

Themen zur Züchtungsforschung/Züchtung

Moderation Dir. und Prof. Dr. Günter Schumann

Rode, Jeannette¹; Ahlemeyer, Jutta²; Friedt, Wolfgang²; Ordon, Frank¹

¹Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg; ²Institut für Pflanzenzüchtung, IFZ, Justus-Liebig Universität Giessen, Giessen

Nutzung der genetischen Diversität für Assoziationsstudien in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Utilization of Genetic Diversity for Association Studies in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Zusammenfassung

Verschiedene Wintergerstesorten (64 mehr- und 49 zweizeilige), welche im Zeitraum 1959 bis 2003 in Deutschland zugelassen waren, wurden über 3 Jahre an jeweils 12 verschiedenen Standorten in Feldversuchen untersucht. Dabei wurden agronomische Merkmale wie der Kornertrag, die Ertragsstrukturkomponenten, der Proteingehalt und das Resistenzniveau gegen verschiedene Pathogene erfasst. Basierend auf der SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Detektion mittels des Illumina Golden Gate Assays, deren Ergebnisse gemeinsam mit den phänotypischen Merkmalsdaten in Assoziationsstudien genutzt wurden, konnten zahlreiche Einzelnukleotidunterschiede detektiert werden, die mit einer entsprechenden phänotypischen Merkmalsausprägung korreliert sind. Basierend auf diesen Ergebnissen werden CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)-Marker und Primer für die Pyrosequenzierung entwickelt, die anschließend in der praktischen Züchtung eine Nutzung dieser Ergebnisse erlauben sowie eine Verifikation der entsprechenden Assoziationen in spaltenden doppelhaploiden (DH)-Populationen.

Stichwörter: Gerste, Assoziationsstudien, SNP, Illumina Golden Gate Assay, CAPS, Pyrosequenzierung, DH-Populationen

Abstract

Several winter barley cultivars (64 six-rowed and 49 two-rowed) released in Germany in the period 1959-2003 have been phenotyped in three years at 12 locations each, for yield, yield components, protein content, lodging, and resistance to several pathogens. Furthermore, all these cultivars were analysed using the Illumina Golden Gate assay for Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). This provides detailed information on the genome-wide genetic diversity present in cultivated barley. Based on statistical tools robust marker trait associations based on broad phenotypic and genotypic data were identified. As Illumina markers are not directly applicable in barley breeding programmes, they will be converted to easy to handle SNP-markers (CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), pyrosequencing) which facilitate a use of these results in applied barley breeding and a verification of respective marker trait associations in doubled haploid lines (DHs).

Keywords: Barley, association studies, SNPs, Illumina Golden Gate assay, CAPS, pyrosequencing, DHs

Einleitung

In den letzten Jahren haben Assoziationsstudien erhebliche Bedeutung in der Pflanzenzüchtung gewonnen. Der Vorteil von Assoziationsstudien liegt darin, dass keine biparentalen Kreuzungspopulationen mit einer eingeschränkten genetischen Auflösung erstellt werden müssen. Die innerhalb biparentaler Populationen identifizierten Marker sind zudem häufig kreuzungsspezifisch und daher nicht universell in der praktischen Züchtung einsetzbar.

Im Rahmen von Assoziationsstudien werden zunehmend Hochdurchsatz-Markersysteme wie DArT (Diversity Array Technology; Wenzl et al., 2004) und die BeadArray-Technologie (Oliphant et al., 2002) eingesetzt. Diese Verfahren erlauben eine effiziente Erfassung von Einzelnukleotidunterschieden (SNPs) und somit eine genomabdeckende Erfassung der genetischen Diversität, die anschließend in assoziationsgenetischen Studien in Beziehung zum Phänotyp gesetzt werden kann. Die SNPs sind zum größten Teil bereits kartiert, so dass ihre Lage im Genom bekannt ist. Somit können mit diesen Markersystemen im Rahmen von Assoziationsstudien Bereiche im Genom identifiziert werden, die mit der Merkmalsausprägung in Beziehung stehen. In Gerste wurden bereits erste erfolgreiche Assoziationsstudien mit der DArT-Technologie durchgeführt (Comadran et al., 2008; Pswarai et al., 2008).

Material und Methoden

Es wurden 64 mehr- sowie 49 zweizeilige Wintergerstesorten in den Jahren 2004, 2005 und 2006 an jeweils 12 Standorten in Deutschland phänotypisch charakterisiert. Diese Sorten waren in ihrem Zulassungszeitraum (1959-2003) jeweils die bedeutendsten ihrer Dekade (vgl. Ordon et al., 2005). Es wurden agronomische Merkmale wie der Kornertrag, verschiedene Ertragskomponenten, der Proteingehalt und das Resistenzniveau in einer Boniturskala von 1 bis 9 erfasst (1 = resistent und 9 = anfällig). An der Universität Gießen wurden die 113 Gerstesorten mittels 70 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Die gewonnenen Daten wurden mit dem Programm Structure 2.2 zur Ermittlung der Populationsstruktur verrechnet. Ein für Gerste verfügbarer Illumina Golden Gate Bead Array wurde für die Genotypisierung der Wintergerstesorten eingesetzt. Die aus diesen Analysen gewonnenen Daten wurden mit den Informationen zum Phänotyp unter Verwendung des Softwareprogramms TASSEL Version 2.0.1 assoziiert. Das Signifikanzniveau wurde hierfür auf $p \leq 0,01$ gesetzt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Feldversuche wurden bereits von Ahlemeyer et al. (2008) publiziert. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Feldversuche der Jahre 2004, 2005 und 2006 für 64 mehr- und 49 zweizeilige Wintergerstesorten

	64 mehrzeilige Wintergerstesorten			49 zweizeilige Wintergerstesorten		
	Min	Max	Mittel	Min	Max	Mittel
Kornertrag (dt/ha)	62,80	89,75	80,60	67,12	81,45	76,58
Proteingehalt (%)	11,44	13,33	12,44	11,61	13,88	12,57
Tausendkornmasse (g)	31,74	50,28	43,38	44,13	61,22	52,11
Kornzahl/Ähre	28,68	44,62	36,56	17,15	23,30	19,61
Ähren/m ²	480,22	703,47	548,53	662,57	918,88	786,92
Lager (Bonitur 1-9)	1,04	7,16	3,31	1,02	5,74	2,99
Mehltau (Bonitur 1-9)	1,84	4,79	3,40	1,52	4,27	2,98
Rynchosporium (Bonitur 1-9)	1,28	3,21	1,87	1,33	3,72	1,96
Netzflecken (Bonitur 1-9)	1,95	4,24	3,25	2,35	3,85	3,05
Halmknicken (Bonitur 1-9)	1,83	5,10	3,39	1,39	4,50	2,78
Ährenknicken (Bonitur 1-9)	1,89	4,82	3,19	1,59	4,74	2,81

Bezüglich der Merkmalsausprägung war eine hohe Variation innerhalb des Wintergerstesortimentes zu beobachten. Der Kornertrag der mehr- und zweizeiligen Sorten lag im Mittel über die 3 Versuchsjahre bei 80,60 bzw. 76,58 dt/ha. Es zeigte sich bei Betrachtung der Minimal- und Maximalwerte eine Spanne von 26,95 bzw. 14,33 dt/ha.

Tabelle 2 zeigt die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Merkmalen der Jahre 2004, 2005 und 2006. Bis auf die Boniturstufen von Mehltau und Netzflecken korrelieren die Merkmale hoch signifikant zwischen den 3 Jahren.

Tab. 2 Korrelation der Merkmale der 113 Wintergerstesorten zwischen den 3 Versuchsjahren

	2004-2005	2004-2006	2005-2006
Kornertrag (dt/ha)	0,87***	0,78***	0,84***
Proteingehalt (%)	0,47***	0,32***	0,50***
Tausendkornmasse (g)	0,97***	0,94***	0,95***
Kornzahl/Ähre	0,97***	0,96***	0,96***
Ähren/m ²	0,94***	0,95***	0,95***
Lager (Bonitur 1-9)	0,80***	0,65***	0,71***
Mehltau (Bonitur 1-9)	0,01	-0,39***	0,51***
Rynchosporium (Bonitur 1-9)	0,53***	0,31***	0,65***
Netzflecken (Bonitur 1-9)	0,12	0,29**	0,39***
Halmknicken (Bonitur 1-9)	0,38***	0,40***	0,72***
Ährenknicken (Bonitur 1-9)	0,63***	0,51***	0,56***

*, **, *** signifikant bei $p = 0,05$; $p = 0,01$ und $p = 0,001$.

Basierend auf den Daten der 70 Mikrosatelliten wurde die Populationsstruktur des Gerstenmaterials bestimmt. Es erfolgte eine getrennte Analyse von mehr- und zweizeiligen Gerstesorten, wobei einer Gruppierung in jeweils 4 verschiedene Gruppen beobachtet wurde. Die Ergebnisse wurden bei der Berechnung von Assoziationen berücksichtigt.

Die agronomischen Merkmale wurden über die verschiedenen Standorte und die 3 Jahre gemittelt. Es erfolgte eine Verrechnung mit den SNP-Daten. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Assoziationsstudie dargestellt. Es konnten zahlreiche SNPs identifiziert werden, die mit den verschiedenen Merkmalen in Beziehung stehen.

Tab. 3 Ergebnisse der Assoziationsstudie für die 113 Wintergerstesorten

Merkmal	Anzahl SNPs ($p \leq 0,01$)
Kornertrag (dt/ha)	34
Proteingehalt (%)	17
Tausendkornmasse (g)	22
Kornzahl/Ähre	2
Ähren/m ²	32
Lager (Bonitur 1-9)	9
Mehltau (Bonitur 1-9)	13
Rynchosporium (Bonitur 1-9)	10
Netzflecken (Bonitur 1-9)	0
Halmknicken (Bonitur 1-9)	5
Ährenknicken (Bonitur 1-9)	31

Diskussion

In den Jahren 2004, 2005 und 2006 wurden 113 Wintergerstesorten an 12 verschiedenen Standorten in Deutschland angebaut. Die Ergebnisse zeigten, dass eine große Variation im Material vorhanden war und damit gute Voraussetzungen für eine Assoziationsstudie geboten wurden.

Die einzelnen Merkmale korrelierten sehr gut über die 3 Anbaujahre. Aus diesem Grunde wurden zunächst nur die Mittelwerte mit den Ergebnissen des Illumina Golden Gate Assays verrechnet. Dabei wurden zahlreiche SNPs detektiert, die mit der Merkmalsausprägung in Beziehung stehen. Die Assoziationen müssen nun zusätzlich mit den Einzelwerten der verschiedenen Standorte und Jahre geprüft werden. Verschiedene Merkmale unterliegen stärkeren Umwelt- und Jahreseinflüssen, so dass hier eine detaillierte Auswertung notwendig ist. Von großem Interesse sind Assoziationen, die über mehrere Standorte und Jahre mit einem Merkmal in Beziehung stehen. Diese könnten für eine Selektion im Züchtungsprozess eingesetzt werden.

Illumina-Marker sind allerdings sehr kostenintensiv und es werden zahlreiche weitere SNPs mit den Arrays untersucht, die keine Beziehung zur Merkmalsausprägung zeigen. Deshalb werden lediglich als assoziiert detektierte SNPs anschließend in CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)-Marker oder Marker für die Pyrosequenzierung umgewandelt.

Auf Grund einer natürlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung kann es bei Assoziationsstudien zu zufälligen Ergebnissen kommen. Man spricht dann von sogenannten falsch positiven Assoziationen. Aus diesem Grunde sollen die konvertierten Marker in spaltenden doppelhobloiden Populationen geprüft werden. Sie können daraufhin im Zuchtprozess als Selektionsmarker eingesetzt werden.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), (Gabi-Genobar; FKZ 03115066 A-E) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), (SFB 299), für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- Ahlemeyer, J., W. Friedt, W. Köhler, A. Graner, F. Ordon, 2008: Genetic Gain in German Winter Barley and its Utilization in a Whole-Genome Association Mapping Approach. The 10th International Barley Genetics Symposium (IBGS), 05.-10.04.2008, Alexandria, Ägypten.
- Comadran, J., J. R. Russell, F. A. Van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, M. Baum, A. M. Stanca, N. Pecchioni, A. M. Mastrangelo, T. Akar, A. Al-Yassin, A. Benbelkacem, W. Choumane, H. Ouabbou, R. Dahan, J. Bort, J.-L. Araus, A. Pswarayi, I. Romagosa, C. A. Hackett, W. T. B. Thomas, 2008: Mapping adaptation of barley to droughted environments. *Euphytica* **161**, 35-45.

- Pswarayi, A., F. A. Van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, J. Comadran, J. R. Russell, N. Pecchioni, A. Tondelli, T. Akar, A. Al-Yassin, A. Benbelkacem, H. Ouabbou, W. T. B. Thomas, I. Romagosa, 2008: Changes in allele frequencies in landraces, old and modern barley cultivars of marker loci close to QTL for grain yield under high and low input conditions. *Euphytica* **163**, 435-447.
- Oliphant, A., D. L. Barker, J. R. Stuelpnagel, M. S. Chee, 2002: BeadArray technology: Enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques Suppl.*, 56-61.
- Ordon, F., J. Ahlemeyer, K. Werner, W. Köhler, W. Friedt, 2005: Molecular assessment of genetic diversity in winter barley and its use in breeding. *Euphytica* **146**, 21-28.
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinbartsch, A. Kilian, 2004: Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**, 9915-9920.

Kontakt: Jeannette Rode, E-Mail: jeannette.rode@jki.bund.de

Bergmann, Britta; Kopahnke, Doris; Ordon, Frank

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg

Kartierung und züchterische Nutzung neuer Resistenzquellen gegen die Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres f. teres*) der Gerste - erste Ergebnisse zur Phänotypisierung

Mapping and exploitation of new sources of resistance to net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) in barley – first results of phenotyping

Zusammenfassung

Die Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres f. teres*) ist eine der bedeutendsten Krankheiten der Gerste (*Hordeum vulgare*). Die Entwicklung und Nutzung resistenter Sorten stellt eine effektive und ökologisch sinnvolle Methode dar, Ertragsverluste durch diese Krankheit zu vermeiden. Zur Aufklärung der genetischen Basis der Resistenz gegenüber *Pyrenophora teres f. teres* wurden im Sommer 2008, d.h. Aussaat im August und Bonitur bis Oktober, an drei Standorten Freilandresistenzprüfungen mit doppelhaploiden Populationen (DHs) durchgeführt. Im Rahmen der Bonitur wurde quantitativ der prozentuale Befall der Blattfläche sowie qualitativ der Reaktionstyp bestimmt. Die ersten Ergebnisse des Sommerversuchs am Standort Quedlinburg zeigen, dass in den Populationen eine hinreichende genetische Variation vorhanden ist, welche die Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker bildet.

Stichwörter: Gerste (*Hordeum vulgare*), Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres f. teres*), Resistenz, DH-Linien.

Abstract

Net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres* (Died.) Drechsler) is one of the most important foliar diseases of barley (*Hordeum vulgare*) which causes large economic losses in some barley growing areas. The use of cultivars with resistance to net blotch is the most effective and ecological sound method of controlling this disease. To identify new sources of resistance to net blotch, doubled-haploid barley populations (DHs) were evaluated for resistance in a so called „summer-trial“ at three locations. The populations were evaluated within an extraordinary growing season (August to October). The area under the disease-progress curve (AUDPC) and the infection type were used to assess disease reaction. The first results of the test in Quedlinburg give hint to a sufficient genetic variation which will be the basis for marker development.

Keywords: Barley (*Hordeum vulgare*), net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*), resistance, doubled-haploids.

Einleitung

Die Netzfleckenkrankheit wird hervorgerufen durch den pilzlichen Erreger *Pyrenophora teres f. teres* (Died.) Drechsler (anamorph *Drechslera teres f. teres* (Sacc.) Shoemaker). Ziel dieses Projektes ist die Verbesserung der Widerstandsfähigkeit der Gerste gegen diesen pilzlichen Schaderreger. Zu diesem Zweck gilt es die Genetik der Netzfleckenresistenz in verschiedenen Resistenzdonoren aufzuklären, die entsprechenden Resistenzen im Gerstengenom zu kartieren sowie effiziente molekulare Marker zu entwickeln. Der Erreger