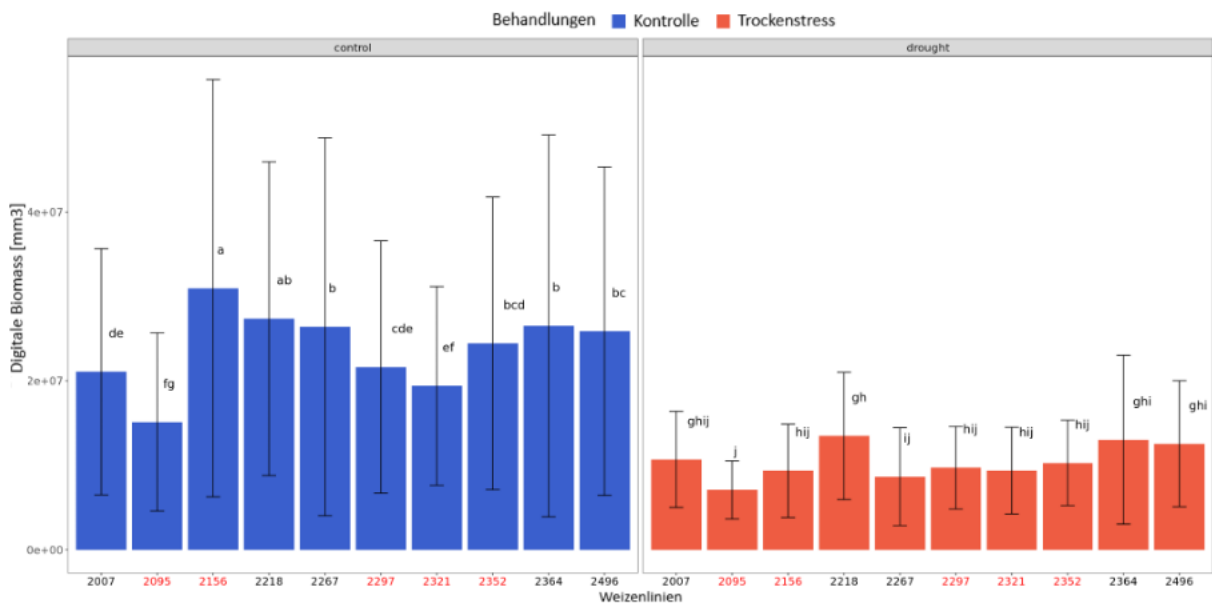


Abbildung 7: Digitale Biomasse der 10 Weizenlinien unter Kontrollbedingungen (links in blauer Farbe) und Trockenstress (rechts in roter Farbe). Statistische Analyse mit Tukey-Range-Test, gemeinsame Buchstaben indizieren keine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Messwerten. Im Durchschnitt wurden pro Linie 12 individuelle Pflanzen untersucht (6 als Kontrolle, 6 unter Trockenstress). Linien mit niedriger WUE sind in roter Farbe dargestellt, solche mit hoher WUE in schwarzer Farbe.

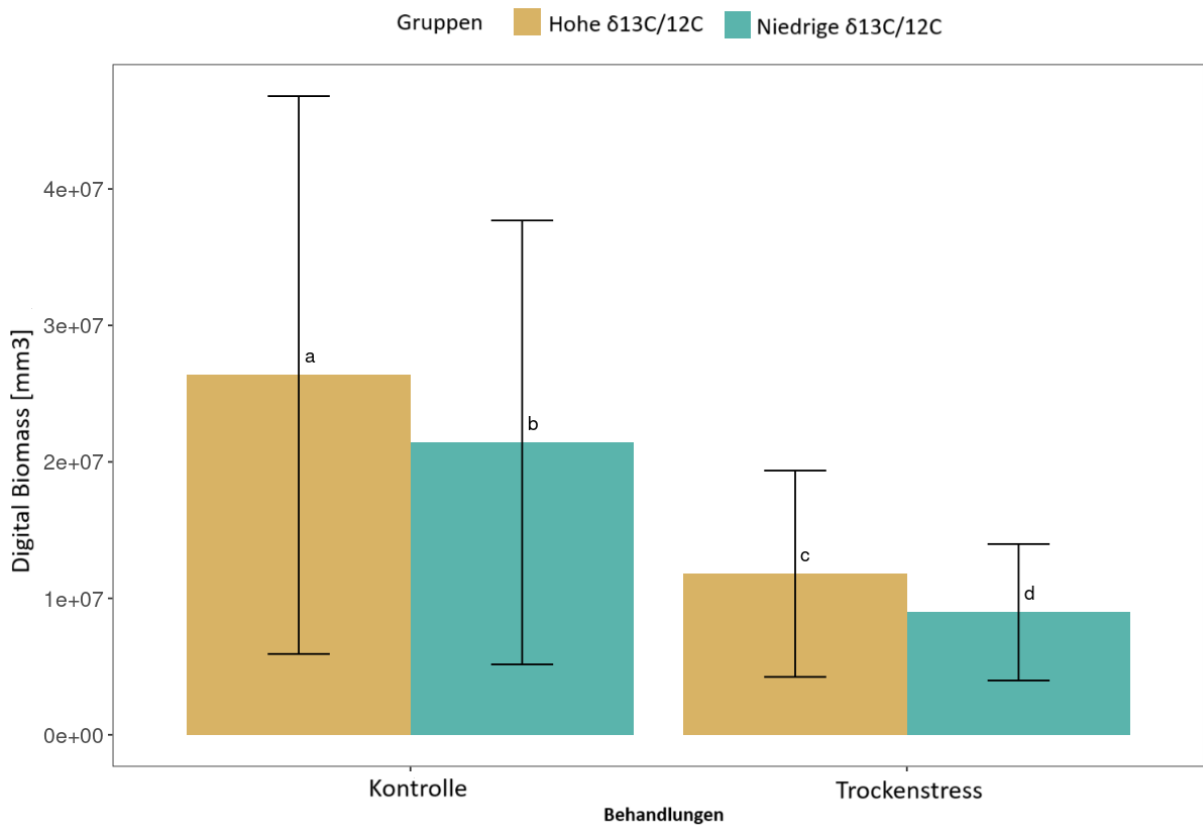


Abbildung 8: Digitale Biomasse der verglichenen Weizenlinien unter Kontrollbedingungen (links) und Trockenstress (rechts). Dabei wurde jeweils unterschieden für Weizenlinien mit hohem CID („High“, braun; jeweils 5 Linien) sowie mit niedrigem CID („Low“, grün; jeweils 5 Linien). Statistische Analyse mit Tukey-Range-Test, gemeinsame Buchstaben indizieren keine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Messwerten.

4.2.2 Tausendkorngewicht

Das Tausendkorngewicht (TKG) beschreibt die Masse von jeweils 1000 Körnern der gemessenen Weizensorten in der finalen Ernte. Das TKG stellt eine wichtige Kenngröße für den Ertrag einer Weizensorte dar. Hier sind besonders in der Gruppe der Linien mit niedriger Wassernutzungseffizienz signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Trockenstress zu beobachten (Abbildung 9 und 10), während diese für die Linien mit hoher WUE nicht signifikant ausfallen. Während für einige Weizenlinien wie „2007“ kaum erkennbare Unterschiede zwischen Trockenstress- und Kontrollbedingungen gemessen wurden, sind diese für die Linien „2496“ und „2267“ klar erkennbar. Diese Beobachtungen stellen eine wichtige Grundlage dar für die weitere Aufklärung der Unterschiede in der WUE der verschiedenen Weizenlinien (siehe auch Diskussion).

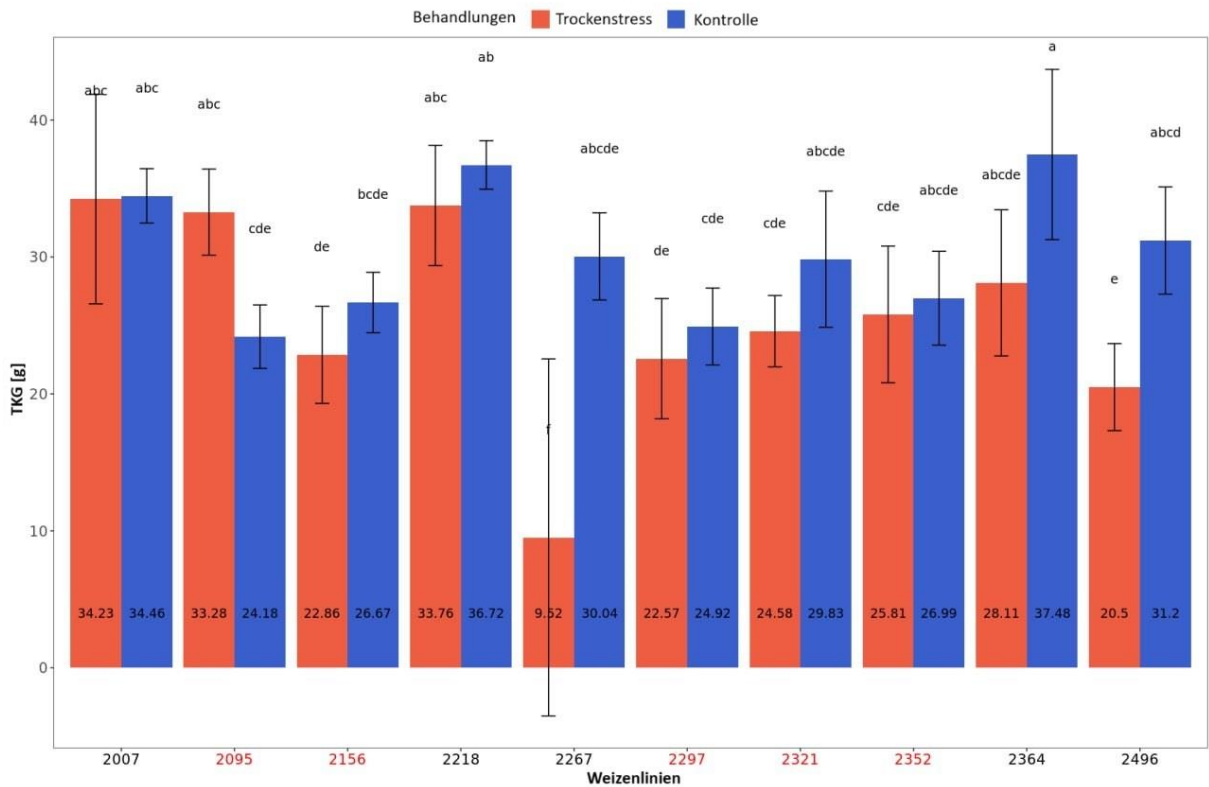


Abbildung 9: Tausendkorngewicht (y-Achse) der verglichenen Weizenlinien (x-Achse) unter Kontrollbedingungen (bewässert in blauer Farbe) und Trockenstress (in roter Farbe). Statistische Analyse mit Tukey-Range-Test, gemeinsame Buchstaben indizieren keine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Messwerten. Linien mit niedriger WUE sind in roter Farbe dargestellt, solche mit hoher WUE in schwarzer Farbe.

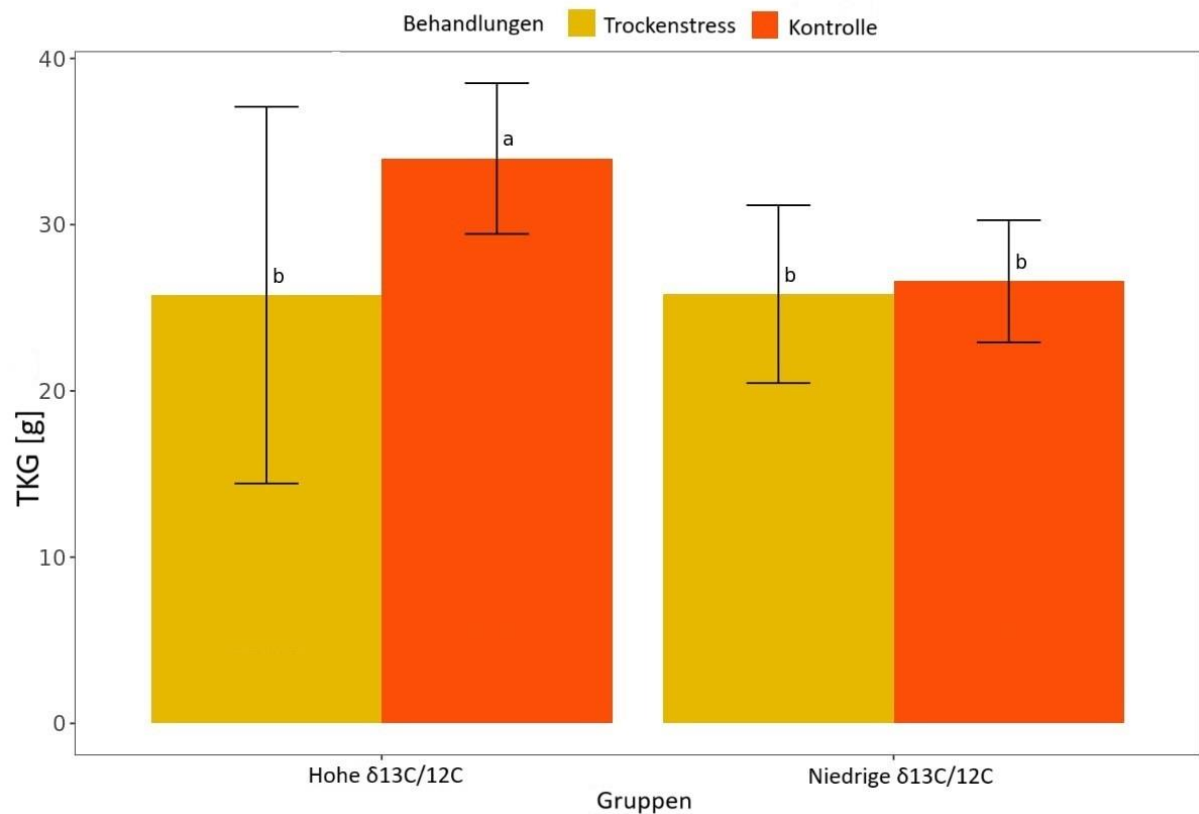


Abbildung 10: Tausendkorngewicht der 10 Weizenlinien unter Kontrollbedingungen (bewässert, rote Farbe) und Trockenstress (gelbe Farbe). Dabei wurde jeweils unterschieden für Weizensorten mit hohem gemessenen CID („High“, jeweils 5 Linien; links) sowie mit niedrigem CID („Low“, jeweils 5 Linien; rechts). Statistische Analyse mit Tukey-Range-Test, gemeinsame Buchstaben indizieren keine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Messwerten.

Als zusätzliche Evaluierung aller im Phänotypisierungsversuch erhobener Messwerte wurden diese mithilfe einer *Pearson* Korrelationsberechnung miteinander verglichen. Abbildung 11 liefert einen Überblick über das Ergebnis dieser Korrelationsberechnung. Die hohe Korrelation zwischen verwandten Merkmalen wie Pflanzenhöhe und Biomasse bestätigen die Relevanz und Verwertbarkeit der Messergebnisse. Zudem geben die Ergebnisse aus Abbildung 11 einen Hinweis darauf welche phänotypischen Merkmale miteinander am stärksten (positiv oder negativ) korrelieren.

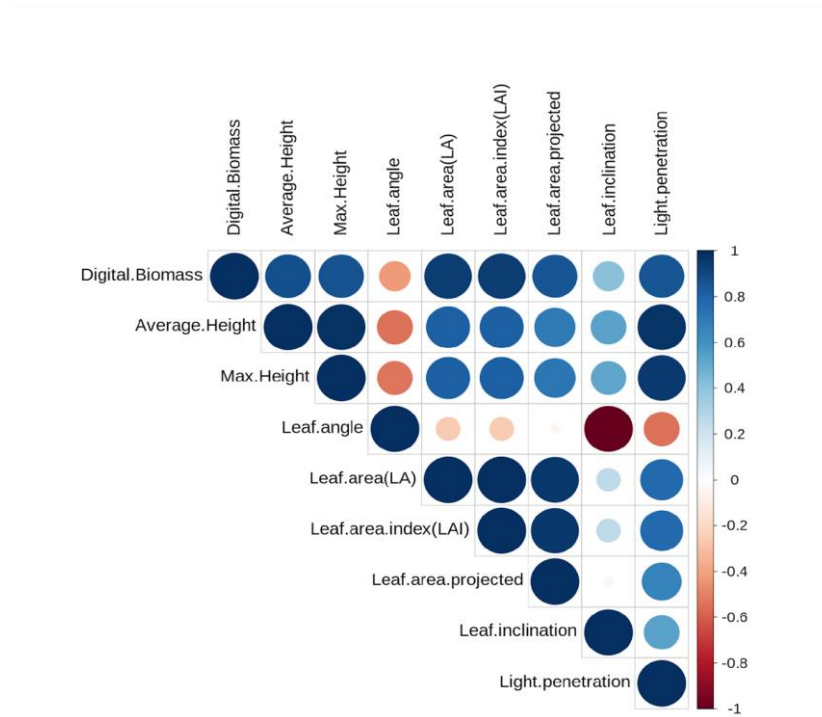


Abbildung 11: *Pearson's* Korrelationsberechnung ausgewählter gemessener Merkmale aus dem Phänotypisierungsversuch. Die Farbe der Kreise zeigt an, ob eine Korrelation positiv (blau) oder negativ (rot) ist. Die Größe der Kreise gibt das Signifikanzniveau an: je größer desto signifikanter ist die Korrelation zwischen den beiden Merkmalen.

4.2.3 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse von AP2 stellen eine umfangreiche, state-of-the-art und vergleichbare Sammlung von phänotypischen Daten für 10 Weizenlinien der BMW-Population dar. Während die Ergebnisse aus der Kontrollauswertung (ohne Trockenstress) bereits eine wertvolle Datengrundlage für den Vergleich der Linien untereinander darstellen (z. B. im Hinblick auf Merkmale wie Ertrag), liefern die Ergebnisse aus dem Trockenstressexperiment in Kombination mit der Kontrolle die Grundlage sowohl für die tiefgreifende Analyse von Trockenstresseffekten als auch für die Identifizierung von Markergenen. Unsere Ergebnisse aus AP2 zeigen wie erwartet für die Mehrzahl der gemessenen phänotypischen Merkmale deutliche Unterschiede zwischen den beiden experimentellen Bedingungen Kontrolle und Trockenstress. Dabei konnten wir allerdings zum Teil ausgeprägte Unterschiede zwischen einzelnen Weizenlinien beobachten. Dies ist insofern positiv zu bewerten, da die Weizenlinien im Wesentlichen nach ihrer Variabilität im Merkmal WUE ausgewählt wurden und es das Ziel war, möglichst auch in der Phänotypisierung eine ausgeprägte Varianz zu beobachten. Für die Gruppen der Weizenlinien mit hoher und niedriger WUE konnten wir für einen Teil der gemessenen Merkmale statistisch signifikante Unterschiede feststellen. Dies ist erwartbar, da einige Merkmale eine beschränkte intrinsische Variabilität aufweisen. Die in AP2 erzielten Ergebnisse bestätigen unseren Versuchsaufbau und stellen einen wichtigen Zwischenschritt bei der Suche nach Markergenen für WUE dar. Die Ergebnisse sind zudem direkt verwertbar bei der Selektion von Weizenlinien aus der BMW-Population hinsichtlich bestimmter Merkmale wie Tausendkorngewicht.

4.2.4 Stellungnahme zum Projekterfolg

Die in AP2 geplanten Ziele wurden in Form der umfangreichen Phänotypisierungsergebnisse sowie ihrer vergleichenden statistischen Auswertung erreicht. Zudem wurden Daten erhoben über die Wurzelanatomie der Weizenlinien unter Kontroll- und Trockenstressbedingung. Diese Ergebnisse wurden aber aufgrund ihrer bedingten Vergleichbarkeit bisher nicht ausgewertet, können aber zu einem späteren Zeitpunkt für andere Analysen herangezogen werden.

4.3 AP3: Transkriptomanalyse ausgewählter Linien unter Trockenstress

4.3.1 Transkriptomanalyse

In AP3 wurden Transkriptomdaten für alle 10 „extremen“ Weizenlinien (Auswahl siehe Kap. 4.1) generiert. Dazu wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten für alle Weizenlinien aus dem Gewächshausversuch im gleichen Entwicklungsstadium ein Fahnenblatt entnommen und RNA isoliert.

Für die ausgewählten 10 Genotypen wurden sowohl für die Kontroll-, wie auch für die Trockenstress-Bedingungen jeweils vier bis fünf biologische Replikate erstellt (Abbildung 12) und von einem externen Dienstleister sequenziert (*Illumina MySeq* 150 Basenpaare, 20 Millionen „paired-end reads“).

Proben aus dem Fahnenblatt			
10 Weizenlinien (jeweils 5 mit hoher und niedriger Wassernutzungseffizienz)	Kontrolle	Trockenstress	
	4/5 biologische Replikate	4/5 biologische Replikate	Insgesamt
			85

Abbildung 12: Übersicht über die im Projekt generierten Transkriptomdaten.

Die Sequenzdaten wurden mithilfe der am HMGU etablierten Analysepipeline für Transkriptomdaten umfangreich evaluiert. Dabei wurden keine auffälligen Ausreißer oder andere Qualitätsprobleme festgestellt. Alle Sequenzdaten wurden mithilfe der Software *kallisto* (version 3.27.0) auf der Weizen Referenzgenomsequenz (IWGSC version 1.1) verankert. Die daraus

abgeleiteten Expressionswerte wurden normalisiert und als sogenannte „Transcript-level abundance estimates“-Werte ausgegeben. Hierbei handelt es sich um Messwerte welche die normalisierte Expressionsstärke eines jeden Gens wiedergeben. Eine hierarchische Clusteranalyse der verschiedenen Proben mithilfe dieser Werte ergab in erster Linie eine Auftrennung der unterschiedlichen Genotypen (siehe Abbildung 13). Dies ist ein typisches und erwartetes Ergebnis bei Expressionsexperimenten mit verschiedenen Genotypen: die erste Hauptkomponente wird häufig durch den Genotyp bestimmt, und erst nachrangig durch die experimentellen Bedingungen und weitere Faktoren. Dies ist auch in Abbildung 13 entsprechend dokumentiert. Unter „Genotype“ (mittlere Spalte in der Legende unten) finden sich in der Regel die Proben aus Kontrolle und Trockenstress Experiment in einem Cluster unter Genotyp zusammengefasst, dort allerdings dann häufig weiter untergegliedert nach Kontrolle/Trockenstress. Die hier beobachtete Clusterstruktur unterstützt damit einen erfolgreichen Versuchsaufbau.

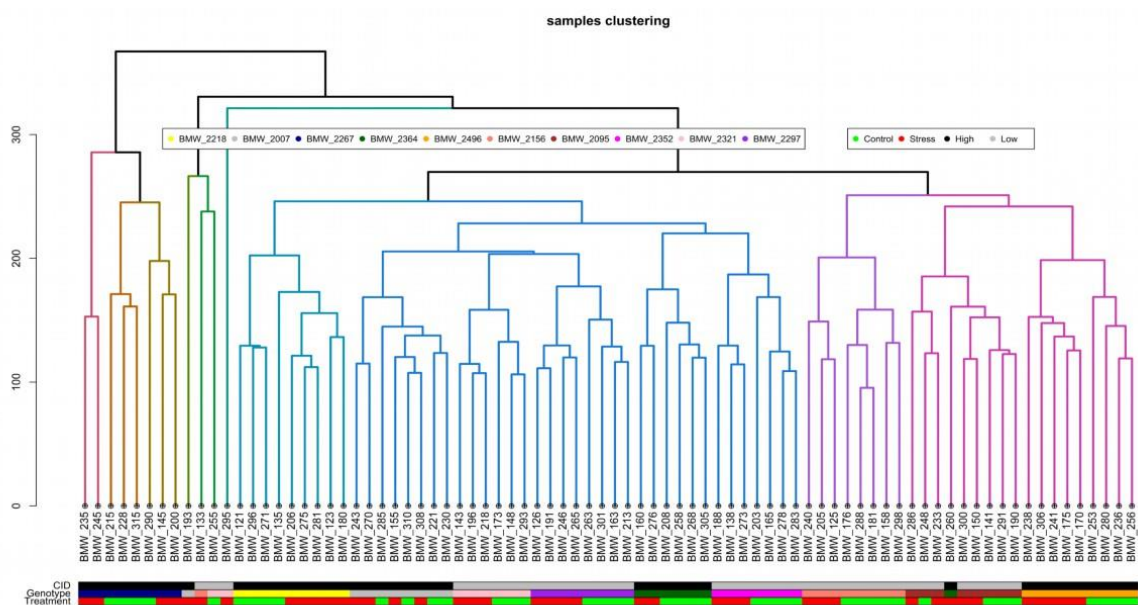


Abbildung 13: Hierarchische Clusteranalyse der verschiedenen Proben aus der Transkriptomanalyse. Die X-Achse gibt die Zugehörigkeit der jeweiligen Probe zur Gruppe „high/low CID“ sowie zu Trockenstress oder Kontrolle an sowie den Genotyp der zugehörigen Probe.

Anschließend wurden die differentiell exprimierten Gene sowohl für den Kontrast „Kontrolle vs Trockenstress“ als auch für den Kontrast „hohe WUE vs niedrige WUE“ berechnet. Nachfolgende Abbildung 14 illustriert den „log-fold change“, also die Veränderung (in log-fold Berechnung) der Expression jeweils eines Gens im Kontroll- und Trockenstress-Experiment. Blau eingefärbte Datenpunkte entsprechen dabei den statistisch signifikanten Beobachtungen. Zu erkennen sind insbesondere jeweils ganz oben und unten im Diagramm die am höchsten signifikanten (= unterschiedlich exprimierten) Gene, darunter 1752 Gene, die dabei unter Trockenstressbedingungen hochreguliert sind (oben, positive log-fold Werte), während 1905 Gene als herunterreguliert eingestuft wurden (unten, negative log-fold Werte).

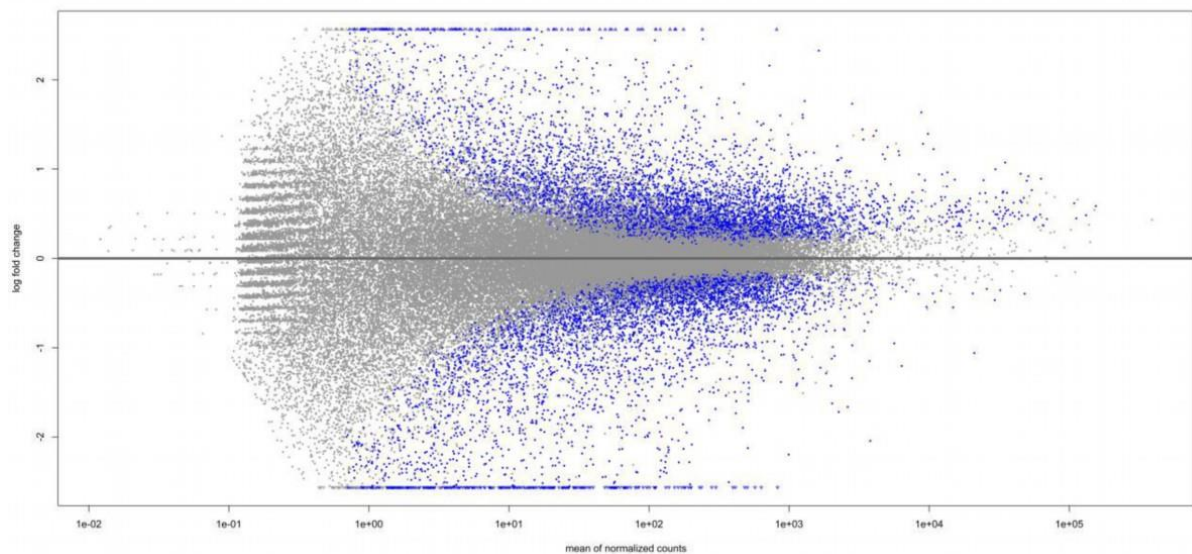


Abbildung 14: Expressionsänderung jeweils eines Gens (entspricht einem Punkt im Diagramm) zwischen Kontroll- und Trockenstressexperiment. Die Werte sind als *log-fold change* angegeben. Blau eingefärbte Datenpunkte entsprechen dabei den statistisch signifikanten Beobachtungen. Zu erkennen sind insbesondere jeweils ganz oben und unten im Diagramm die am höchsten signifikanten (= unterschiedlich exprimierten) Gene.

Die oben beschriebene Berechnung und Visualisierung wurde analog auch für den Kontrast „hohe WUE vs niedrige WUE“ im Trockenstressexperiment durchgeführt und ist in der folgenden Abbildung 15 dargestellt. Blau eingefärbte Datenpunkte entsprechen dabei wieder den statistisch signifikanten Beobachtungen. Zu erkennen sind jeweils ganz oben und unten im Diagramm die am höchsten signifikanten (= unterschiedlich exprimierten) Gene jeweils für niedrige WUE/CID (oben) sowie hohe WUE/CID (unten). Darunter sind 442 Gene, die dabei für die Gruppe „niedrige WUE“/“low CID“ im Vergleich mit der anderen Gruppe als hochreguliert (oben, positive log-fold Werte) und 1629 Gene als herabreguliert eingestuft werden (unten, negative log-fold Werte).

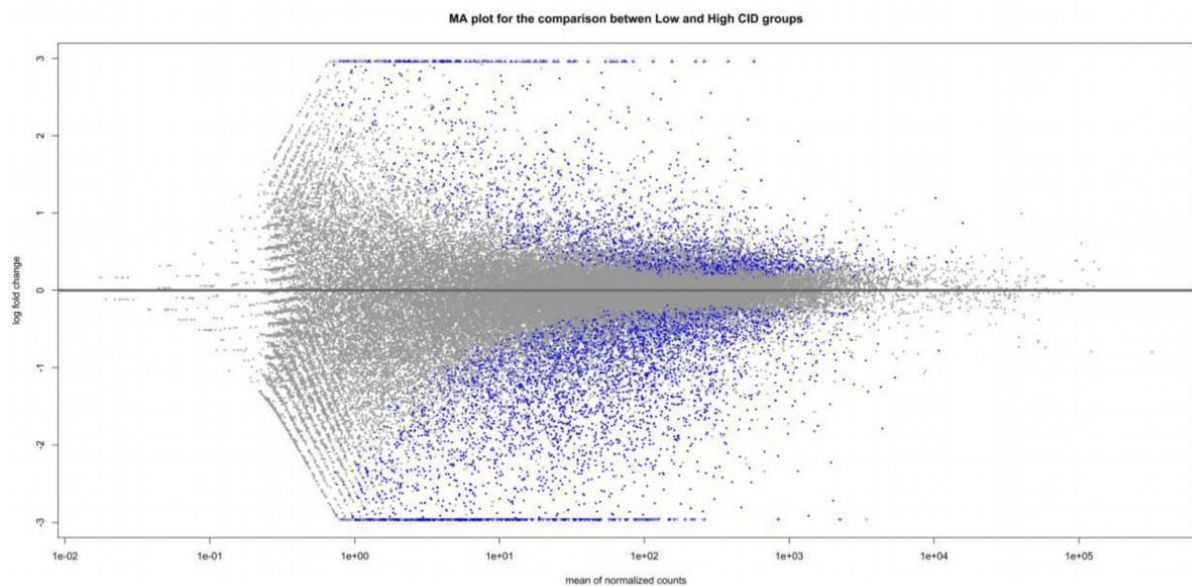


Abbildung 15: Expressionsänderung jeweils eines Gens (entspricht einem Punkt im Diagramm) zwischen der Gruppe *hohe WUE* und *niedrige WUE* im Trockenstressexperiment. Die Werte sind als *log-fold change* angegeben. Blau eingefärbte Datenpunkte entsprechen dabei den statistisch signifikanten Beobachtungen. Zu erkennen sind insbesondere jeweils ganz oben und unten im Diagramm die am höchsten signifikanten (= unterschiedlich exprimierten) Gene für diesen Kontrast.

Die rund 5500 auf diese Weise identifizierten Gene wurden für eine eingehende und weiterführende Analyse ausgewählt – sie stellen das erweiterte Set an potentiellen Markern für Trockenstresstoleranz in der Expressionsanalyse dar. Nachfolgende Abbildung 16 zeigt die 30 höchst signifikant unterschiedlich exprimierten Gene zwischen Kontrolle und Trockenstressexperiment. Diese Gene zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter Kontrollbedingungen niedrig exprimiert werden, wohingegen sie unter den Bedingungen des Trockenstress sehr stark exprimiert werden – und vice versa. Die Ergebnisse dieser Analyse können zudem in Beziehung mit der Zugehörigkeit zu einer der beiden Wassernutzungseffizienzgruppen dargestellt werden (siehe Abbildung 16 Abbildungsbeschreibung). Dies dient dazu die hier identifizierten Kandidatengene zusätzlich im Kontext der WUE zu bewerten.

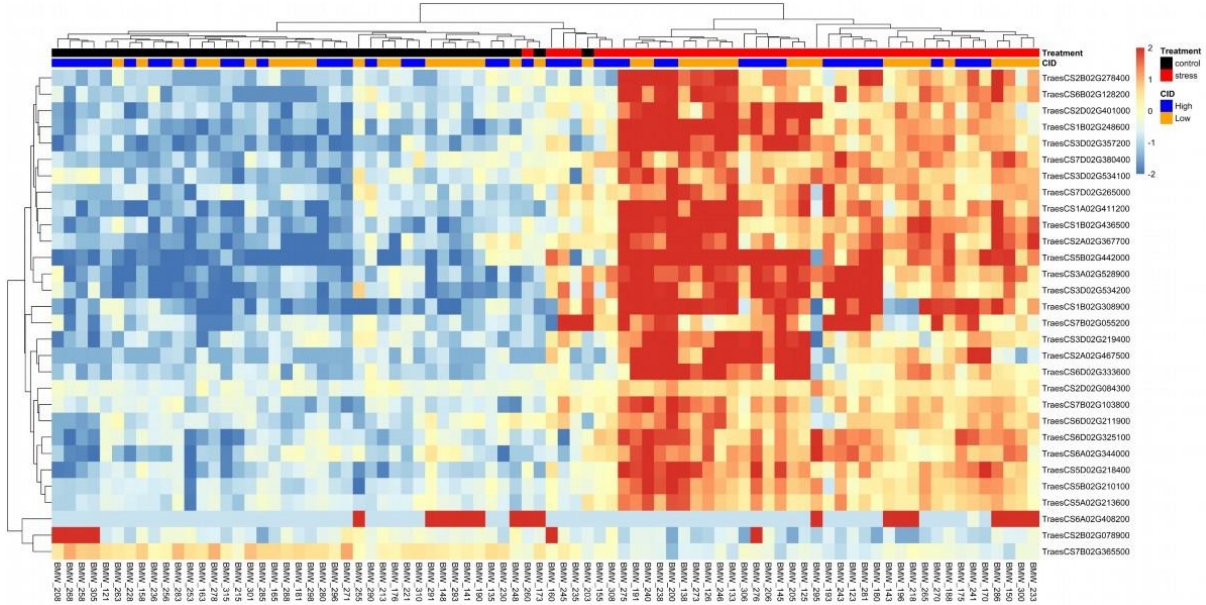


Abbildung 16: Heatmap der 30 höchst signifikant unterschiedlich exprimierten Gene (auf der Y-Achse aufgetragen) zwischen Kontrolle und Trockenstress Experiment. Die X-Achse beschreibt die einzelnen Proben aus dem Transkriptionsexperiment. Schwarz markierte Proben stammen aus der Kontrollbedingung, rot markierte Proben aus dem Trockenstressexperiment. Die Zugehörigkeit zu einer der beiden Wassernutzungseffizienzgruppen wurde informationshalber mit dargestellt („CID“).

4.3.2 Genfunktionsanalyse

Um die potentielle biologische Funktion und die Rolle der so identifizierten Gene in der Trockenstressantwort zu beleuchten, wurde eine sogenannte Genfunktionsanalyse durchgeführt. Diese Art der Analyse nutzt automatisch (in der Regel über Sequenzähnlichkeit) abgeleitete Funktionsbeschreibungen von Genen und ihrer Proteinprodukte um daraus Rückschlüsse über potentielle funktionale biologische Funktionen von bestimmten Genen oder Gruppen von Genen zu ziehen. In diesem Fall wurde mit Hilfe der Online-Datenbank *mercator4.V6* nach funktionellen Beschreibungen gesucht, welche entweder im Set der hoch- oder herunterregulierten Gene überproportional angereichert sind. Abbildung 17 gibt einen Überblick über die dabei identifizierten funktionellen Beschreibungen. Darunter befinden sich Zuckertransporter und Phosphatasen sowie Transkriptionsfaktoren. Diese Beobachtungen stellen wichtige Ausgangspunkte für die folgende Korrelationsanalyse sowie die Einordnung potentieller Kandidatengene als Marker dar da indem ihnen eine potentielle Funktion in der molekularen Antwort auf Trockenstress zugewiesen werden.

Fun-cut Level \ Sets	set_1 (Hoch-regulierte Gene)	set_2 (Herunter-regulierte Gene)
1	-	-
2	Amino acid degradation	Calvin cycle Glutathione-based redox regulation auxin
3	NAC-type transcription factor protein serine/threonine phosphatase superfamily degradation	plastidial ribosome biogenesis ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase (RuBisCo) activity WRKY transcription factor activity glutathione S-transferase activities
4	PPM/PP2C Mn/Mg-dependent phosphatase families HD-ZIP I/II-type transcription factor 2 oxidoreductase acting on aldehyde or oxo group of donor	large ribosomal subunit proteome WRKY-type transcription factor LHC-II complex RuBisCo heterodimer
5	clade A phosphatase vacuolar acid beta-fructofuranosidase (VIN) metabolite transporter (DTX)	component (LHCb1/2/3) small subunit Fasciclin-type arabinogalactan protein activities
6	ATL-subclass E3 ubiquitin ligase regulatory phosphatase component (ABI1/ABI2)	receptor component (PYL/RCAR)

Abbildung 17: Übersicht über die funktionellen Beschreibungen, welche entweder im Set der hoch- oder herunter-regulierten Genen angereichert sind. Die sogenannten „Fun-cut Levels“ (Y-Achse) beschreiben dabei die Tiefe der funktionellen Beschreibung in der für die Analyse verwendeten Datenbank. Dabei handelt es sich um hierarchische Kategorien und Über-kategorien welcher ineinander enthalten sind mit der Tiefe immer feiner die potentielle biologische Funktion auflösen und beschreiben. Die gefundenen Ergebnisse werden in der nachfolgenden Diskussion näher beleuchtet.

Abbildung 18 zeigt die 30 höchst signifikant unterschiedlich exprimierten Gene zwischen der Gruppe „high CID“ und „low CID“ im Trockenstressexperiment. Die hier identifizierten differentiell exprimierten Gene weisen also (konsistent) große Unterschiede in der Transkription unter Trockenstressbedingungen auf zwischen Weizenlinien mit hoher und niedriger Wassernutzungseffizienz. Diese Gene stellen Kandidaten für mit der Wassernutzungseffizienz und Trockenstresstoleranz verknüpfte oder assoziierte Regulationswege oder Faktoren dar. Sie sind in besonderem Masse interessant für die weitere detaillierte Analyse und Verknüpfung mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der genetischen Variation des Weizengenoms (genomweite Assoziationsstudie, GWAS), Phänotypisierung und Netzwerkanalyse.

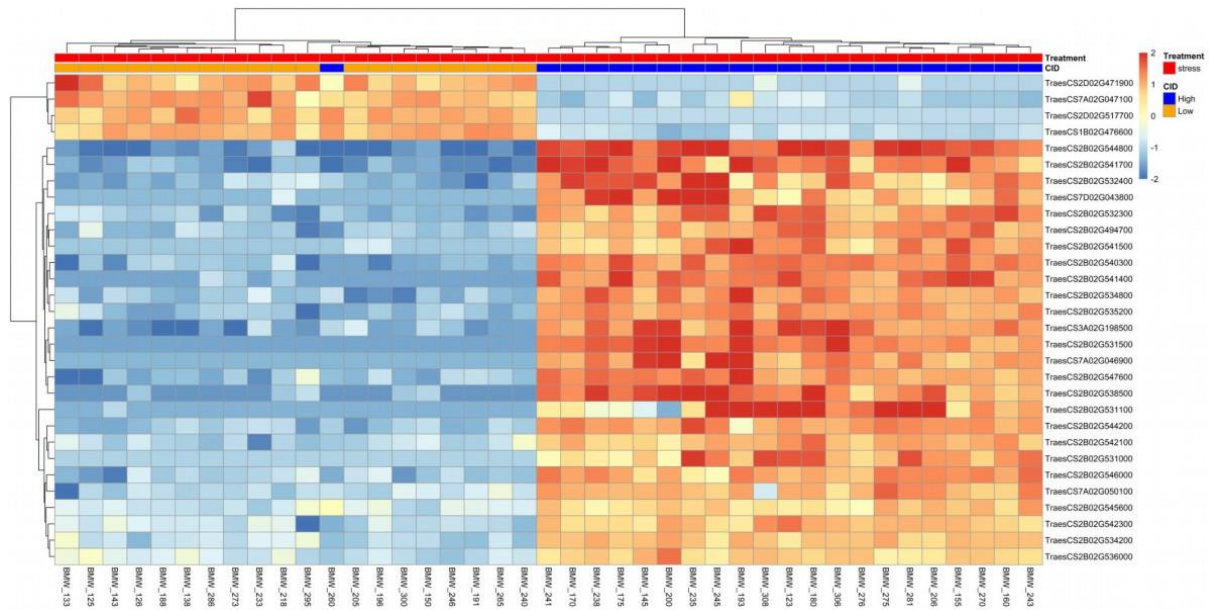


Abbildung 18: Heatmap der 30 höchst signifikant unterschiedlich exprimierten Gene (auf der Y-Achse aufgetragen) zwischen der Gruppe „high CID“ und „low CID“ im Trockenstress Experiment. Die X-Achse beschreibt die einzelnen Proben aus dem Transkriptionsexperiment. Die Zugehörigkeit zu einer der beiden Wassernutzungseffizienzgruppen wurde in den Farben blau („High CID“ – hohe Wassernutzungseffizienz) sowie orange („Low CID“ – niedrige Wassernutzungseffizienz) dargestellt.

Auch für dieses Set an Genen wurde eine sogenannte Genfunktionsanalyse durchgeführt, um die biologische Funktion und die potentielle Rolle der so identifizierten Gene in der Trockenstressantwort zu beleuchten. Dabei wurde mit Hilfe der Online-Datenbank *mercator4.V6* nach funktionellen Beschreibungen gesucht, welche im Set der in der Gruppe der „Low CID“ Genen hoch- oder herunterregulierten Genen angereichert sind. Abbildung 19 gibt einen Überblick über die dabei identifizierten funktionellen Beschreibungen, darunter Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen.

Fun-cut Levels	set_1 (Niedrige CID - Hoch-regulierte Gene)	set_2 (Niedrige CID - Herunter-regulierte Gene)	Beschreibung
1	-	-	-
2	-	nucleotide sugar biosynthesis	Erhöhung der Stresstoleranz, u.a. durch Verbesserung der Zellwandintegrität und osmotische Regulation
3	-	WRKY transcription factor activity NAC-type transcription factor	Modulierung der Genexpression von Stress-responsiven Genen: potentielle Erhöhung der Stresstoleranz in der Pflanze
4	MEDIATOR complex SulP family (not too many genes for both 4/3)	LRR-XII protein kinase WRKY-type transcription factor WAK/WAKL protein kinase G-Lectin protein kinase families L-lectin protein kinase	Zellwand Signaling, Modulierung von Wachstum und Entwicklung, Verbesserung der Stresstoleranz
5	RING-HC-class	SD-1 protein kinase SD-2 protein kinase	-
6	E3 ubiquitin ligase (RMA/MUSE)	component (LHCB1/2/3)	-

Abbildung 19: Übersicht über die funktionellen Beschreibungen welche für die Gruppe der „Niedrige CID“ entweder im Set der hoch- oder herunter- regulierten Genen angereichert sind. Die sogenannten „Fun-cut Levels“ (Y-Achse) beschreiben dabei die Tiefe der funktionellen Beschreibung in der für die Analyse verwendeten Datenbank.

Diese Ergebnisse stellen bedeutende Zwischenschritte dar für die Identifizierung von Genen und Stoffwechselwegen, welche entweder an der allgemeinen Antwort der Pflanze auf Trockenstress beteiligt sind oder aber Teil der genetischen Unterschiede sind, welche in der Ausprägung unterschiedlicher Wassernutzungseffizienz zwischen den Weizenlinien beobachtet wurden.

4.3.3 Erstellung von Co-Expressionsnetzwerken

Die im Projekt gewonnenen Transkriptomdaten wurden des Weiteren dazu verwendet, um funktionale Co-Expressionsnetzwerke mit Hilfe der Software „WGCNA – *Weighted correlation network analysis*“ zu erstellen. Diese Netzwerke erlauben es, gemeinsam exprimierte Gene und Gengruppen („Co-Expression“) zu identifizieren. Damit ist es möglich Gruppen von gemeinsam exprimierten (und potentiell regulierten) Genen und Gengruppen in bestimmten experimentellen Bedingungen (wie Trockenstress, oder aber auch in bestimmten Geweben) zu identifizieren: die sogenannten Module. Die Module stellen einen geeigneten Startpunkt dar für funktionelle Analysen bestimmter experimenteller Kontraste (wie hier Kontrolle-Trockenstress und Low CID-High CID) oder für die Identifizierung von Kandidatengenen. Mit diesem Ansatz können im Gegensatz zur differentiellen Genexpressionsanalyse auch Gene und Gengruppen gefunden werden, welche geringe Unterschiede in absoluter Expressionsstärke z.B. zwischen Kontroll- und Trockenstressbedingungen aufweisen, dafür aber gemeinsame Muster.

Die WGCNA Analyse der kombinierten Expressionsdaten ergab insgesamt 82 Module. Ein Modul besteht dabei aus zahlreichen Genen, welche über bestimmte Proben ein gemeinsames Expressionsprofil aufweisen. Die detaillierte Auswertung der Genverteilungen innerhalb der verschiedenen Module lieferte Anhaltspunkte für gemeinsam exprimierte und regulierte Gene und Gengruppen, welche entweder für bestimmte Genotypen, aber auch für die Bedingungen Trockenstress und Kontrolle angereichert sind. Abbildung 20 gibt eine allgemeine

Übersicht über Module mit entsprechender Anreicherung von Genen in Verbindung mit Genotyp und experimenteller Bedingung. Dabei ist zu erkennen, dass einzelne Module stark angereichert sind (ersichtlich durch rote Markierung) für bestimmte experimentelle Kombinationen (wie „stress_H_BMW_2007“: dabei handelt es sich um die Expressionsdaten von Weizenlinie BMW_2007 unter Trockenstressbedingungen und dieser Genotyp gehört zur Gruppe der hohen WUE).

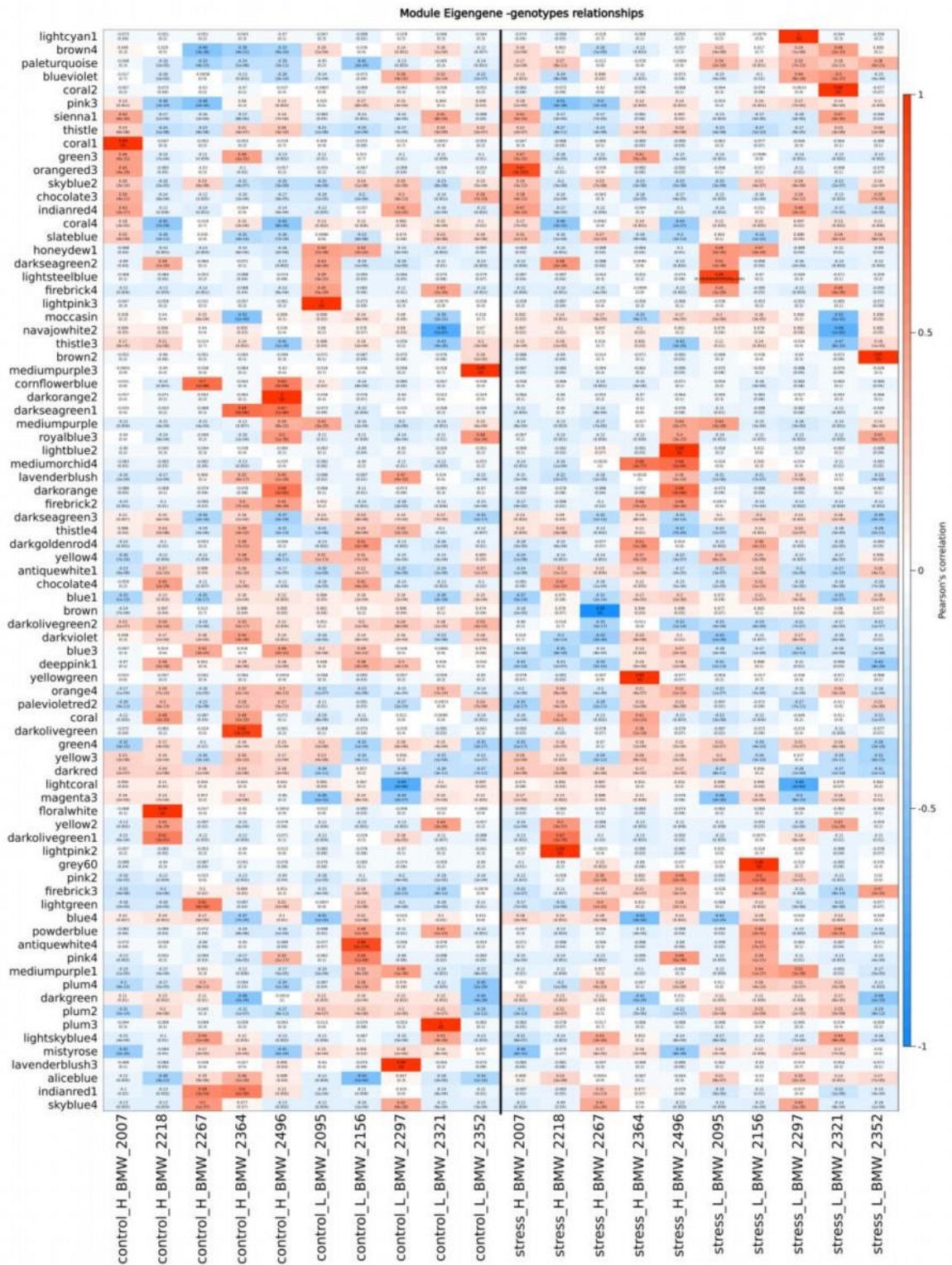


Abbildung 20: Allgemeine Übersicht über Module (Y-Achse, typischerweise bezeichnet mit einem Farbcode) mit entsprechender Anreicherung von Genen in Verbindung mit Genotyp, CID-Gruppe und experimenteller Bedingung (X-Achse). Es wurde die *Pearson's Correlation* gerechnet. Die Farbe zeigt an ob eine Korrelation positiv (rot) oder negativ (blau) ist.

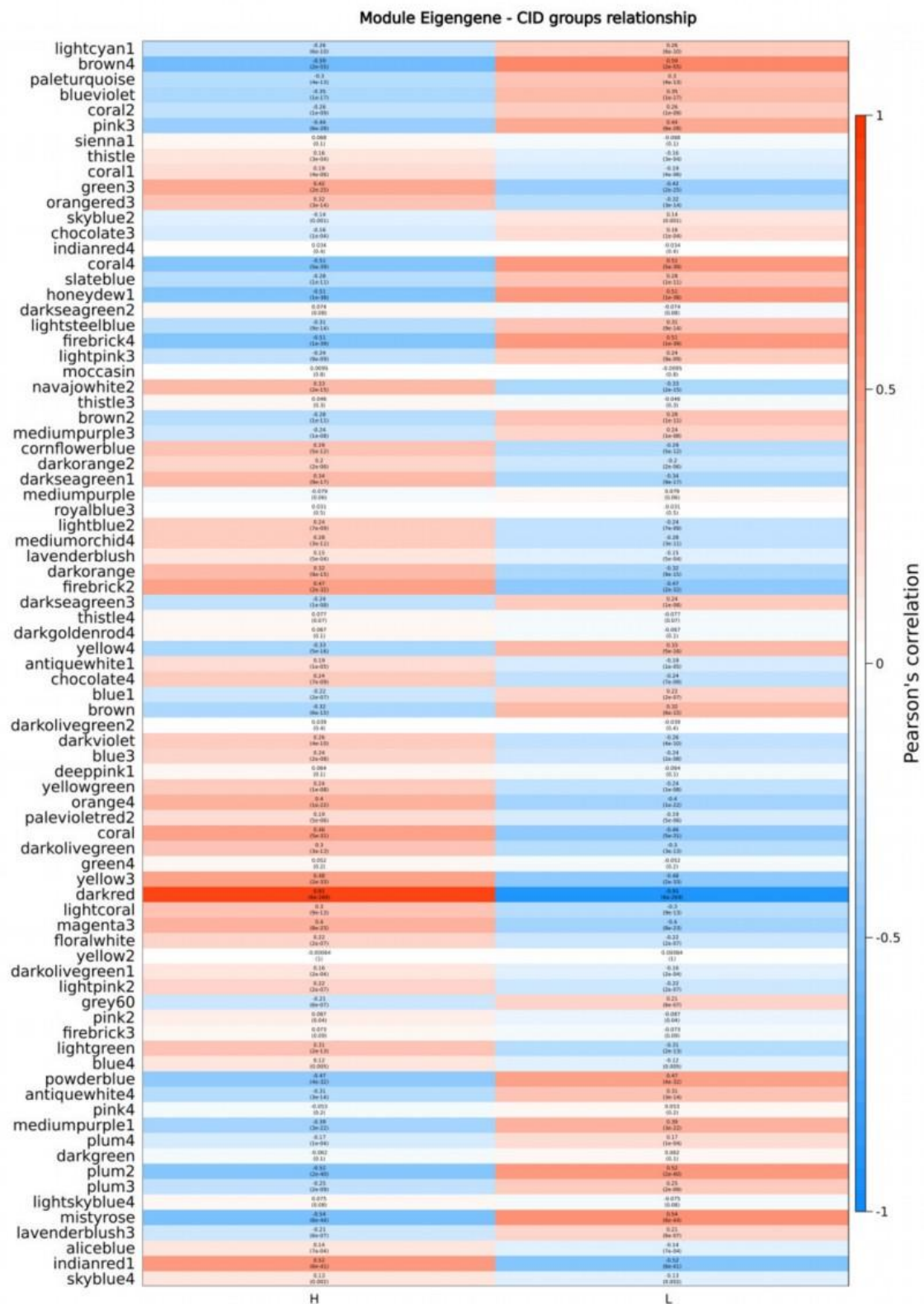


Abbildung 21: Auswahl von Netzwerkmodulen für die eine signifikante Assoziation zu bzw. Anreicherung mit Genen aus einer der beiden WUE-Gruppen gefunden wurde. Links auf der X-Achse die Gruppe „H“ für „High CID – hohe Wassernutzungseffizienz“, rechts die Gruppe „L“ für „Low CID – niedrige Wassernutzungseffizienz“. Es wurde die *Pearson's Correlation* gerechnet. Die Farbe zeigt an ob eine Korrelation positiv (rot) oder negativ (blau) ist.

Abbildung 21 dagegen zeigt Netzwerkmodule, für die eine signifikante Assoziation zu bzw. Anreicherung mit Genen aus einer der beiden WUE-Gruppen gefunden wurde. Dabei ist zu erkennen, dass einzelne Module zum Teil stark angereichert sind für Gene aus einer der beiden Wassernutzungseffizienzgruppen (in Abbildung 21 unterschieden mit „H“ und „L“). Die in den oben beschriebenen, spezifischen Modulen enthaltenen Gene sind dadurch Kandidaten für Funktionen und Regulationsmechanismen, welche im Zusammenhang mit Wassernutzungseffizienz und Reaktionen auf Trockenstress stehen können.

Im nächsten Schritt sollen diese Gene, ihre Funktionen sowie die sie enthaltenden Module eingehend untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Analyse fließen gemeinsam mit den Resultaten und Daten aus AP1 und AP2 in das integrative Arbeitspaket AP4.

4.3.4 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vergleichenden Transkriptionsanalyse umfassen Sets von Kandidatengenen für erhöhte WUE und Trockenstresstoleranz im Allgemeinen. Diese Gensets wurden einerseits über differentielle Genexpression zwischen Kontroll- und Trockenstressbedingung ermittelt, andererseits über den Vergleich der extremen Wassernutzungseffizienzgruppen. Die Netzwerkanalyse wurde dafür genutzt, um zusätzlich Gengruppen zu ermitteln, die ein gemeinsames (Co-) Expressionsprofil aufweisen und in deren Module Gene aus dem Trockenstress bzw. Gene mit hoher WUE überrepräsentiert sind. Diese Kandidatengene wurden schließlich funktionell untersucht und bilden nun die Grundlage für eine detailliertere Untersuchung mittels Korrelation aller im Projekt gewonnener Daten. Die individuellen Sets an Kandidatengenen für erhöhte WUE sowie deren Überschneidung stellen für sich genommen bereits einen wertvollen Beitrag zur gezielten Züchtung von trockenstressresistenten Weizensorten dar.

4.3.5 Stellungnahme zum Projekterfolg

Die in AP3 geplanten Ziele wurden in Form der Transkriptionsanalyse und -auswertung vollumfänglich erreicht. Die Erstellung der Proben in Replikaten aus dem Versuch aus AP2 war erfolgreich und die vergleichende Auswertung lieferte die erwarteten Ergebnisse in Form von Kandidatengenen welche abschließend in AP4 näher untersucht und evaluiert werden.

4.4 AP4: Identifizierung von Markergenen und Korrelation mit phänotypischen und populationsgenetischen Daten

Wie in den einzelnen Arbeitspaketen ausführlich beschrieben konnten die Daten und Ergebnisse für die jeweiligen Experimente und Teilbereiche des Projekts erfolgreich erbracht werden.

In AP4 wurden die verschiedenen Datensätze und Ergebnisse evaluiert und miteinander in Verbindung gebracht, mit dem Ziel geeignete Markergene für Trockenstresstoleranz im untersuchten Weizenmaterial zu identifizieren. Diese Arbeiten umfassten einerseits die integrative Analyse der in AP1 identifizierten genomischen Regionen und der darin enthaltenen Gene, welche auch in AP3 als Kandidatengene gefunden wurden. Andererseits wurden die in AP3

gefundenen Kandidatengene mit ihren phänotypischen Ergebnissen korreliert und in aufbauenden Analysen (differentielle Genexpressions-Analyse sowie WGCNA) weitergehend evaluiert.

4.4.1 Korrelationsanalyse

Aufbauend auf den Ergebnissen aus AP3 wurde eine Korrelationsanalyse der differentiell exprimierten Gene durchgeführt. Diese Analyse (Ergebnisse zusammengefasst in Abbildung 22) umfasst vier Dimensionen: hochregulierte Gene, welche zwischen Kontroll- und Stressbedingungen differentiell exprimiert sind (blau); herabregulierte Gene, welche zwischen Kontroll- und Stressbedingungen differentiell exprimiert sind (grün); hochregulierte Gene, welche zwischen den Gruppen „High iWUE – hohe Wassernutzungseffizienz“ und „Low iWUE – niedrige Wassernutzungseffizienz“ differentiell exprimiert sind (orange); herabregulierte Gene, welche zwischen den Gruppen „High iWUE – hohe Wassernutzungseffizienz“ und „Low iWUE – niedrige Wassernutzungseffizienz“ differentiell exprimiert sind (rosa). Die Überschneidungen im Venn Diagramm in Abbildung 22 visualisieren diejenigen Gene, die in beiden Bedingungen (hohe/niedrige iWUE und Stress/Kontrolle) gemeinsam differentiell exprimiert sind.

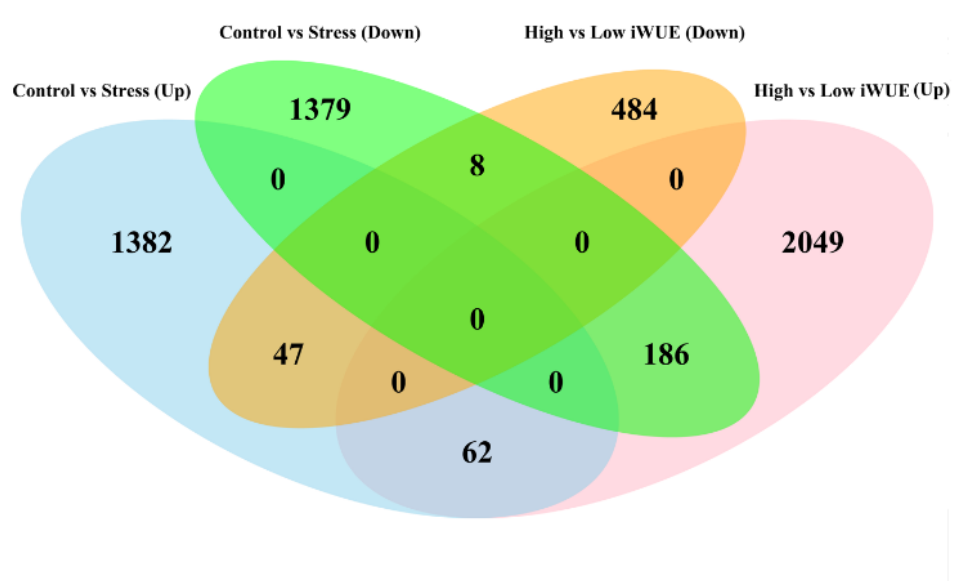


Abbildung 22: Das Venn-Diagramm zeigt die Überlappung zwischen Genen, die differentiell exprimiert sind. Linke Seite: Vergleich zwischen Kontroll- und Stressbedingungen. Rechte Seite: Vergleich zwischen Gruppen mit hoher und niedriger intrinsischer Wassernutzungseffizienz (iWUE) unter Stressbedingungen. Der überlappende Bereich repräsentiert die Gene, die in beiden Bedingungen gemeinsam differentiell exprimiert sind.

Insgesamt wurden 62 hochregulierte gemeinsame Gene zwischen der Gruppe mit hoher intrinsischer Wassernutzungseffizienz (iWUE) und den Stressbedingungen gefunden, während 8 Gene herunterreguliert waren. Diese Gene stellen damit weitere Kandidatengene dar, welche potentiell an der Ausprägung der Wassernutzungseffizienz bei Weizen beteiligt sind.

Die funktionelle Analyse der hier neu identifizierten Gene ergab, dass die meisten hochregulierten Gene in den Linien mit hoher iWUE an Wachstumsregulation, Zellwandstabilität, metabolischer Umprogrammierung und stomatärer Regulation beteiligt sind (Abbildung 23). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung bzw. eine wichtige Rolle dieser Gene in der Anpassung auf wasserlimitierte Bedingungen und erhöhte Wassernutzungseffizienz hin.

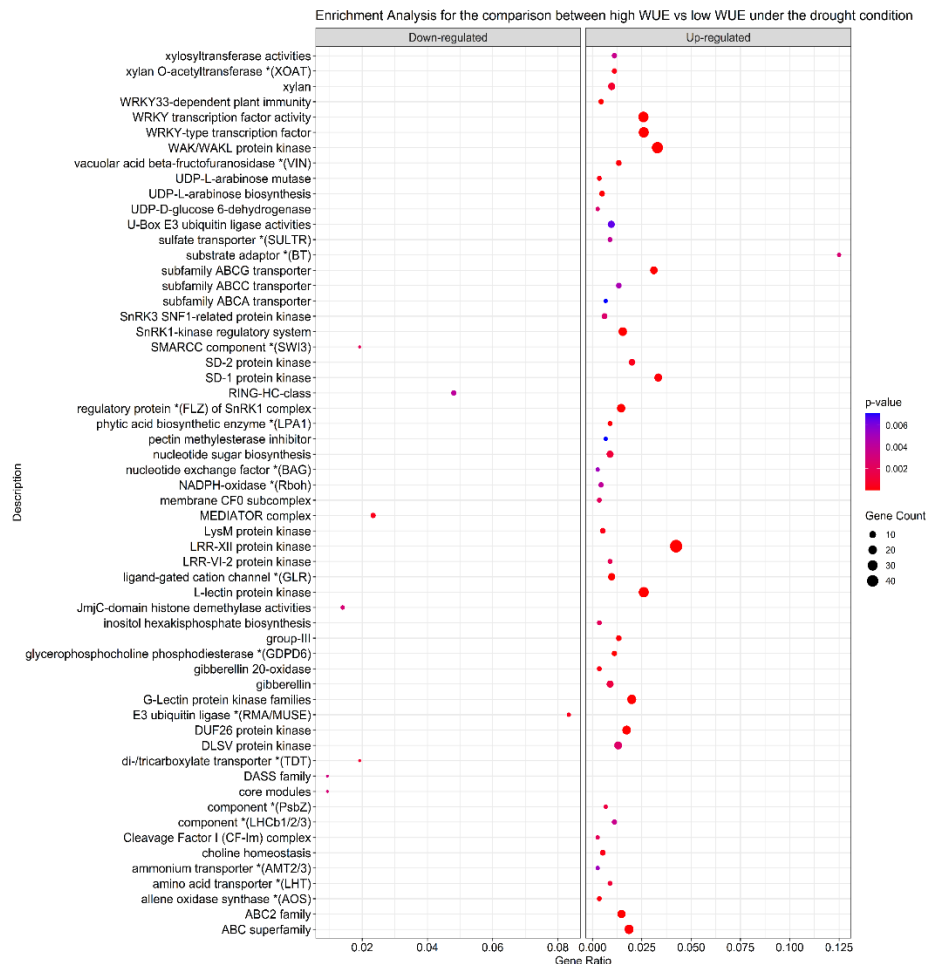


Abbildung 23: Dieses Streudiagramm zeigt die funktionelle Anreicherung von Genen, die in der Gruppe mit hoher iWUE unter Trockenstress differentiell exprimiert wurden. Die Position der Gene zeigt die Signifikanz ihrer zugehörigen biologischen Prozesse und Pfade im Zusammenhang mit der verbesserten Wassernutzungseffizienz.

Mit der sogenannten *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA; siehe auch 4.3.3) wurden Module von Genen identifiziert, die co-exprimiert sind, sowie deren Beziehung zu bestimmten Merkmalen, Genotypen, Bedingungen oder Kategorien der Wassernutzungseffizienz bestimmt (Abbildung 24). Die weiterführende Analyse dieser Module kann in Zukunft spezifische Kandidatengene identifizieren, die für Züchtungsprogramme zur Verbesserung der Wassernutzungseffizienz gezielt genutzt werden können.

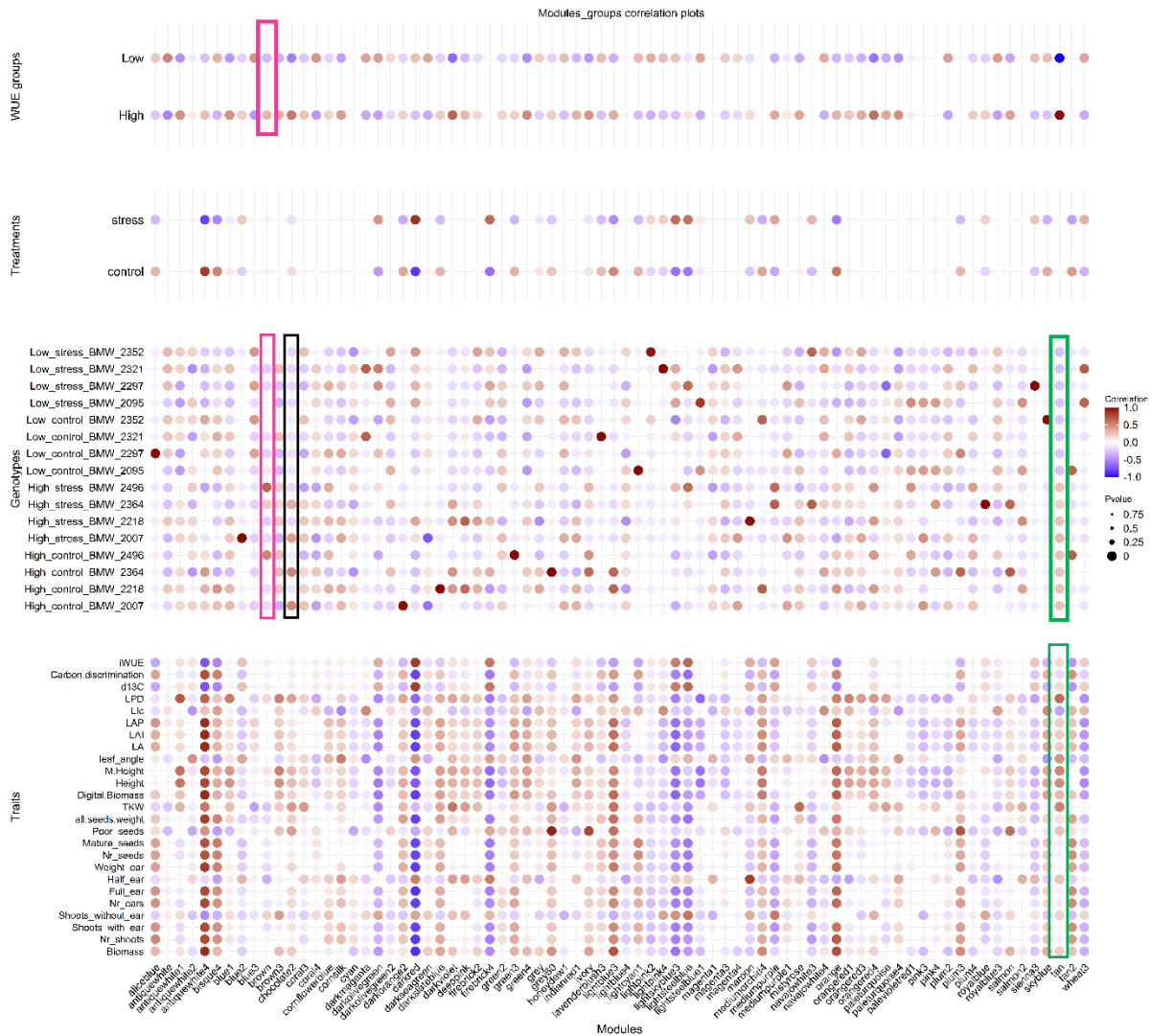


Abbildung 24: Die Heatmap zeigt die Assoziationen zwischen den 72 signifikanten Genmodulen, die durch die WGCNA-Analyse identifiziert wurden, und verschiedenen Merkmalen, Genotypen, Behandlungen sowie der intrinsischen Wassernutzungseffizienz (iWUE). Die Farbintensität zeigt die Richtung und Stärke der Korrelation an, wobei Blau eine negative Korrelation und Rot eine positive Korrelation darstellt. Die Größe der Punkte entspricht der statistischen Signifikanz der Assoziation.

Die funktionelle Anreicherung der Genmodule ist ein leistungsstarkes Werkzeug, um biologische Prozesse zu bestimmen, die im jeweiligen Modul überrepräsentiert sind. Diese Herangehensweise ermöglicht es, die funktionellen Rollen der Gene in den Modulen, die an der Reaktion auf Trockenstress beteiligt sind, zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen außerdem eine bemerkenswerte Aufteilung einiger Module co-exprimierter Gene zwischen Genotypen, basierend auf ihrer intrinsischen Wassernutzungseffizienz. Diese Aufteilung wird in Abbildung 24 durch grüne Rechtecke im Modul „Tan“ hervorgehoben. Dieses Modul ist positiv mit den meisten phänotypischen Merkmalen korreliert und negativ korreliert mit den Genotypen mit niedriger iWUE.

Im Modul „Brown“ hingegen sind die Gene positiv mit Genotypen mit hoher iWUE korreliert (dargestellt in den magentafarbenen Rechtecken in Abbildung 24). Andere Module, wie „chocolate2“, treten ebenfalls in den Gruppen mit höherer iWUE auf.

Die folgende Tabelle zeigt spezifische Module (z. B. „brown, dark violet, chocolate2, tan“) und ihre zugehörigen Proteinfamilien. Beispielsweise ist das Modul „Brown“ mit Genen aus den Familien der WRKY-Transkriptionsfaktoren, LRR-Kinasen und kalziumabhängiger Signalgebung angereichert, welche an Stressreaktionen und damit verbundenen Signalwegen beteiligt sind. Andere Module wie „Dark Violet“ und „Chocolate2“ sind mit diversen biologischen Funktionen assoziiert, darunter Hitzeschockproteine (Hsp90), Phosphoinositid-Signalgebung und Transkriptions-Coaktivierung.

Modul	Genfamilie
<i>brown</i>	- WRKY transcription factor activity - WRKY-type transcription factor - LRR-XII protein kinase - WAK/WAKL protein kinase - calcium-dependent signalling
<i>darkviolet</i>	- phosphoinositide signaling - phosphoinositide homeostasis - phosphatidylinositol - 4-kinase (PI4K-α) Complex - U4-U6-U5 tri-snRNP complex
<i>chocolate2</i>	- Hsp90 chaperone system - regulatory component *(RPN12) - scaffold component *(Sec13)
<i>tan</i>	- SnRK1-kinase regulatory system - regulatory protein *(FLZ) of SnRK1 complex - transcription co-activation - Arsenic - L-asparaginase *(ASPG)

Abbildung 25: Tabelle der abgeleiteten biologischen Funktionen und Proteinfamilien der selektierten WGCNA Module.

4.4.2 Ableitung der Kandidatengene

Die Ergebnisse der QTL-Analyse, der differentiellen Genexpressionsanalyse (DGE) und der WGCNA-Analyse wurden abschließend miteinander integriert. Dieser Ansatz verfolgt das Ziel, Kandidatengene zu identifizieren, die eine wichtige Rolle beim untersuchten Merkmal Wassernutzungseffizienz spielen, und um das genetische Netzwerk dieses komplexen phänotypischen Merkmals besser zu verstehen.

Wie im Balkendiagramm (Abbildung 26) dargestellt, wurden in jedem WGCNA-Modul nur die DEGs ausgewählt und basierend auf ihrem Regulationsstatus in zwei Cluster aufgeteilt: Lila für hochregulierte Gene und Gelb für herunterregulierte Gene. Diese Farbgebung erleichtert den visuellen Vergleich der unterschiedlichen regulatorischen Effekte der Gene. Zusätzlich wurden die DEGs, die in den genomischen Bereichen der identifizierten QTLs des Experiments liegen, in Rot hervorgehoben (und in schwarzen Rechtecken dargestellt). Insgesamt

verteilen sich diese Kandidatengene auf neun Module. Diese Visualisierung hilft nicht nur, die Ergebnisse zu interpretieren, sondern bildet auch die Grundlage für eine weitergehende Untersuchung der funktionellen Rollen dieser signifikanten Gene.

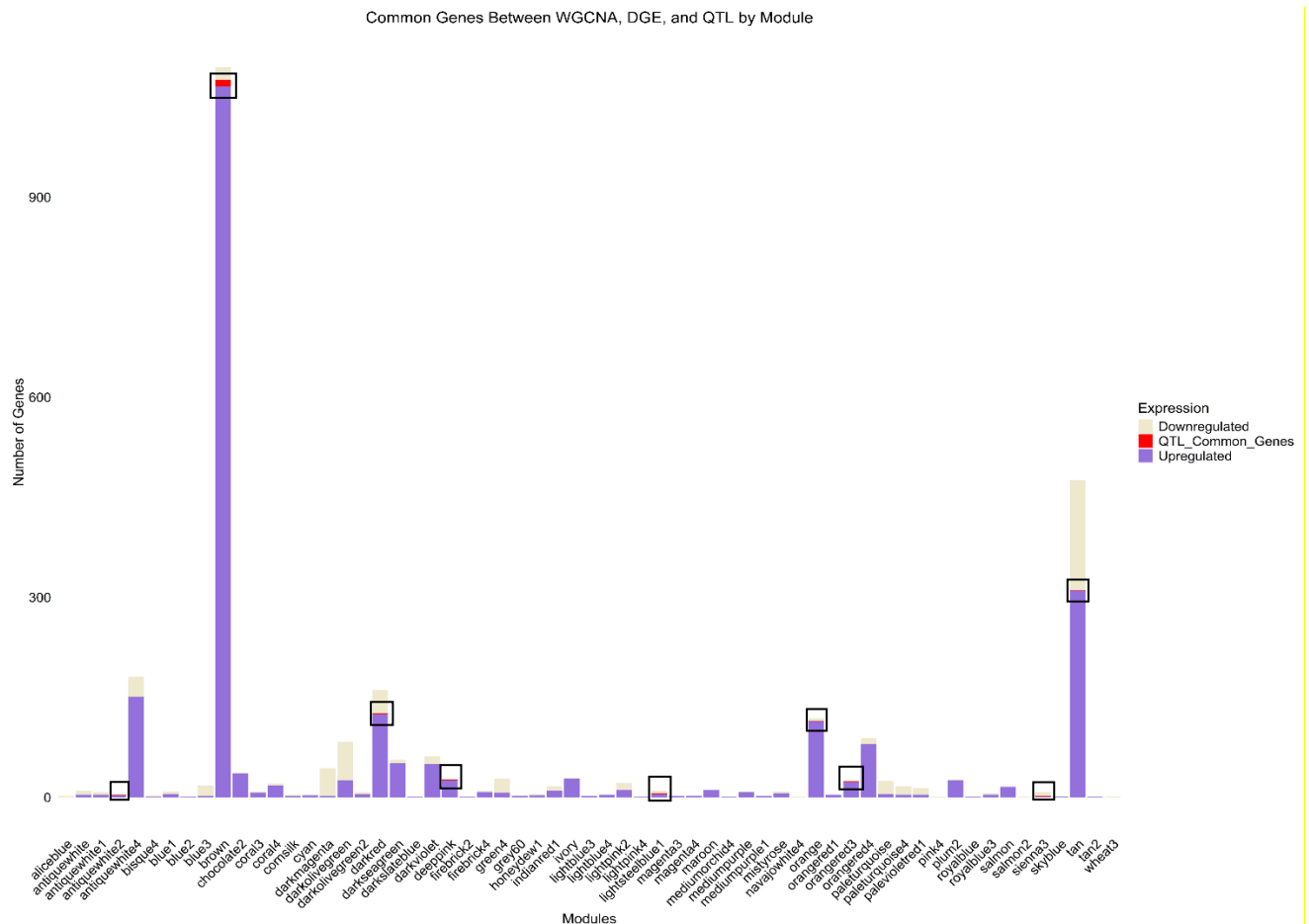


Abbildung 26: Verteilung der differentiell exprimierten Gene (DEGs) in signifikanten Modulen, die durch die WGCNA-Analyse identifiziert wurden. Die Gene sind in hochregulierte (lila) und herunterregulierte (gelb) Gengruppen unterteilt. Die hervorgehobenen DEGs entsprechen denjenigen, die innerhalb der zuvor identifizierten QTLs (Quantitative Trait Loci) liegen.

Im nächsten Schritt wurden die Kandidatengene, die mit Trockenstressresistenz und intrinsischer Wassernutzungseffizienz assoziiert sind, basierend auf ihren physischen Positionen im Referenzgenom auf Weizenchromosomen abgebildet (Abbildung 27). Die Kandidatengene befinden sich auf den Chromosomen 1D, 4B, 4D, 6A und 6B. Die roten Markierungen zeigen die Positionen dieser Gene. Die blauen Markierungen zeigen die Positionen der Rht-Gene (Semi-Dwarf-Gene, siehe 4.1.3.1), die zu Beginn des Experiments festgelegt wurden (Abbildung 27). Diese Visualisierung bietet eine integrative Ansicht der Lokalisation der Kandidatengene und ist wichtig, um deren funktionelle Relevanz zu verstehen.

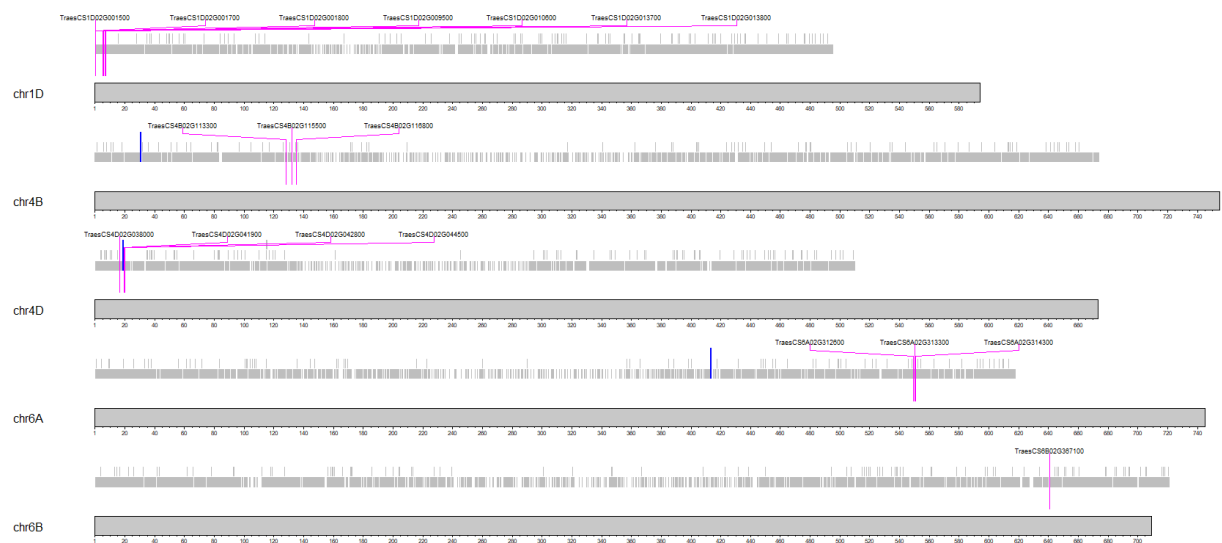


Abbildung 27: Chromosomen-Idiogramm mit der Kartierung von Kandidatengenen. Es zeigt die physischen Positionen der Kandidatengene auf spezifischen Weizenchromosomen. Die roten vertikalen Linien markieren die Kandidatengene, während die grauen Bereiche die Chromosomenstrukturen repräsentieren. Blaue Markierungen zeigen die Semi-Dwarf-Gene (Rht), darunter Rht-D1 auf Chromosom 1D, Rht-B1 auf Chromosom B und Rht24 auf Chromosom 6A.

Basierend auf der Chromosomenkartierung ist die funktionelle Annotation der Kandidatengene in der folgenden Tabelle (Abbildung 28) zusammengefasst (Gene, deren Namen mit einem Bindestrich (-) beginnen, waren im Allgemeinen herunterreguliert, während die anderen unter den experimentellen Bedingungen hochreguliert waren). Die Tabelle zeigt, dass die identifizierten Gene mehrere regulatorische Funktionen haben, darunter Schlüsseltranskriptionsfaktoren wie NAC, WRKY und GAMBY, die an Stressreaktionen und Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Einige dieser Gene, wie *TraesCS6A02G312600*, werden durch WRKY- und bHLH-Transkriptionsfaktoren über regulatorische Wege gesteuert, während andere, wie *TraesCS1D02G009500*, an der Synthese phenolischer Verbindungen beteiligt sind. Interessanterweise sind Orthologe einiger Gene, darunter *TraesCS6B02G367100* aus Reis, bekannt als OsBIN1, an Merkmalen der Pflanzenarchitektur wie Blattwinkelstellung und Korngröße beteiligt, die für die Ertragsoptimierung unter Trockenheitsbedingungen wichtig sind. Die in Rot hervorgehobenen Gene repräsentieren Gene mit unbekannten Funktionen, die weitere Untersuchungen erfordern, um ihre biologische Funktion näher zu charakterisieren.

Genes	Alternative name	Information	Orthologs
TraesCS1D02G001500	INRPK1	Regulated by NAC TFs	-
TraesCS1D02G001700	-	Regulated by WRKY18 TFs	-
TraesCS1D02G001800	INRPK1	Regulated by TaAp1 (responsible for the transmission from vegetative to reproductive phase)	-
TraesCS1D02G009500	CFAT	-	Arabidopsis: synthesis of certain phenolic compounds
TraesCS1D02G010600	-	Regulated by NAC6 and GAMBY TFs	-
TraesCS1D02G013700	-	Unknown	-
TraesCS1D02G013800	SRK6	Regulated by WRKY18 and HB24(HB33) TFs	-
-TraesCS4B02G113300	NSP2	-	Rice(OsSLRL1): Submergence tolerance
-TraesCS4B02G115500	-	-	Arabidopsis (F-Box/RIN):seedling development, circadian rhythms, floral development, etc
-TraesCS4B02G116800	-	Unknown	-
TraesCS4D02G038000	-	Regulated by NAC061 TFs	-
TraesCS4D02G041900	-	Regulated by TaWRKY18 TFs	-
TraesCS4D02G042800	-	Unknown	-
-TraesCS4D02G044500	-	Unknown	-
TraesCS6A02G312600	-	Regulated by WRKY and bHLH TFs	-
TraesCS6A02G313300	-	Unknown	-
TraesCS6A02G314300	ER2	-	Rice (OsBIN1): leaf angle and grain size
-TraesCS6B02G367100	RIPK	Disease resistance related	-

Abbildung 28: Zusammenfassung der Kandidatengene: Regulation, Funktion und orthologe Gene in anderen Spezies. Gene mit unbekannten Funktionen sind rot hervorgehoben.

4.4.3 Diskussion und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Zusammenfassend stellen die identifizierten Kandidatengene vielversprechende Ziele dar, die mit Trockenstressresistenz und intrinsischer Wassernutzungseffizienz bei Weizen assoziiert sind. Sie sind damit als Markergene für verbesserte Wassernutzungseffizienz in relevantem Weizenmaterial züchterisch nutzbar. Funktionelle Annotationen dieser Gene, ihre regulatorischen Wege und Expressionsmuster weisen darauf hin, dass sie Schlüsselrollen bei der Vermittlung physiologischer und phänotypischer Reaktionen unter begrenzter Wasserverfügbarkeit spielen. Eine Bestätigung ihrer genauen Funktion erfordert jedoch weitere Untersuchungen. Dazu gehört eine kritische Überprüfung der bestehenden Literatur mit dem Ziel, ihre genauen Funktionen zu klären, sowie experimentelle Validierungen durch Genexpressionsstudien, Knockouts oder transgene Experimente. Diese Schritte werden den Weg für die Integration weiterer Gene in zukünftige Züchtungsprogramme ebnen, um Weizensorten mit verbesserter Trockenheitstoleranz und Wassernutzungseffizienz zu entwickeln.

4.4.4 Stellungnahme zum Projekterfolg

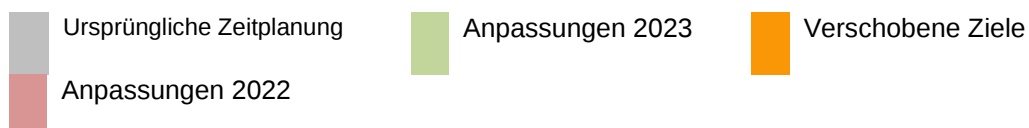
Die in AP4 geplanten Ziele wurden in Form von Kandidaten- und Markergenen für Wassernutzungseffizienz in bayerischem Weizenmaterial vollumfänglich erreicht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen ergeben sich zahlreiche neue Forschungsansätze für tiefergehende Evaluierungen einzelner Kandidatengene bzw. populationsgenetischer Untersuchungen der identifizierten Gene.

4.5 Aktualisierter Zeitplan

Im Vergleich zur ursprünglichen Planung wurde das Gesamtprojekt verspätet begonnen. Das lag in erster Linie an der angespannten Bewerbersituation und noch bestehenden Einschränkungen durch die Pandemie. Zudem war der Kooperationspartner (Helmholtz Zentrum München) von einer Cyber-attacke betroffen. Notwendig gewordene Anpassungen im Zeitplan wurden vorgenommen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gantt-Chart mit detailliertem Zeitplan und Aufgaben (A) innerhalb der Arbeitspakete (AP) und angestrebte Ziele (Z).

AP1	Erfassung der $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopendiskriminierung als Marker für Trockentoleranz in Weizen	Jahr 1 (6/21-5/22)	Jahr 2 (6/22-5/23)	Jahr 3 (6/23-5/24)	KNLV (6/24-10/24)
A1	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopendiskriminierung				
Z1	Selektion der extremen Linien				
AP2	Phänotypisierung ausgewählter Linien unter Trockenstress	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	KNLV
A1	Phänotypisierung ausgewählter Linien unter Trockenstress				
Z1	Phänotypisierung und vergleichende Auswertung der extremen Linien abgeschlossen				
AP3	Transkriptomanalyse ausgewählter Linien unter Trockenstress	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	KNLV
A1	Pflanzenanzucht und Präparation				
A2	Sequenzierung der Proben				
A3	Analyse der RNAseq Daten				
Z1	Transkriptomdaten ausgewertet für alle Linien				
AP4	Identifizierung von Markergenen und Korrelation mit phänotypischen und populationsgenetischen Daten	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	KNLV
A1	Identifizierung von Markergenen				
Z1	Korrelation der Daten				
Z2	Validierung der Markergene				



4.6 Einordnung der Projektergebnisse mit Bezug zum Klimawandel unter Berücksichtigung der Bayerischen Klima-Anpassungsstrategie

Die im Projekt erzielten Ergebnisse leisten einen Beitrag zur Bayerischen Klimaanpassungsstrategie in folgender Form:

- a.) Die vergleichende Charakterisierung der Wassernutzungseffizienz von für Bayern relevantem Weizenmaterial (repräsentiert in der BMW-Population) ermöglicht die gezielte Auswahl von Weizensorten für bestimmte Standorte (z.B. Sorten mit hoher WUE für Trockenstandorte). Dies ermöglicht den vom Klimawandel betroffenen Landwirten auf entsprechenden Flächen geeignete Sorten anzubauen und eventuell eintretende Verluste durch Trockenstress zu reduzieren (vergleiche PW_01 sowie PW_04 der Strategie).
- b.) Die Identifizierung von Markergenen und genomischen Regionen im Zusammenhang mit erhöhter Wassernutzungseffizienz erlaubt es den Züchtungsfirmen gezielt und beschleunigt neue Weizensorten zu entwickeln welche verbesserte Trockenstresstoleranz mit gleichzeitig hohem Ertrag verbinden. Diese neuen Sorten sind Voraussetzung für eine in die Zukunft gerichtete Optimierung der Standortansprüche bei Feldfrüchten (vergleiche PW_13 sowie PW_01 der Strategie).

5 Veröffentlichungen

2024

Jafarian, S., Geyer, M., Bügger, F., Mayer K.F.X., Schnitzler, J.P., Spannagl, M., Hartl, L. (2024): Identification of Marker Gene and Genes for Drought Stress Resistance in Wheat through $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Discrimination. 3rd International Wheat Conference (IWC), Perth, 22.-27.09.2024, Posterpräsentation.

Jafarian, S., Geyer, M., Bügger, F., Mayer K.F.X., Schnitzler, J.P., Spannagl, M., Hartl, L. (2024): Identification of Marker Gene and Genes for Drought Stress Resistance in Wheat through $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Discrimination. Plant and Animal Genome Conference (PAG) Australia, Perth, 18.-20.09.2024, Posterpräsentation und Vortrag.

Jafarian, S. (2024): Identification of Marker Gene and Genes for Drought Stress Resistance in Wheat through $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Discrimination. Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e. V. (GFPI) Jahrestagung Getreide, Bonn, 06.11.2024, Vortrag.

2023

Jafarian, S., Geyer, M., Bügger, F., Mayer K.F.X., Schnitzler, J.P., Spannagl, M., Hartl, L. (2023): Identification of Marker Gene and Genes for Drought Stress Resistance in Wheat through $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Discrimination. Conference "Translational Research in Crops", Gent, 22.-23.06.2023, Posterpräsentation.

2022

Spannagl, M. (2022): Trockenstresstoleranter Weizen. Hans Eisenmann-Akademie Veranstaltungsreihe „Starke Pflanzen im Klimawandel“, Freising, 03.11.2022, Vortrag (<https://www.youtube.com/watch?v=3uERJRW5vhY>).

2021

Spannagl, M. (2021): Trockenstresstoleranter Weizen. Auftaktveranstaltung PV BayKlimaFit 2, 08.07.2021, Vortrag.

Hartl, L., Spannagl, M., Mayer, K. Schnitzler, J-P. (2021): Trockenstresstoleranter Weizen. Auftaktveranstaltung PV BayKlimaFit 2, 08.07.2021, Posterpräsentation.

Das Projekt wurde von Dr. Hartl und Frau Jafarian mit einem Stand am Tag der offenen Tür anlässlich des LfL-Jubiläums 20 Jahre Landesanstalt für Landwirtschaft von 2003 bis 2023 am 18.06.2023 in Freising präsentiert.

Die Ergebnisse des Teilprojekts wurden im September 2024 bei der größten und wichtigsten internationalen Weizenkonferenz („International Wheat Congress“) in Perth/Australien vorgestellt. Dazu wurde ein entsprechender Abstract eingereicht, sowie ein Poster zum Projekt präsentiert. Frau Jafarian hat für diese Konferenz einen der sehr prestigeträchtigen und höchst kompetitiven „Travel Awards“ (Reisepreis zur Unterstützung der Teilnahme an der Konferenz) verliehen bekommen. Unmittelbar im Anschluss ist geplant, die Ergebnisse des Projekts in einer Fachzeitschrift zu publizieren.

6 Vernetzungen zu weiteren Verbundpartnern bzw. zu thematisch ähnlich gelagerten Projektverbünden

Am 20.05.2022 erfolgte ein Methodenworkshop im Rahmen des Projektverbundes zum Thema „Phänotypisierungsanlagen und Klimasimulations-Kammern am HMGU“. Im Rahmen eines von der Koordination und unserem Teilprojekt organisierten Workshop wurden den Projektpartnern das Versuchsdesign aus dem Teilprojekt präsentiert und in zahlreichen Diskussionen potentielle Vernetzungen und eine mögliche Zusammenarbeit mit anderen Teilprojekten erörtert, die zu einem methodischen und strategischen Austausch zwischen unserem Verbundprojekt und dem BayKlimaFit 2 Verbundprojekt von Prof. Hückelhoven (TUM, Gerste, TP6) führte.

Der methodische und wegweisende Aufbau des BayKlimafit2 Teilprojekts 11 stellt zudem eine wichtige Grundlage für einen im Rahmen des BMBF Programms/Calls „Plant2023“ eingereichten Antrag zum Thema „Weizen Pan-Genom und Anpassung an den Klimawandel“ dar. Die Projektskizze dazu wurde von einem nationalen Konsortium unter Beteiligung und Koordination aller Projektpartner dieses Projektes eingereicht.

7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung/-en

Die Projektergebnisse wurden im Rahmen von Tagungen und Konferenzen mit hoher Züchtungsbeteiligung (z. B. die jährlichen proWeizen Meetings und GFPI Getreide Jahrestagung) vorgestellt, um bereits vor der Publikation in einer Fachzeitschrift einen entsprechenden Austausch herzustellen.

Die im Projekt identifizierten Genorte für Trockenstresstoleranz lassen sich unmittelbar über molekulare Marker in Zuchtmaterial, für das umfangreiche mehrjährige Datensätze aus Saatzuchtfirmen genutzt werden können, validieren und anschließend in Modelle zur genomischen Selektion in Weizenzuchtprogramme einbinden. Mehrere bayerische Saatzuchtfirmen haben bereits entsprechende genomische Verfahren in den Zuchtablauf integriert, um die Effizienz zu erhöhen und leistungsstarke Sorten am Markt zu platzieren.

8 Zusammenfassung

Winterweizen ist neben Mais die bedeutendste landwirtschaftliche Kulturpflanze in Bayern und reagiert auf klimatische Veränderung, wie z. B. Trockenheit, besonders empfindlich. Während den letzten Sommern wurden zum Teil dramatische Ertragseinbußen beim Winterweizen verzeichnet. Ausgehend von aktuellen Klimavorhersagen muss zunehmend mit ausgeprägten und langanhaltenden niederschlagsarmen Phasen insbesondere im Frühjahr und Frühsommer gerechnet werden. Das Merkmal „Trockentoleranz“ ist dabei von mehreren Faktoren abhängig und kann sich zwischen einzelnen Weizenpflanzen innerhalb einer Population und zwischen Pflanzen verschiedener Weizensorten sowohl im Zeitpunkt/Pflanzenstadium als auch der Ausprägung erheblich unterscheiden.

Das Teilprojekt 11 hatte zum Ziel, die molekularen Faktoren und Gene zu identifizieren, die an der Ausprägung der Trockentoleranz im Weizen beteiligt sind. Dieses Wissen kann dann mittelfristig in die bestehenden Züchtungsprogramme eingebunden werden.

Dazu wurde zunächst die Wassernutzungseffizienz (in Form des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses im Korn) von 394 Weizenlinien der Bayerischen Magic Wheat (BMW)-Population bestimmt, die in 2019 am Standort Morgenrot bei Quedlinburg unter Trockenstressbedingungen kultiviert wurden. Anhand dieser Messungen konnten Linien mit deutlich unterschiedlicher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur identifiziert werden. Die jeweils 5 extremen Linien (insgesamt 10) wurden unter Berücksichtigung der genetischen Distanz sowie weiterer Faktoren (Details im Bericht) für die detaillierte Phänotypisierung im Gewächshaus und die nachfolgende Transkriptomanalyse ausgewählt.

Des Weiteren wurden die $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messergebnisse mit den bereits in den Feldversuchen erhobenen phänotypischen Daten und genotypischen Daten in Korrelation gesetzt und statistisch ausgewertet. Dabei konnten sechs Regionen, sogenannte Quantitative Trait Loci (QTL) für die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopendiskriminierung im Weizengenom identifiziert werden. Diese Genomregionen stellen einen bedeutenden Zwischenschritt bei der Suche nach Markern und Kandidatengenen für Trockenstresstoleranz in Weizen dar indem sie einerseits den Suchraum erheblich eingrenzen, andererseits direkt in Züchtungsprogrammen verwendet werden können.

Die zehn ausgewählten Weizensorten wurden im Gewächshaus des HMGU in einer Sprossphänotypisierungsanlage unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und gezielt einem definierten Trockenstress ausgesetzt. Dabei konnte der Effekt des applizierten Trockenstresses u.a. in Form von reduzierter Biomasse deutlich beobachtet werden, wie auch Unterschiede u.a. im Tausendkorngewicht zwischen den zwei Gruppen der Sorten mit hoher und niedriger WUE. Obwohl diese Unterschiede nicht für alle Pflanzenparameter statistisch signifikant waren, ergaben sich daraus wichtige Hinweise (z.B. welche Pflanzenparameter mit WUE stärker assoziiert sind) im Hinblick auf die integrierte Auswertung und Korrelation aller im Projekt erhobener Messungen und Daten.

Für alle 10 „extremen“ Weizenlinien (in AP1 basierend auf $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messungen aus den Feldversuchen ausgewählt) wurden zudem Transkriptomdaten/Genexpressionsdaten unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen generiert. Diese Analyse hatte zum Ziel die Auswahl der Kandidatengene in bereits identifizierten genomischen Regionen (siehe AP1) weiter einzu-

grenzen und zu bewerten. Die anschließende vergleichende Auswertung der Transkriptomdaten ergab differentiell exprimierte Gene sowohl für den Kontrast „Kontrolle vs Trockenstress“ als auch für den Kontrast „hohe WUE vs niedrige WUE“. Darüber hinaus wurden Netzwerke von co-exprimierten Genen erstellt mit dem Ziel, neue Einblicke in die Regulation von Genen unter Trockenstress zu generieren. Diese Ergebnisse können nun genutzt werden für die Identifizierung von Genen und Stoffwechselwegen, welche (a) an der allgemeinen Antwort der Pflanze auf Trockenstress beteiligt sind oder (b) Teil der genetischen Unterschiede sind, welche in der Ausprägung unterschiedlicher Wassernutzungseffizienz zwischen den Weizenlinien beobachtet wurden.

Im finalen Schritt des Projekts wurden die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete integriert und miteinander in Korrelation gebracht werden, um die in den verschiedenen Experimenten identifizierten molekularen Faktoren und Gene weiter einzugrenzen und als Marker für Trockenstresstoleranz der Weizenzüchtung verfügbar zu machen. Diese Marker werden in Form der genomischen Regionen und Kandidatengene den Pflanzenzüchtern zugänglich gemacht werden. Als Beitrag zur Bayerischen Klimaanpassungsstrategie tragen die Ergebnisse aus unserem Projekt unmittelbar dazu bei, speziell für den bayerischen Raum klimaangepasste Weizensorten zu entwickeln bzw. eine gezielte Auswahl an bestehenden Sorten basierend auf unseren Ergebnissen zu ermöglichen.

9 Ausblick

Die Genomforschung selbst bei genetisch komplexen Getreidearten wie Weizen hat im BayKlimaFit 2 Projektzeitraum weitere bedeutende Fortschritte gemacht. Mittlerweile ist es dank weiterentwickelter, effizienter und kostengünstiger Technologien möglich, vollständige Genomsequenzen auch von mehreren Genotypen innerhalb eines Experiments/Projekts zu erstellen. Die Verfügbarkeit dieser Informationen, idealerweise in Kombination mit einem Transkriptomatlas, welcher mehrere Gewebe/Entwicklungsstadien beinhaltet, erlaubt Einblicke in genomische Prozesse und Variabilität in bis dato unbekannter Auflösung. Entsprechende Anknüpfungspunkte ergeben sich z. B. durch die gezielte Sequenzierung ausgewählter Vertreter der Bavarian Magic Wheat (BMW) Population bzw. ihrer Eltern. Auf diese Weise ließen sich die hier vorgestellten, mehrdimensionalen Projektergebnisse und die damit etablierten Ressourcen auch für zusätzliche Fragestellungen zugänglich machen. Alle im Projekt gewonnenen Daten sowie das Untersuchungsmaterial werden im Rahmen einer Fachpublikation veröffentlicht und sind in üblicher Form öffentlich zugänglich und verwendbar. Es ist geplant die im Projekt identifizierten Kandidatengene im Rahmen von Anschlussprojekten (zusammen mit zusätzlichen Daten wie z.B. epigenetischen Daten sowie weiterer phänotypischer Daten) weiter zu untersuchen und zu evaluieren. Das Projektdesign mit der vergleichenden Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Zusammensetzung in einem Panel von verschiedenen Pflanzensorten wurde zudem in weiteren Projekten und Anträgen zu anderen Kultursorten aufgegriffen und erhält grosse Beachtung.

Literaturverzeichnis

- [1] Brenchley R. et al. (2012), Analysis of the bread wheat genome using whole genome shotgun sequencing. *Nature* 491:705-710
- [2] International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014), A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat genome. *Science* 345:6194
- [3] International Wheat Genome Sequencing Consortium (2018), Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361:6403
- [4] Walkowiak S. et al. (2020), Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature* 588, 277-283
- [5] Ramírez-González R. H. et al. (2018), The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science* 361:6403
- [6] Condon A. G. et al. (2004), Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot.* 55 (407):2447-2460
- [7] Stadlmeier M. et al. (2018), Usefulness of a multiparent advanced generation intercross population with a greatly reduced mating design for genetic studies in winter wheat. *Front. Plant Sci.* 9:1825
- [8] Barbour, M.M. et al. (2011), $\delta^{13}\text{C}$ of leaf-respired CO_2 reflects intrinsic water-use efficiency in barley. *Plant, Cell & Environment* 34:792-799
- [9] Rebetzke G. J., et al. (2002), Selection of reduced carbon isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Sci.* 42:739-745.
- [10] Ghirardo A. et al. (2020), Origin of VOC emissions from subarctic ecosystems under global warming. *Global Change Biology* 26 (3), 1908-1925
- [11] Sallam A. et al. (2019), Drought Stress Tolerance in Wheat and Barley: Advances in Physiology, Breeding and Genetics Research. *Int J Mol Sci.* 20 (13):3137
- [12] Bayerische Klima-Anpassungsstrategie (2016), Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (Hrsg.)