

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

## **Biologie**

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0312280 A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

Forschungsvorhaben:  
**Vergleichende Sequenzierung zweier Regionen im Gersten- und Reisgenom  
(GABI-MAP)**

Förderkennzeichen:  
0312280 A

Zuwendungsempfänger:  
Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben

Projektleiter:  
Dr. Marion Röder, Prof. Andreas Graner

Laufzeit:  
01. 03. 2000 – 30. 06. 2003

### **I.1. Aufgabenstellung:**

Das Arbeitsprogramm umfaßte den Aufbau von BAC-Contigs für zwei Regionen des Gersten- und Reisgenoms zur Untersuchung der Mikrosyntänie zwischen dem großen Gerstengenom (ca. 5 pg) und dem etwa 10-mal kleineren Reisgenom. In einem Fall handelte es sich um den Bereich des *Rh2*-Resistenzgenes auf Gerstenchromosom 7HS, welcher Resistenz gegen das pilzliche Pathogen *Rhynchosporium secalis* vermittelt, und den syntänen Bereich auf Chromosom 6 des Reisgenomes. Die zweite Region enthält den *rym4/rym5* Locus für Resistenz gegen Barley Mild Mosaic (BaMMV) bzw. Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) auf Chromosom 3HL der Gerste und die entsprechende syntäne Region auf Reischromosom 1. Für jede Region wurden BAC-Contigs aufgebaut und anschließend etwa 450 kb des Gerstengenoms sequenziert und mit der entsprechenden Region des Reisgenoms auf DNA-Sequenzebene verglichen. Mit diesem Sequenzvergleich sollte die Anzahl der Gene pro kb und die Konservierung der Genabfolge untersucht werden. Ferner wurden Informationen über Sequenzähnlichkeiten im Bereich von Resistenzgenen und über die Struktur der intergenischen Bereiche zwischen Reis und Gerste gewonnen. Ergebnisse dieser Arbeiten beantworten die Frage inwieweit die Reis/Gersten-Syntänie für die Isolation von weiteren Resistenzgenen aus der Gerste genutzt werden kann und damit die umfangreichen internationalen genomischen Ressourcen der Modellpflanze Reis für Entwicklungen und Genisolierungen in der Gerste einsetzbar sind.

### **I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:**

Am Pflanzengenom-Ressourcen Zentrum des IPK stand eine Gersten-BAC-Bibliothek der Sorte Morex zur Verfügung, welche in den USA entwickelt wurde (Yu et al. 2000). Diese Bibliothek hat einen Umfang von über 310.000 Einzelklonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 106 kb. Daraus errechnet sich eine theoretisch mehr als 6-fache Repräsentation des haploiden Gerstengenoms. Für die Bibliothek standen hochdichte Koloniefilter für die Southern Hybridisierung sowie DNA-Pools für ein PCR-gestütztes Screening zur Verfügung. Für die Feinkartierung der beiden Resistenzgene standen hochauflösende Kartierungspopulationen zur Verfügung, welche im Laufe des Projektes noch erweitert wurden (vgl. I.4 und II.1).

Aus dem japanischen Reisgenomprojekt standen öffentliche Informationen über die Sequenzen der beiden syntänen Regionen aus Reis zur Verfügung (<http://rgp.dna.affrc.go.jp>).

Yu, Y., Tomkins, J.P., Waugh, R., Frisch, D.A., Kudrna, D., Kleinhofs, A., Brueggeman, R.S., Muehlbauer, G.J., Wise, R.P., Wing, R.A.: A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor Appl Genet* 101: 1093-1099 (2000).

### **I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens:**

Das Vorhaben gliederte sich in zwei unabhängige Teilprojekte, welche parallel in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden. Teilprojekt A betrifft die Sequenzierung im Bereich des *Rh2*-Resistenzgenes auf Gerstenchromosom 7H und wurde in der Gruppe Gen- und Genomkartierung unter Leitung von Herrn Dr. M. Ganai und nach dessen Ausscheiden vom IPK von Frau Dr. M. Röder durchgeführt. Teilprojekt B betrifft die Sequenzierung im Bereich des *rym4/rym5* Resistenzlocus auf Gerstenchromosom 3H und wurde in der AG Molekulare Marker unter Leitung von Herrn Prof. A. Graner und Dr. N. Stein durchgeführt.

Aufgrund der gegenüber der ursprünglichen Antragstellung um 50% gesunkenen Sequenzierkosten konnte im Laufe der Projektarbeiten die doppelte Anzahl an BACs sequenziert werden. Insgesamt wurden somit anstatt von 3 BACs pro Teilprojekt 6 BACs pro Teilprojekt sequenziert.

### **I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Projektes**

Durch vergleichende Kartierung von RFLP-Sonden war bekannt, dass Reischromosomen in großen chromosomalen Bereichen eine konservierte Markieranordnung zu anderen Gramineen wie Mais oder Weizen besitzen (Ahn et al. 1993). Dies führte zu der Annahme, dass sich die Chromosomen der verschiedenen Gramineen-Arten auf ein Urgenom zurückführen lassen, welches durch Translokationen und andere genomische Rearrangements zur Herausbildung der heutigen Arten führte. Von praktischer Bedeutung ist dabei, dass Kenntnisse über die Kartierungsposition einer Markersonde in einer Spezies oft auf andere Gramineen-Spezies übertragbar sind (Moore et al. 1995; Gale & Devos 1998). Neben dieser sogenannten Makrosyntenie zeigten vergleichende Sequenzierungen von

syntänen genomischen Regionen in verschiedenen Gramineen-Arten oft auch eine Mikrokolinearität auf der Ebene einzelner Gene und deren Anordnung im Genom (Chen et al. 1997; Bennetzen 2000; Dubcovsky et al. 2001). Diese Makrokollinearität fehlt in Genregionen um sogenannte Resistenzgenanaloga, die als schnell evolvierende Loci in Zusammenhang mit Genomumstrukturierung betrachtet werden (Leister et al. 1998). Hierbei ist unklar, inwieweit die Ursache in genomischen Rearrangements im Bereich der Resistenzgene oder aber in der divergenten Evolution derselben zu suchen ist. Ziel dieses Projektes war es daher zu untersuchen, inwieweit interspezifische Mikrolinearität auch im Bereich von Resistenzgenen beobachtet werden kann.

#### Relevante Publikationen:

Ahn, S., Anderson, J.A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D.: Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* 241: 483-490 (1993)

Bennetzen, J.L.: Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: microlinearity and its many exceptions. *Plant Cell* 12: 1021-1029 (2000)

Chen, M., Saniguel, P., Oliviera, A.C., Woo, S.-S., Zhang, H., Wing, R.A., Bennetzen, J.L.: Microlinearity in the sh2-homologous regions of the maize, rice and Sorghum genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3431-3435 (1997)

Dubcovsky, J., Ramakrishna, W., SanMiguel, P.J., Busso, C.S., Yan, L., Shiloff, B.A., Bennetzen, J.L.: Comparative sequence analysis of colinear barley and rice bacterial artificial chromosomes. *Plant Physiol.* 125: 1342-1353 (2001)

Gale, M.D., Devos, K.M.: Comparative genetics in the grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1971-1974 (1998)

Leister, D., Kurth, J., Laurie, D.A., Yano, M., Sasaki, T., Devos, K., Graner, A., Schulze-Lefert, P.: Rapid organization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 370-375 (1998)

Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z., Gale, M.D.: Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* 5: 737 (1995)

#### **Projektteil A: Sequenzierung der Region um das *Rh2*- Resistenzgen auf Chromosom 7H**

Aus früheren Kartierungsarbeiten war bekannt, dass das *Rh2*-Resistenzgen gegen den Erreger der Blattfleckenkrankheit bei Gerste *Rhynchosporium secalis* auf dem kurzen Arm von Gerstenchromosom 7H (1 nach alter Nomenklatur) nahe dem Marker MWG555 kartiert (Schweizer et al. 1995). Das *Rh2*-Gen stammte dabei aus der Gerstensorte Atlas. Bei einer genaueren Kartierung von 741 F2-Pflanzen (= 1482 Gameten) der Kreuzung Atlas x Steffi konnte das *Rh2*-Gen in ein Intervall von ca. 1 cM zwischen den Markern MWG2018 und MWG555 kartiert werden (Schmidt et al. 2001). Aus publizierten Arbeiten von Kilian et al. 1995; 1997 war bekannt, dass diese Region des Gerstenchromosoms 7H Homologien zu Reischromosom 6 besitzt. Die Ausnutzung dieser Informationen aus Reis erlaubte es homologe Hybridisierungssonden für Gerste zu entwickeln, welche für den Aufbau des Gersten-BAC Contigs benutzt werden konnten.

#### Relevante Publikationen:

Kilian, A., Kudrna, D.A., Kleinhofs, A., Yano, M., Kurata, N., Steffenson, B., Sasaki, T.: Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley *Rpg1* region. *Nucl. Acids Res.* 23: 2729-2733 (1995)

Kilian, A., Chen, J., Han, F., Steffenson, B., Kleinhofs, A.: Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol. Biol.* 35: 187-195 (1997)

Schmidt, D., Röder, M.S., Dargatz, H., Wolf, N., Schweizer, G.F., Tekauz, A., Ganai, M.W.: Construction of a YAC library from barley cultivar Franka and identification of YAC-derived markers linked to the *Rh2* gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*). Genome 44: 1031-1040 (2001)

Schweizer, G.F., Baumer, M., Daniel, G., Rugel, H., Röder, M.S.: RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene *Rh2* in barley. Theor Appl Genet 90: 920-924 (1995)

### Projektteil B: Sequenzierung der Region um den *rym4/rym5* Resistenzlocus auf Chromosom 3H

Resistenz gegenüber den Bymo-Viren BaMMV und BaYMV wird in Gerste durch verschiedene rezessive Loci kontrolliert, die über das Gerstengenom verstreut sind. Ein Locus, *rym4/rym5* wurde in einem ca. 2 cM großen Intervall zwischen den Markern MWG010 und MWG838 in zwei Population aus Igri (anfällig) x Franka (resistent, *rym4*) bzw. Igri x W122 (basiert auf Resistant Ym No.1, resistent, *rym5*) auf Gerste Chromosom 3HL kartiert (Graner und Bauer 1993, Graner et al. 1999). *Rym4* vermittelt gegenüber zwei, *rym5* gegenüber drei Virusstämmen Resistenz. Es ist ungeklärt, ob es sich bei diesem Locus um zwei unabhängige Resistenzgene oder um Allele desselben Gens handelt, da bisher, in umfangreichen Resistenztests, keine Rekombination zwischen beiden Resistenzspezifitäten gefunden werden konnte (Graner et al. 1999, Dr. Frank Ordon, persönliche Mitteilung). Vor Beginn des Projektes wurden zwei Reismarker (RZ783 und C112) flankierend zu MWG010 als kolinear zwischen Gerste und Reis identifiziert (Abb. 1, *rym4*) (Streng 2000 und eigene unveröffentlichte Daten). Studien zur Syntanie des Reis- und Gerstengenoms ergaben bereits zuvor, dass Gerste Chromosom 3H (bzw. das Consensus-Triticeae Chromosom 3) und Reis Chromosom 1 zu den am besten, über die gesamte Chromosomenlänge, konservierten Kopplungsgruppen zwischen beiden Spezies gehören (Moore et al. 1995, Smilde et al. 2001). Diese Erkenntnis konnte durch die umfangreiche Kartierung EST-basierter Marker inzwischen weiter verdichtet werden (Sorrells et al. 2003, Prasad et al., Manuskript in Vorbereitung, GABI-PLANT 0312271A). Es bestand die Einschätzung, dass der Resistenzlocus *rym4/5* sich in einem kolinearen Genomabschnitt zwischen Gerste und Reis befinden sollte. Vor Beginn des Projektes existierten unabhängige BAC bzw. BAC/YAC Contigs in relativ großem flankierenden Abstand zum Locus *rym4/5*, deren Einzelklone für die vergleichende Sequenzierung eingesetzt werden konnten (Abb. 1).

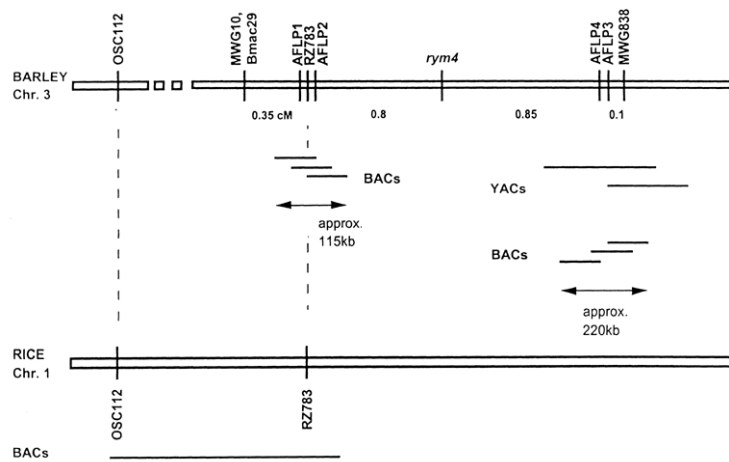


Abbildung 1:  
Syntanie zwischen Gerste Chromosom 3H und Reis Chromosom 1  
Ausgangssituation zur vergleichenden Kartierung des *rym4/5* Locus zu Beginn des Projektes. Distal des Gens *rym4* wurden die Reismarker RZ783 und C112 in Colinearität zwischen Gerste und Reis kartiert. In jeweils ca. 0,8 cM Entfernung vom Resistenzlocus waren bereits Contigs etabliert

### Relevante Publikationen:

Graner, A., Bauer, E.: RFLP-mapping of the *ym4* virus resistance gene in barley. Theor Appl Genet 86:689-693 (1993).

Graner, A., Streng, S., Kellermann, A., Schiemann, A., Bauer, E., Waugh, R., Pellio, B., Ordon, F.: Molecular mapping and fine structure of the *rym5* locus encoding resistance to different strains of the Barley Yellow Mosaic Virus Complex. Theor Appl Genet 98: 285-290 (1999).

Graner, A., Streng, S., Kellermann, A., Proeseler, G., Schiemann, A., Peterka, H., Ordon, F. Molecular mapping of genes conferring resistance to soil-borne viruses in barley – an approach to promote understanding of host-pathogen interaction. J. Plant Diseases & Plant Protection 106: 405-410 (1999).

Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z.Gale, M.D.: Grasses, line up and form a circle. Curr Biol 5: 737-739 (1995).

Smilde, W.D., Halukova, J., Sasaki, T.Graner, A.: New evidence for the synteny of rice chromosome 1 and barley chromosome 3H from rice expressed sequence tags. Genome 44: 361-367(2001).

Sorrells, M.E., La Rota, M., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R., Munkvold, J.D., Miftahudin, M.A., Ma, X., Gustafson, P.J. et al.: Comparative DNA Sequence Analysis of Wheat and Rice Genomes. Genome Res 13: 1818-1827(2003).

Streng, S.: Strategien zur Markersättigung im Bereich des *rym4* Resistenzlocus bei der Gerste. Dissertation, Shaker Verlag, Aachen, ISBN 3-8265-6876-1 (2000).

### **I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Die Sequenzierung von insgesamt 12 Gersten-BACs wurde nach Ausschreibung als Unterauftrag an die Fa. AGOWA GmbH, Glienicker Weg 185, 12489 Berlin vergeben.

## **II.1. Erzielte Ergebnisse**

### **Projektteil A: Sequenzierung der Region um das *Rh2*- Resistenzgen auf Chromosom 7H**

(durchgeführt in der Arbeitsgruppe Gen- und Genomkartierung unter Leitung von Frau Dr. Röder)

#### **A.1 Feinkartierung des Resistenzgenes *Rh2***

Aus vorausgehenden Kartierungen in einer Doppelhaploiden-Population war bekannt, dass *Rh2* zwischen den Markern PSR119 und MWG555 in einer distalen Region auf Chromosomenarm 7HS kartiert (Schmidt et al. 2001). Die beiden genannten Marker wurden zu einem Rekombinantscreen in einer F2-Population der Kreuzung Atlas x Steffi verwendet. Aus rund 750 F2-Pflanzen (= 1500 Gameten) wurden 15 rekombinante Pflanzen in dem Intervall PSR119-MWG555 gefunden und zu homozygot Rekombinanten weiter entwickelt. Dieser Schritt ist notwendig, da der Rhynchosporium Resistenz-Test nicht mit Einzelpflanzen durchgeführt werden kann und mehrmals wiederholt werden muss. Die Resistenz-Tests wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Günther Schweizer von der Bayerischen Landesanstalt in Freising durchgeführt.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden weitere Marker gefunden, welche näher an *Rh2* kartieren. In einem weiteren Rekombinantscreen mit den Markern AFLP14 und B-R1 wurde die Gesamtzahl der getesteten F2-Pflanzen auf ca. 2500 (= 5000 Gameten) erhöht und weitere 7 Rekombinante in diesem Intervall gefunden, so dass die Gesamtzahl der Rekombinanten in diesem Intervall 9 beträgt. Im Verlauf des weiteren ‚Walk‘ wurden neue Marker aus den gefundenen BACs entwickelt (Abb. 2). Die Marker G-71 und G-REV kosegregieren mit den bisher vorhandenen rekombinanten Pflanzen mit *Rh2*. Daher wurde ein weiterer Rekombinantscreen mit den Markern AFLP14 und A-D23R initiiert. In insgesamt 2155 Pflanzen (= 4310 Gameten) wurden 12 Rekombinante identifiziert. Aus diesen werden derzeit homozygote Linien selektiert, um die Feinkartierung durchführen zu können. In Abb. 2 sind die verschiedenen Schritte der Rekombinantenselektion zusammengefasst.

Für das Intervall AFLP14/A-23R ergeben sich nach dem dritten Screening insgesamt 20 rekombinante Pflanzen in einer Population von 4721 F2-Pflanzen (9442 Gameten), welches einer genetischen Distanz von 0,21 cM für das Intervall bzw. 0,011 cM pro rekombinante Pflanze entspricht. Die Auflösung entspricht demnach 11-48 kb pro rekombinante Pflanze, wenn man nach Künzel (2000) zugrunde legt, dass 1 cM am telomeren Ende auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (7H) einer physikalischen Distanz von 1 - 4,4 Mb entspricht. Diese Größenordnung deckt sich mit den beobachteten 6 Rekombinanten /230kb = 1 Rekombinante/38 kb im Intervall E-E4 bis G-REV basierend auf insgesamt 2571 Pflanzen (=5142 Gameten) vom ersten und zweiten Screening.