

- Rode, C., Lindhorst, K., Braun, H.P. und T. Winkelmann, 2011b: From callus to embryo - a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Planta* (submitted)
- Rode, C., Senkler, M., Klodmann, J., Winkelmann, T. und H.-P. Braun, 2011c: GelMap – A novel software tool for building and presenting proteome reference maps. *Journal of Proteomics* 74:2214-2219
- Sanikhani M., H. Mibus, B.M. Stummann und M. Serek 2008: *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis* *etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.* 27:729-737
- Schwarz-Sommer Z.S., Huijser P., Nacken W., Saedeler H., und H. Sommer, 1990: Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936
- Singsit, C. und R.E. Hanneman, 1991: Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Rep.* 9:475-478
- Sriskandarajah, S., H. Mibus und M. Serek, 2007: Transgenic *Campanula carpatica* plants with reduced ethylene sensitivity showing specific expression of *etr1-1* in flowers and buds. *Plant Cell Rep.* 26: 805-813
- Sriskandarajah, S., H. Mibus und M. Serek, 2008: Regeneration and transformation of adult plants of four campanula species. *Plant Cell Rep.* 27:1713-1720
- Stavang, J.A., Lindgard, B., Eernten, A., Lid, S.E., Moe, R. und J.E. Olsen, 2005: Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiology* 138:2344-2353
- Stavang, J.A., Juntilla, O., Moe, R. und J.E. Olsen, 2007: Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *Journal of Experimental Botany* 58 (11):3061-3069
- Van Tuyl J.M., Van Dijken A., Chi H.S., Lim K.B., Vilmoes S. und B.C.E. Van Kronenburg, 2000: Breakthroughs in interspecific hybridisation of lily. *Acta Hort.* 508:83-88
- Widholm, J., 1972: The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47:189-194
- Winkelmann, T., Specht, J. und M. Serek, 2006a: Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:337-347
- Winkelmann, T., Geier, T. und W. Preil, 2006b: Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:319-327
- Winkelmann, T., Heintz, D., van Dorsselaer, A., Serek, M. und H.-P. Braun, 2006c: Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta* 224:508-519
- Winkelmann, T., Doil, A., Reinhardt, S. und A. Ewald, 2010: Embryo rescue. S. 79-95 in: Davey, M. und P. Anthony (Eds.): *Plant Cell Culture – Essential Methods*. Wiley VCH Weinheim
- Woltering, E. J. und W. G. Van Doorn, 1988: Role of Ethylene in Senescence of Petals Morphological and Taxonomical Relationships. *Journal of Experimental Botany*, 39:1605-1616

Methodische Ansätze zur Verbesserung der Trockenstresstoleranz durch markergestützte Selektion

Enhancing drought stress tolerance by marker assisted selection procedures

Ordon, Frank; Seddig, Sylvia; Bartelmann, Anne; Balko, Christiane
Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz,
Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg
Tel.: ++49 3946 47-602; E-Mail: Frank.ordon@jki.bund.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.006

Zusammenfassung

Die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen tritt aufgrund des Klimawandels zunehmend in den pflanzenzüchterischen Fokus. Eine sichere Selektion anhand des Phänotyps erfordert kontrollierte Bedingungen, ist sehr arbeitsintensiv und damit nur schwer in den praktischen Zuchtbetrieb zu integrieren. Aus diesem Grund sind molekulare Marker von besonderer Bedeutung im Hinblick auf eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz. Möglichkeiten der Entwicklung und Nutzung molekularer Marker werden aufgezeigt.

Stichwörter: Trockenstresstoleranz, Molekulare Marker, markergestützte Selektion

Abstract

Tolerance to drought stress has gained evident importance due to climate change. For an efficient phenotypic selection for drought stress tolerance controlled conditions are needed and besides this reliable phenotypic selection is quite laborious and time consuming. Therefore, molecular markers are of special importance with respect to enhancing drought stress tolerance. Possibilities for the development and use of molecular markers are briefly reviewed.

Keywords: drought stress tolerance, molecular markers, marker assisted selection

Einleitung

Für Deutschland werden als Folge des Klimawandels mildere und feuchtere Winter bzw. trockenere und wärmere Frühlings- und Sommermonate prognostiziert. Da am Anfang jedweder pflanzlichen Produktion das Saat- bzw. Pflanzgut steht, kommt der Pflanzenzüchtung im Hinblick auf die Anpassung unserer Kulturarten an den Klimawandel eine besondere Bedeutung zu. Stärker als bisher tritt dabei eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz in den pflanzenzüchterischen Fokus.

Pflanzen reagieren mit komplexen Anpassungsmechanismen auf Trockenstress. Dazu gehört zum Beispiel die Verlagerung des Blühzeitpunktes in Abhängigkeit des Auftretens von Trockenheit („escape“, Siddique et al. 2001). Andere Merkmale, die diese Anpassung bedingen, sind z. B. das Wasseraufnahmevermögen durch die Wurzel, das Wasserhaltevermögen in den Zellen, die Wasserabgabe durch die Stomata. Im Rahmen dieser Anpassungsprozesse produzieren Wurzeln Moleküle, welche eine Wasseraufnahme aus immer trockener werdenden Böden ermöglichen, Zellen entgiften reaktive Sauerstoffradikale, welche während der Dehydratation entstehen, und produzieren Moleküle, die zu einer osmotischen Adaption führen (Ashraf und Foolad 2007, Pennisi 2008).

An diesen komplexen Vorgängen, die die Trockenstresstoleranz bedingen, ist dementsprechend eine Vielzahl von Genen beteiligt (z. B. Cattivelli et al. 2008), wodurch die Selektion erschwert wird. Darüber hinaus gestaltet sich eine sichere Selektion auf Trockenstresstoleranz anhand des Phänotyps neben der Komplexität des Merkmals selbst durch die dementsprechend vielfältigen Wechselwirkungen mit den Umweltbedingungen schwierig, welche den Selektionserfolg (R), der in seiner einfachsten Form als das Produkt aus dem Selektionsdifferential (SD) und der Heritabilität (h^2), d. h. dem Anteil der genotypischen Varianz an der phänotypischen Varianz, definiert ist, einschränken. Molekulare Marker können daher zu einer effektiveren Selektion auf Trockenstresstoleranz beitragen, da sie bei hinreichend enger Kopplung einen sicheren Rückschluss vom Genotyp auf den Phänotyp, unabhängig von den herrschenden Umweltbedingungen, erlauben.

Molekulare Marker Techniken

War die Selektion bis in die 1990er Jahre im wesentlichen auf den Phänotyp, d. h. das Erscheinungsbild, beschränkt, so finden seit dieser Zeit verstärkt molekulare Techniken, welche im Wesentlichen auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruhen, im Rahmen markergestützter Selektionsverfahren Eingang in die praktische Pflanzenzüchtung. Entsprechende Marker erlauben, wenn sie hinreichend eng mit dem Zielgen gekoppelt sind, oder auf Sequenzunterschieden im Gen selbst beruhen, eine sichere, umweltunabhängige Selektion auf DNA- bzw. RNA-Ebene für Majorgene bzw. Quantitative Trait Loci (QTL) in frühen Entwicklungsstadien (vgl. Ordon 2008). Während die Identifikation von Markern bis vor Kurzem auf die simultane Analyse weniger Marker (z. B. SSRs) in bi-parentalen Populationen beschränkt war, erlauben heute molekulare Markertechniken wie die Diversity Array Technology (DArTs, Wenzl et al. 2004) oder die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), die z. B. im Hochdurchsatzverfahren mittels des Illumina GoldenGateAssays nachgewiesen werden können (Close et al. 2009), die Nutzung genomweiter assoziationsgenetischer Verfahren in der Pflanzenzüchtung (Waugh et al. 2009) bzw. genomischer Selektionsverfahren (Heffner et al. 2009).

Durch neue Sequenzierungstechniken (z. B. Munroe und Harris 2010) haben sich bzw. werden sich die Kosten für die Sequenzierung von 1Mb von ca. 10000 Dollar mittels Sanger Sequenzierung über 1000 Dollar mittels 454-Sequenzierung bis auf ca. 1 Dollar reduzieren (Delseny et al. 2010, Deschamps und Campbell 2009). Diese Kostenreduktion ermöglicht zukünftig die umfangreiche Resequenzierung kompletter Genome unserer Kulturarten und damit eine gezielte Selektion auf allelischer Ebene (vgl. Ordon 2011).

Möglichkeiten der markergestützten Selektion auf Trockenstresstoleranz

Voraussetzung für die Entwicklung molekularer Marker ist zunächst eine verlässliche Phänotypisierung, welche eine reproduzierbare Erfassung der Trockenstresstoleranz erlaubt. Hierfür eignen sich einerseits Gefäßversuche unter kontrollierten Bedingungen bzw. im Optimalfall automatisierte Hochdurchsatz-Phänotypisierungsplattformen (Schurr 2009). Unter dem Gesichtspunkt der Praxisrelevanz können andererseits auch Rain-out Shelter Versuche unter semikontrollierten Freilandbedingungen zum Einsatz kommen. Sind entsprechende phänotypische Daten zur Trockenstresstoleranz vorhanden, z. B. Unterschiede im Chlorophyllgehalt (Arunyanark et al. 2008), der Chlorophyllfluoreszenz (Oukarroum et al. 2009), der Biomasseproduktion etc., so gilt es basierend auf molekularen Markerkarten (s. o.), Genomregionen zu identifizieren, die für diese Merkmalsunterschiede verantwortlich sind. Dies kann einerseits mittels klassischer QTL-Analyse in bi-parentalen Populationen erfolgen, andererseits heute, aufgrund der zu erzielenden Markerdichte, mittels genomweiter assoziationsgenetischer Verfahren, bei denen eine möglichst wenig strukturierte Population verschiedener Genotypen einer Kulturart phänotypisiert und genotypisiert wird. So konnten beispielsweise in der Gerste sowohl mittels klassischer QTL-Analysen als auch mittels genomweiter assoziationsgenetischer Verfahren QTL für Trockenstresstoleranz nachgewiesen werden (Comadran et al. 2008).

Darüber hinaus erfolgte inzwischen insbesondere in Modellpflanzen die Identifikation einer Vielzahl von Genen, welche an der Trockenstresstoleranz beteiligt sind. Eine Übersicht über diese Gene und ihre Funktion geben z. B. Cattivelli et al. (2008), Friedt und Link (2007), Bhatnagar-Mathur et al. (2007). Sind entsprechende Gene bekannt, kann gezielt nach wirkungsvolleren Allelen, z. B. in Genbankkollektionen, gesucht werden, und diese in adaptierte Genotypen mittels klassischer Rückkreuzungsverfahren, aber auch gentechnischer Methoden (Park et al. 2009), eingelagert werden. Variabilität in der Trockenstresstoleranz kann jedoch auch durch unterschiedliche Expressionsniveaus bzw. -zeitpunkte beteiligter Gene bedingt sein (Talame et al. 2007). Entsprechende Unterschiede konnten beispielsweise in eigenen qPCR-Arbeiten bei der Kartoffel nachgewiesen werden (Ordon et al. 2011).

Schon heute steht eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Verfügung, welche es erlauben das Phänomen der Trockenstresstoleranz auf der Ebene der DNA bzw. RNA aufzuklären und züchterisch zu bearbeiten. Daneben gewinnen in der pflanzenzüchterischen Forschung zunehmend Verfahren der Metabolomanalyse an Bedeutung (Ferne und Schauer 2008) - auch im Hinblick auf die Verbesserung der Trockenstresstoleranz (Padi et al. 2009).

Ausblick

Der Pflanzenzüchtung stehen heute effektive molekulare Markertechniken, eine ständig zunehmende Sequenzinformation sowie leistungsfähige Methoden der Transkriptom- und Metabolomanalyse zur Verfügung, welche es erlauben in zunehmendem Maße Gene bzw. genetische Netzwerke zu identifizieren. Eine Kenntnis entsprechender Gene erlaubt eine zunehmende Verlagerung der Züchtung vom Phänotyp auf den Genotyp d. h. auf die DNA- bzw. RNA-Ebene und wird zukünftig eine allelbasierte Selektion ermöglichen. Die Pflanzenzüchtung wird damit in die Lage versetzt, schneller und gezielter auf die zukünftigen Herausforderungen, d.h. eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz, zu reagieren.

Literatur

- Arunyanark, A., S. Jogloy, C. Akkasaeng, N. Vorasoot, T. Kesmala, R.C. Nageswara Rao, G.C. Wright und A. Patanothai, 2008: Chlorophyll Stability is an Indicator of Drought Tolerance in Peanut. *J. Agronomy & Crop Science* **194**, 119-125.
- Ashraf, M. und M.R. Foolad, 2007: Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 206–216.
- Bhatnagar-Mathur, P., V. Vadez und K.K. Sharma, 2008: Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* **27**, 411-424.
- Cattivelli, L., F. Rizza, F. Badeck, E. Mazzucotelli, A.M. Mastrangelo, E. Francia, C. Mare, A. Tondelli und A.M. Stanca, 2008: Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105**, 1-14.
- Close, T.J., P.R. Bhat, S. Lonardi, (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* **10**, 582 doi:10.1186/147-2164-10-582.
- Comadran, J., J.R. Russel, F.A. van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, M. Baum, A.M. Stanca, N. Peccioni, 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 und W.T.B. Thomas, 2008: Mapping adaptation of barley to droughted environments. *Euphytica* **161**, 35-45.
- Delseny, M., B. Han und Y.I. Hsing, 2010: High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science* **179**, 407-422.
- Deschamps, S. und M.A. Campbell, 2009: Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Mol Breeding* **25**, 553-570.
- Fernie, A.R. und N. Schauer, 2008: Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends in Genetics* **25**, 39-48.
- Friedt, W. und K. Link, 2007: Ansätze der Züchtung auf Stresstoleranz. *Vorträge Pflanzenzüchtung* **72**, 69-77.
- Heffner, E. L., M. E. Sorrells, und J. L. Jannink, 2009: Genomic selection for crop improvement. *Crop Science* **49**, 1-12.
- Munroe, D.J. und J.R. Harris, 2010: Third-generation sequencing fireworks at Marco Island. *Nature Biotechnology* **28**, 426-428.
- Ordon, F., 2008: Pflanzenzüchterische Möglichkeiten der Anpassung von Nutzpflanzen an zukünftige Produktionsbedingungen. In: *Pflanzenproduktion im Wandel – Wandel im Pflanzenschutz*. A. von Tiedemann, R. Heitefuss, F. Feldmann (Hrsg.). *Spectrum Phytomedizin*: 90-102.
- Ordon, F., 2011: Visionen der Pflanzenzüchtung zur Ertragssteigerung, -sicherung und Eröffnung neuer Verwertungsperspektiven. http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/LW2025/FrankOrden.pdf?__blob=publicationFile
- Ordon, F., A. Bartelmann, S. Seddig, und A. Habekuss, 2011: Pflanzenzüchterische Anpassung von Kulturpflanzen an zukünftige Produktionsbedingungen. *Forschungsreport (im Druck)*.
- Oukarroum, A., G. Schanker, und R.J. Strasser, 2009: Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum* **137**, 188–199.
- Papdi, C., M.P. Joseph, I.P. Salamo, 2009: Genetic technologies for the identification of plant genes controlling environmental stress responses. *Functional Plant Biology* **36**, 696-720.
- Park, T.H., V.G.A.A. Vleeshouwers, E. Jacobsen, E. van der Vossen und R.G.F. Visser, 2009 Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breeding* **128**, 109-117.
- Pennisi, E., 2008: Plant genetics: The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* **320**, 171-173.
- Schurr, U., 2009: Merkmalsanalyse: Hochdurchsatz –Phänotypisierung. *Vorträge Pflanzenzüchtung* **81**, 95.
- Siddique, K.H.M., K.L. Regan, D. Tennant, und B.D. Thomson, 2001: Water use and water use efficiency of cool season grain legumes in low rainfall Mediterranean-type environments. *European Journal of Agronomy* **15**, 267-280.
- Talame, V., N.Z. Ozturk, H.J. Bohnert, und R. Tuberosa, 2007: Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J Exp Botany* **58**, 229-240.
- Waugh, R., J.L. Jannink, G.J. Muehlbauer und L. Ramsay, 2009: The emergence of whole genome association scans in barley. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 218-222.
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinbartsch, und A. Kilian, 2004: Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9915-9920.