

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 0313125A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

Forschungsvorhaben:
GABI-MALT: Ein integrierter Ansatz zur Identifizierung von Kandidatengen für das Merkmal Brauqualität bei Gerste

Teilprojekt 4:
SNP-Detektion und Haplotypenanalyse in Kandidatengen für Malzqualität (GABI-MALT)

Förderkennzeichen:
0313125A (Teilprojekt 4)

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

Projektleiter:
Dr. Marion Röder (Teilprojekt 4)

Laufzeit:
1. 08. 2004 – 31. 07. 2007 (kostenneutrale Verlängerung bis 31. 10. 2007 im Teilprojekt 4)

Content of the Final Project Report

I.	Project goals, preconditions of the project, plan and flow of the project and cooperations	1
I.1.	Project goals	1
I.2.	Preconditions of the project	1
I.3.	Working plan and flow of the project	2
I.4.	Scientific and technical state at the beginning of the project	3
I.5.	Cooperations	4
II.	Results and potential applications	5
II.1.	Results achieved	5
A.	Marker development	5
B.	Population structure	9
C.	Linkage mapping of several candidate genes	10
D.	Association studies with field data from Freising	10
E.	Association studies with phenotypic data from 'Metabrew'	11
E.1.	Associations with the candidate gene for α -amylase <i>amy1</i>	12
E.2.	Association mapping and marker development of the candidate genes (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase and (1 \rightarrow 4)- β -Xylan-endohydrolase I	13
E.3.	Association studies with further candidate genes	16
	References	18
II.2.	Möglicher voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	21
A.	Kostenneutrale Verlängerung von Teilprojekt 0313125A	21
B.	Identifikation und richtige Zuordnung der 56 Sorten im GABI MALT Set	21
C.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	22
D.	Verwertbarkeit der erzielten Ergebnisse	22
II.3.	Fortschritte bei anderen Forschungsprojekten auf dem Gebiet	23
	Zitierte Literatur	23
II.4.	Erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse	25
	Publikationen	25
	Vorträge	26
	Poster	26
III.	Erfolgskontrollbericht	29
1.	Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms	29
2.	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens	29
3.	Fortschreibung des Verwertungsplans	30
4.	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	31
5.	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer - z. B. Anwenderkonferenzen	32
6.	Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung	32
	Berichtsblatt	33
	Document Control Sheet	34

I. Project goals, preconditions of the project, plan and flow of the project and cooperations

I.1. Project goals

Apart from yield, malting quality is the most important trait in any spring barley breeding program. Despite its salient importance, the quantitative inheritance exacerbated a detailed genetic analysis on the structural level. This project was part of an integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley (GABI-MALT).

The structural genetic diversity present in the barley germplasm can be harnessed by associating haplotypes of candidate genes to malting quality parameters with the goal of marker-development for those traits. This is performed in three main steps (1) identification of candidate genes from the literature and by using functional genomics approaches, (2) analysis of the allelic diversity of malting related candidate genes, and (3) association of haplotypes and single nucleotide polymorphism (SNP)-patterns with malting quality parameters. The main objective of subproject 4 was to determine haplotypes of key enzymes involved in the malting process and of candidate genes associated with malting properties. Their genetic contribution to the malting and brewing properties should be evaluated.

I.2. Preconditions of the project

Plant material

Barley accessions derived from three sources:

1. Our project partner Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising (subproject 3) with 64 cultivars.
2. From the former GABI-Diversity-Project (FKZ: 0312278C9 332) cultivars were studied. These were acquired from breeding companies and the barley core collection from the genebank Gatersleben (Knüpffer and Hintum 1995).
3. German breeders provided 144 additional recently released cultivars.

All cultivars were mainly of German origin and comprised of spring and winter, 2-rowed and 6-rowed forms.

Marker-Methodology

SNP-marker-development was done either by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)-assays or mainly by pyrosequencing (PSQ). INDEL-Markers were established by capillary sequencing performed by the industrial partner SURL. Fragment analysis by SSR-markers (also called microsatellites) on automated sequencers had been well established in the research group of Dr. M. Röder for wheat and barley (Röder et al. 2002; Malysheva-Otto et al. 2006). SSR-markers for barley were available from public sources (Ramsay et al. 2000; Varshney et al. 2007) and from an own development program (Li et al. 2003). SSR-data randomly scattered over the whole barley genome were used for determination of population structure.

Phenotypic database 'Metabrew'

By combining genotypic and phenotypic information, it is possible to perform association studies to a large extent. For this purpose, data of approx. 120 malting and brewing parameters of 250 barley cultivars were collected either from public sources such as

‘Bundessortenamt’, ‘Landessortenversuche’ and ‘Braugerstenjahrbücher’ over the past 20 years and handled in a database called “MetaBrew” which was developed in collaboration with the Bioinformatics group at IPK. Up to now, approximately 80,000 datapoints are available. Association studies assuming the General Linear Model (GLM) and the Mixed Linear Model (MLM) with regard of population structure and kinship were performed and significant relationships between single SNPs or haplotypes and certain malting properties could be determined.

I.3. Working plan and flow of the project:

Three main scientific and technological aims were treated in this project:

1. Determination of haplotypes of key enzymes encoded by candidate genes crucial in the malting process in a panel of 46 barley varieties.
2. Haplotype association with malting data obtained in subproject 3 and determination of those genotypes associated with superior quality.
3. Development of SNP- and INDEL-markers in order to perform large scale genotyping in a wider germplasm.

All four milestones

1. Allele-specific sequencing of candidate genes (WP 8.1.1 to WP 8.1.3)
2. Phenotypic association and SNP-marker development (WP 8.2.1, WP 8.2.2)
3. SNP-fingerprinting of 1000 genotypes (WP 8.3.1)
4. Analysis of population structure and identification of beneficial alleles (WP 8.4.1)

have been successfully accomplished at the end of the project time.

In total, 62 candidates chosen from EST-expression (16) (Subproject 1) and from literature (48) were screened for SNP- and INDEL-polymorphisms after sequencing of PCR-amplified genomic fragments.

More than 50 % of 444 screened primer combinations showed polymorphisms in a set of eight diverse reference genotypes and were resequenced in a larger set of varieties (Milestone 1). Out of these, 40 SNP-markers (either by CAPS- or pyrosequencing-assays) and eight INDEL-markers could be developed effectually for 19 of those genes, e.g. α -amylase 1 (*amy1*), (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase (*glb*), (1 \rightarrow 4)- β -Xylan-endohydrolase 1 (X-1), serine-carboxypeptidase 1 (*Cxp 1*), flavone-3-hydroxylase (*F3H*), proteindisulfide-isomerase (*PDI*). SNP-assays for additional 17 candidate genes were developed and tested, but not screened on a large set of genotypes (Milestone 2).

Phenotypic data obtained from micromalting experiments performed by our partner LfL in Freising (subproject 3) were of limited use for our association studies due to large effects of sample size, high variability and bad reproducibility of the analysis results. Therefore, from six environments evaluated, only two (Freising 2005 and 2006) could be used for preliminary studies with 34 spring cultivars (Milestone 2). Phenotypic data were obtained from our “Metabrew-Database” which was not part of the project, but was created to obtain more malting and brewing quality data and to avoid sample effects. Up to now, 80 000 datapoints are available.

Fingerprinting of approx. 1000 genotypes (cultivars and breeder strains) was performed with INDEL-markers by our industrial project partner Saaten-Union-Resistenzlabor (SURL),

whereas all SNP-Markers were analysed mainly by pyrosequencing on a set of approx. 500 cultivars including duplicates with regard on available phenotypic data for association studies at IPK_GGK. Genotyping by CAPS-Markers was performed in a close collaboration with SURL (Milestone 3).

Population structure analysis with 24 SSR-markers showed that a subset of 342 genotypes was divided into two main subgroups (winter- and spring barley). Approx. 140 cultivars were used to perform association studies of 19 candidate genes according to their haplotype pattern and single SNP- and INDEL-marker data with and without regard of population structure assuming the General Linear Model. A number of moderately to high significant associations were found for 16 malting quality and 13 kernel quality parameters derived from “Metabrew” for single SNPs and haplotypes of the candidate genes (Milestone 4).

Originally, the investigation of 1000 barley accessions was planned according to the proposal. This number was cut down to approx. 500 barley accessions due to the availability of genotypic material and of suitable phenotypic data for performing association studies on a large scale. Instead of 50 planned candidate genes for malting quality 62 were studied in this project and screened for PCR-amplification and sequencing ability. Molecular markers were developed for one third of them. All proposed milestones were successfully achieved within the timeframe including the extension of the project.

I.4. Scientific and technical state at the beginning of the project

Multiple QTLs could be identified with relation to malting quality related traits by classical QTL-analysis in segregating populations (Hayes et al. 1993; Marquez-Cedillo et al. 2000; summarized in: Fox et al. 2003). Marker-assisted selection has been performed for malt extract quality QTLs (Han et al. 1997). While the use of biparental mapping populations exploits only the genetic diversity of the parental lines, association mapping, also referred to as linkage disequilibrium (LD) mapping, can reveal the influence of specific sequence polymorphisms in candidate genes to phenotypic variation in a wider germplasm pool (Thornsberry et al. 2001; Beló et al. 2008; Harjes et al. 2008). Correlation of genetic and phenotypic variation through association analysis is determined by the extent of LD, which is expected to be high in autogamous species such as *Hordeum vulgare* L. (Caldwell et al. 2006; Rostoks et al. 2006; Stracke et al. 2007). Association mapping has been performed in barley by using approaches with genome wide marker coverage (Kraakman et al. 2004; Kraakman et al. 2006; Rostocks et al. 2006) as well as by investigating specific candidate genes (Cockram et al. 2008; Haseneyer et al. 2008; Matthies et al. 2009a; Matthies et al. 2009b; Stracke et al. 2008; Malysheva-Otto and Röder 2006).

In this study, a number of candidate genes encoding enzymes which are involved in the germination and malting process were selected (Fox et al. 2003; Hayes et al. 2003; Swanston et al. 2002). Most of them are known to be important in starch-degradation of the germinating barley grain, such as α -amylases, α -glucosidases, saccharases, as well as those responsible for cell wall degrading activities, such as xylanases, β -glucanases and genes coding for enzymes and proteins with more general functions, such as peptidases, phosphatases, kinases and lipases and genes coding for storage proteins like hordeins or certain inhibitors, e.g. limit dextrinase (LDX) inhibitor and barley α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI).

Additionally, we investigated some 16 ESTs, which showed significant expression in terms of malting and were provided by A. Graner, Subproject 1 (Potokina et al. 2004; Potokina et al. 2006).

I.5. Cooperations

Seed samples from recent barley cultivars were obtained from various breeding companies including:

Germany: Bayer. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising
Intersaatzucht Schweiger GmbH
Deutsche Saatveredelung GmbH
I.G. Saatzucht GmbH Bernburg und Biendorf
Klaus Pillen (Univ. of Bonn)
Lochow-Petkus GmbH
Nickerson-Limagrain GmbH
Nordsaat Saatzeitgesellschaft m.b.H.
Saaten-Union Resistenzlabor GmbH
Saatzeit Ackermann
Saatzeit Bauer GmbH
Saatzeit Firlbeck GmbH & CoKG
Saatzeit Josef Breun GDBR
Swalöf-Weibull, Hadmersleben
Saatzeitgesellschaft Streng's Erben GmbH&CoKG
Saatzeit Hege, Waldenburg
Pflanzzeit Dr. h.c. Carsten KG
Saatzeit Firlbeck GmbH & Co KG

France : ETS C.C. Benoist
ETS Lemaire Defontaines
Florimond Desprez
G.A.E. Recherche
G.I.E Unisigma
INRA
R.A.G.T. SA.
SCA Adrien Momont
Secobra Recherches
Serasem
Verneuil Recherche

Great Britain: Advanta Seeds
New Farm Crops LTD
CPB Twyford LTD

Denmark: Pajbjergfonden
Sejet Planteforaedling I/S

Netherlands: Cebeco Zaden B.V.

Sweden: Svalöf Weibull AB

Italy: Produttori Sementi Bologna

Further seed samples from older European varieties and non-European barley accessions were obtained from the genebank at IPK Gatersleben.

II. Results and potential applications

II.1. Results achieved

A. Marker development

In total, 48 markers were developed successfully for 19 candidate genes and screened on a large set of genotypes (Tab.1). SNP-assays for additional 17 candidate genes were developed and tested, but not genotyped.

Tab. 1: Marker development for candidate genes with putative impact on malting quality

Candidate gene	Primer-combination Gene-fragment	Number of SNP-markers		INDEL
		Pyro	CAPS	
ABA7-induced Protein	GM229	1	CAPS	—
α -Amylase 1 (<i>amy1</i>)	GM125	6	P	—
(1,4)- β -Xylanase (X-1)	GM111	2	P	—
(1,3)(1,4)- β -Glucan-hydrolase	GM042	3	P	—
	GM172	—	—	1
Endo-1,4- β -glucanase (<i>Cel 1</i>)	GM145	—	—	1
Catalase 1 (<i>cat 1</i>)	GM104	2	P	—
Chalcone synthase I	GM288	1	CAPS	—
Cysteine proteinase	GM188	—	—	1
Dehydro-ascorbate-reductase	GM097	—	—	1
Flavone-3-hydroxylase	GM023+178	2	P	—
	GM176	—	—	1
P-Lipase D-like protein	GM370	2	P	—
Proteinase inhibitor (<i>bci7</i>)	GM378,379	2	CAPS	—
Protein-disulfide-isomerase	GM082, 200, 201	4	P	1
LOX A = LOX 1	GM319	1	CAPS	—
LOX B	GM346	1	CAPS	—
LOX C = LOX 2	GM327	1	P	1
Serine-carboxypeptidase I (<i>Cxp I</i>)	GM160	5	P	—
	Ts/Tas	3	P	—
	Us/Uas = GM159	3	P	—
Serpin	GM057	1	P	—
Starch-synthase I	GM053	—	—	1
Total		40		8

Six of the markers were converted into CAPS-assays (=cleaved amplified polymorphic sequence), such as for candidate gene encoding the ABA-7 induced protein (Fig. 1) or the lipoxygenase gene LOX A (Fig. 2).

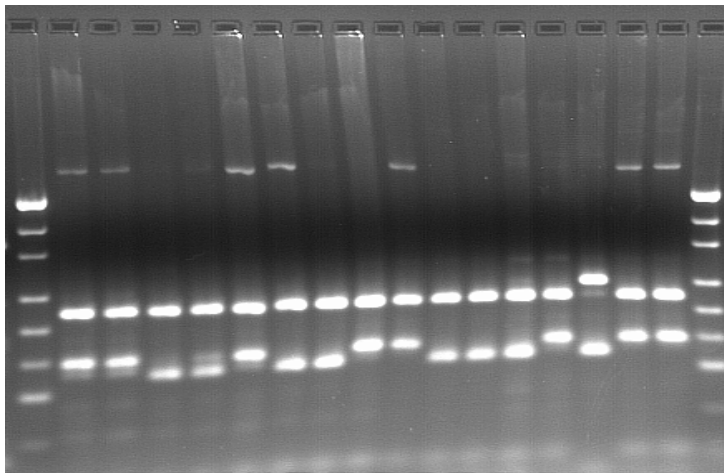


Fig. 1: CAPS assay for gene of ABA-7-induced protein.

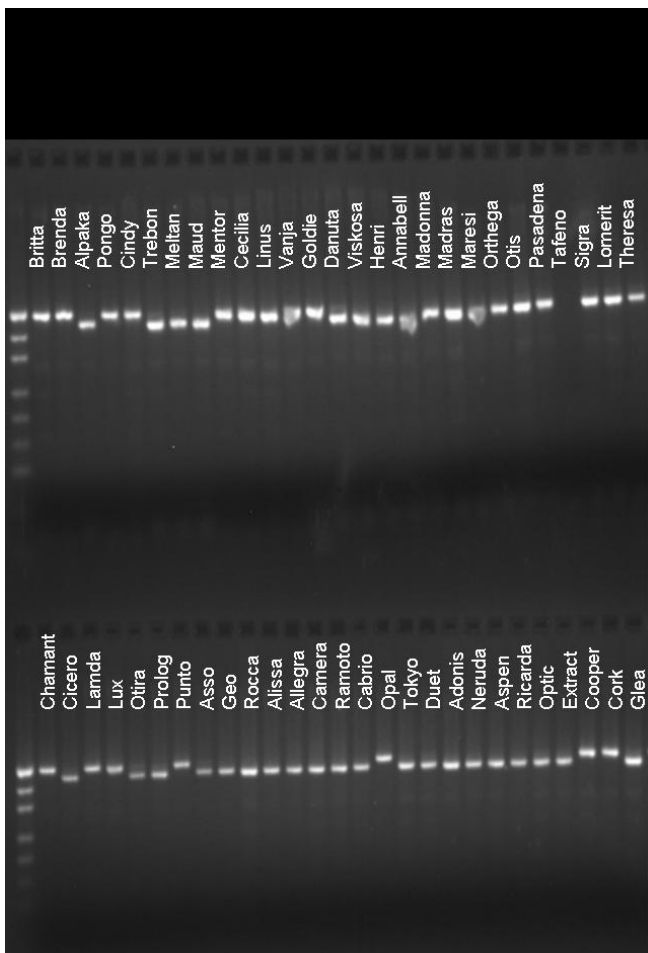


Fig. 2: CAPS assay for lipoxygenase gene LOX A.

A total of 40 pyrosequencing marker assays in order to perform high-throughput genotyping were developed for different candidate genes, such as (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucanohydrolase (Fig. 3) and (1→4)-β-Xylan-endohydrolase1 (Fig. 4).

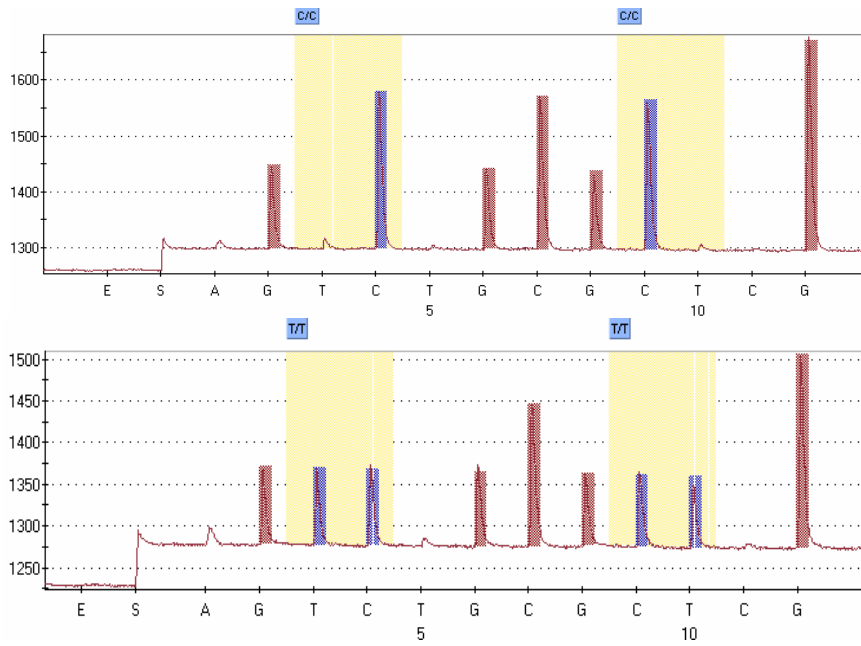
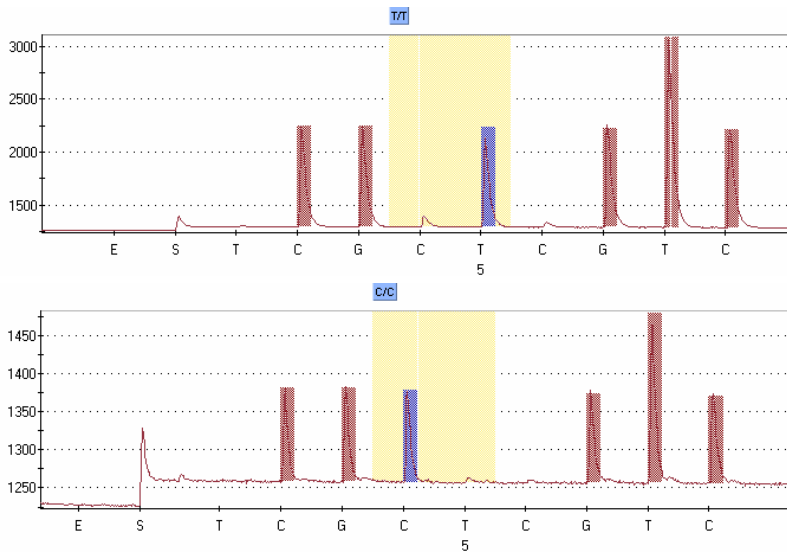
(a) *glb2*_SNP3 (C/T) SNP4 (C/T)**(b) *glb2*_SNP5 (T/C)**

Fig. 3: Pyrogram of SNP3 and SNP4 in one assay **(a)** and SNP5 **(b)** of the (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucanohydrolase (*glb2*) gene. All three SNPs represent together with the INDEL-Marker developed by SURL one haplotype for this gene (Matthies et al. 2009b).

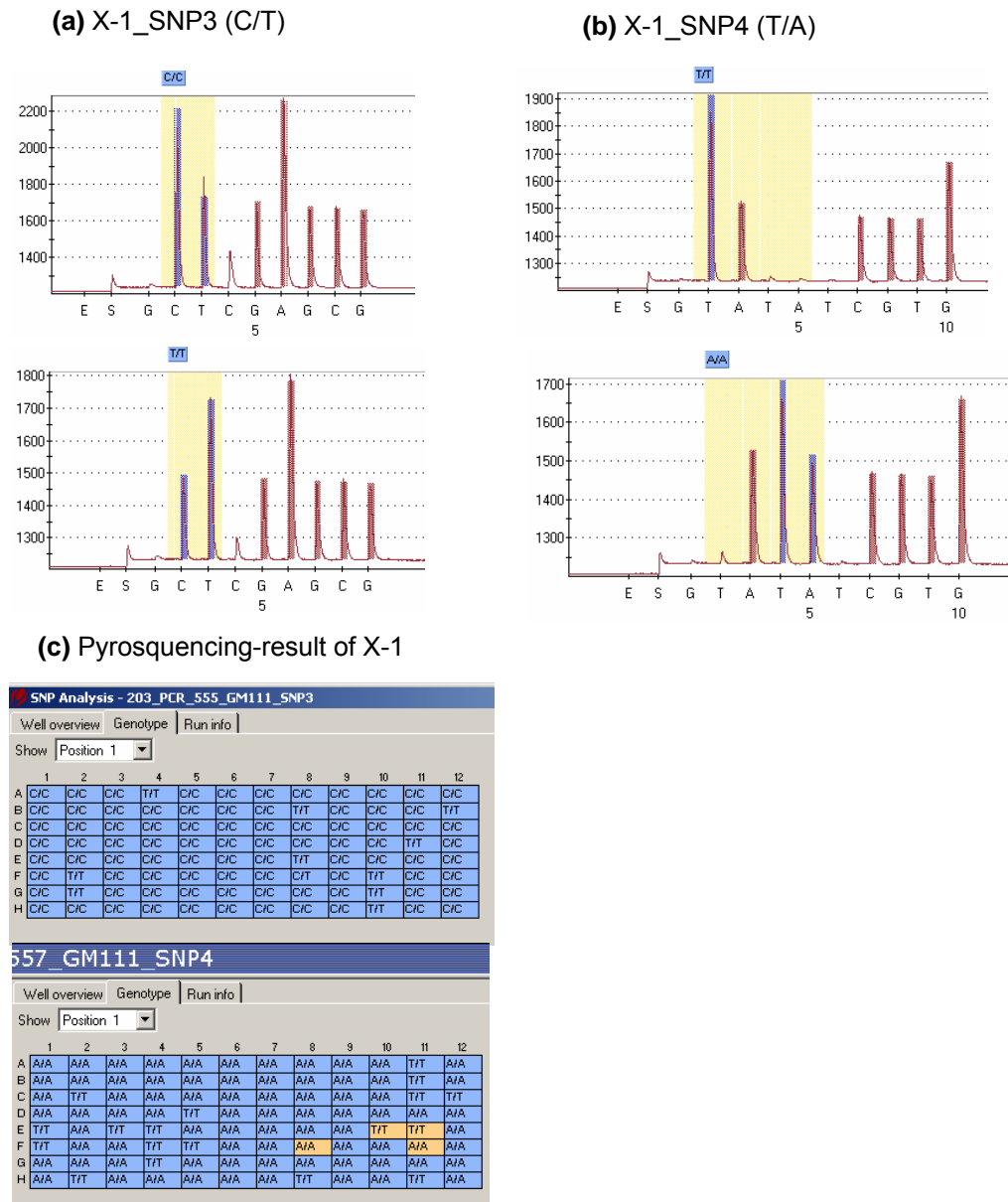


Fig. 4: Pyrogram of SNP3 **(a)** and SNP4 **(b)** of the (1→4)-β-Xylan-endohydrolase1 (X-1) gene **(c)** results of 96 cultivars by pyrosequencing with these assays. Both SNPs represent one haplotype for this gene (Matthies et al. 2009b).

After sequencing of the gene fragments, all informations about presence, size and localization of INDELS in candidate genes were transferred to our project partner SURL, who developed suitable assays by capillary sequencing and screened a large scale of genotypes (see final report from SURL).

B. Population structure

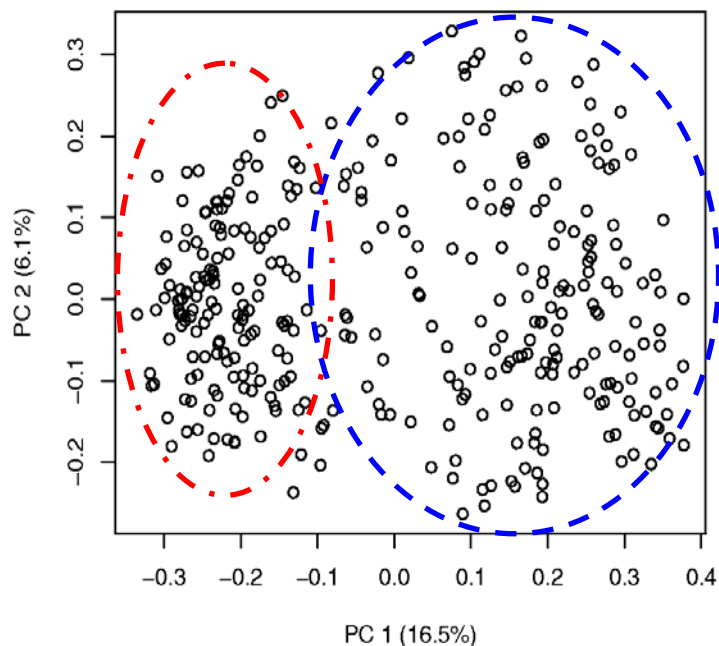
A total of 24 barley microsatellites evenly distributed over the whole barley genome (Table 2) were used for assessment of genetic diversity of 342 cultivars including two accessions of *Hordeum spontaneum* (obtained from Klaus Pillen, subproject 2). Fragment analysis was performed according a standard protocol on automated laser fluorescence sequencers (ALFexpress, Amersham Biosciences) and evaluated by the computer program Fragment Analyzer V.1.02 (Amersham Biosciences).

Table 2: Designation of all SSR-markers and their localization in the barley genome used for determination of population structure and kinship coefficients.

1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H
Bmag_0211	Bmag_0518	Bmag_0013	Ebmac_0701	Ebmac_0684	Ebmac_0602	Ebmac_0755
Bmag_0579	Bmag_0749	Bmag_0225	GBMS_0087	GBMS_0032	GBMS_0083	GBMS_0035
Bmag_0718	GBMS_0160	Bmag_0603	HVM_40		GBMS_0125	GBMS_0111
HVM_20	GBMS_0247					GBMS_0192
	HVM_36					

The analysis of population structure was performed by using the admixture option in the STRUCTURE software (vers. 2.2; April 2007; <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>; Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003) with those 141 cultivars were sufficient phenotypic data were accessible in order to perform association studies. Five independent replicates of 100 000 Markov Chain iterations were calculated for each parameter set and after applying the criteria of Evanno *et al.* (2005) two main subgroups could be identified, consisting of one third spring and two third winter cultivars, respectively (Fig. 5).

Fig. 5: Determination of population structure as a prerequisite for association studies in a set of 141 cultivars, which are clustering mainly according to their growth habit spring and winter.



C. Linkage mapping of several candidate genes

Due to their polymorphism in mapping populations (Step toe x Morex and OWB-dom x OWB-rec) present at IPK-GGK it was possible to map 17 SNPs of six candidate genes. The localization of SNP1 of the α -Amylase 1 gene (*amy 1*) could be confirmed by our project partner LfL in Freising (subproject 3) in their segregating Alexis x Steina population (Table 3). Our developed SNP-markers derived from the (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase gene mapped close to microsatellite marker Bmag135 on the long arm of chromosome 7H also in this population (M. Herz, LfL in Freising, personal communication). This indicates that the resequenced part including the SNP marker could be assigned to *glb2*. SNP4 from the X-1-gene could be recently mapped on the long arm of 5H in the Morex x Barke population in collaboration with the group of N. Stein at IPK Gatersleben.

Table 3: Mapping of certain SNP from candidate genes and their chromosomal localization.

Candidate Gene	Primer-Combination		SNP-No.	Mapping-Population		Chr.
	Gene Fragment					
Flavone-3-Hydroxylase	F3H	GM023+178	_2	Step toe x Morex	94 DHL	2H
			_6	Step toe x Morex	94 DHL	2H
Serine-Carboxy-Peptidase	Cxp I	GM160	_3	Step toe x Morex	94 DHL	3H
			_4	Step toe x Morex	94 DHL	3H
			_6	Step toe x Morex	94 DHL	3H
			_5	Step toe x Morex	94 DHL	3H
	Cxp I	Ts/Tas	Te945	Step toe x Morex	94 DHL	3H
			Ti105	Step toe x Morex	94 DHL	3H
	Cxp I	GM159	_1	Step toe x Morex	94 DHL	3H
			_4	Step toe x Morex	94 DHL	3H
Protein-Disulfide-Isomerase	PDI	GM200	_2	Step toe x Morex	94 DHL	4H
α -Amylase 1	<i>amy 2</i>	GM125	_1	OWB-dom x OWB-rec	94 DHL	6H
			_4	OWB-dom x OWB-rec	94 DHL	6H
			_6	OWB-dom x OWB-rec	94 DHL	6H
α -Amylase 1	<i>amy 2</i>	GM125	_1	Alexis x Steina	134 DHL	6H
Catalase 1	<i>cat 1</i>	GM104	_7	Step toe x Morex	94 DHL	7H
P-Lipase D-like Protein		GM370	_1	OWB-dom x OWB-rec	94 DHL	7H
			_3	OWB-dom x OWB-rec	94 DHL	7H

D. Association studies with field data from Freising

Phenotypic data obtained from micromalting experiments performed by our partner LfL in Freising (subproject 3) were of limited use for our association studies. Due to the the mix-up of seeds we got from the LfL for extraction of genomic DNA the number of available verified varieties of the original set was reduced. Six environments were originally evaluated, but only two (Freising 2005 and 2006) could be used for preliminary studies with 34 spring cultivars due to large phenotypic variation and sample effects (Table 4). For all varieties included in the analysis the identity was confirmed with SSR markers.

Table 4: Association studies with an orthogonal set of data performed with SNP- and haplotype data of three candidate genes α -amylase 1 (*amy1*), (1→3),(1→4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase (*glb2*), (1→4)- β -endo-xylanase (X-1) from 34 spring barley cultivars. Phenotypic data from micromalting analysis from these genotypes grown in different environments were obtained from LfL in Freising. No phenotypic data were available from Freising 2004. RP = raw protein, Gl = glassiness, DP = diastatic power

Candidate gene		2004		2005		2006		across five environments
		Wohlde	Freising	Wohlde	Freising	Wohlde		
<i>amy1</i>	Haplotype	—	—	—	—	—	—	—
	SNP	n.s.	n.s.	RP *SNP2	n.s.	Gl *SNP3	n.s.	n.s.
<i>glb2</i>	Haplotype	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	SNP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
X-1	Haplotype	n.s.	n.s.	DP *H2, **H3	n.s.	n.s.	n.s.	DP *H2, *H3; pH *H1
	SNP	n.s.	n.s.	DP *SNP3, **SNP4	n.s.	n.s.	n.s.	DK **SNP4

n.s. = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

E. Association studies with phenotypic data from 'Metabrew'

Phenotypic data were obtained from our “Metabrew-Database” which was not part of the project, but was developed to get a broader range of malting and brewing quality data and to avoid effects of sample sizes.

Sufficient phenotypic data were available for 141 cultivars from public sources such as ‘Bundessortenamt’, ‘Landessortenversuche’ and ‘Braugerstenjahrbücher’, collected from 1985 to 2005 and handled in a database called “MetaBrew”. For association studies, following malting quality parameters were considered:

Raw protein in malt [%], Brabender [HE], diastatic power [WK], soluble protein [%], final attenuation [%], malt extract [%], fermentable extract [%], colour [EBC], friability [%], viscosity [mPas], saccharification VZ45 [%], glassiness [%], soluble N [mg 100g⁻¹ DM], malting quality index (MQI). Each trait was covered by 2 to 103 entries per variety. Outliers deviating more than 20 % from the average mean were removed and associations assuming the General Linear Model (GLM) (Searle 1987) were performed with average values of all available phenotypic data and all marker and haplotype data using the software package “TASSEL” (<http://www.maizegenetics.net/bioinformatics/tassel/current/tassel.jnlp>) from Buckler et al. (2007).

Using the Mixed Linear Model (MLM) with taking kinship coefficients and population structure into account, similar results were obtained as performed with the GLM due to the high degree of kinship between all varieties used in this study.

E.1. Associations with the candidate gene for α -amylase *amy1* (Matthies et al. 2009a)

The intervarietal diversity of the α -amylase gene *amy1* mapping to chromosome 6H was investigated. A total of six SNPs were detected which defined four haplotypes. Associations were carried out firstly by considering each individual SNP, and secondly by combining all six SNPs in haplotypes either with the whole set of 117 barley cultivars or four subsets of 45 2-rowed spring cultivars or 72 winter cultivars, and 36 2-rowed or 36 6-rowed winter cultivars. All associations were tested with and without regard of population structure.

In general, the haplotype *amy1_H2* and SNP3 showed many significant relationships to a number of traits (malt extract, friability, soluble protein, soluble N (nitrogen), saccharification VZ45, viscosity, pH, MQI). Only few significant associations were detected in the subset of 45 two-rowed spring barley cultivars, where haplotype *amy1_H2* occurs in very low frequency.

Due to the presence of population structure, which is reflecting mainly the two subsets spring and winter barley, approximately 50 % of the variation in the total set of 117 cultivars and 20 to 30 % of the variation in the 72 winter cultivars can be explained by this effect for most of the traits. Approximately 40 % of the variation for MQI is explained by haplotype *amy1_H2* and SNP3, but the phenotypic variation explained by the genotype decreased to 19 % when population structure was considered for the total set of varieties and to 35 % when population structure was considered in the winter varieties only.

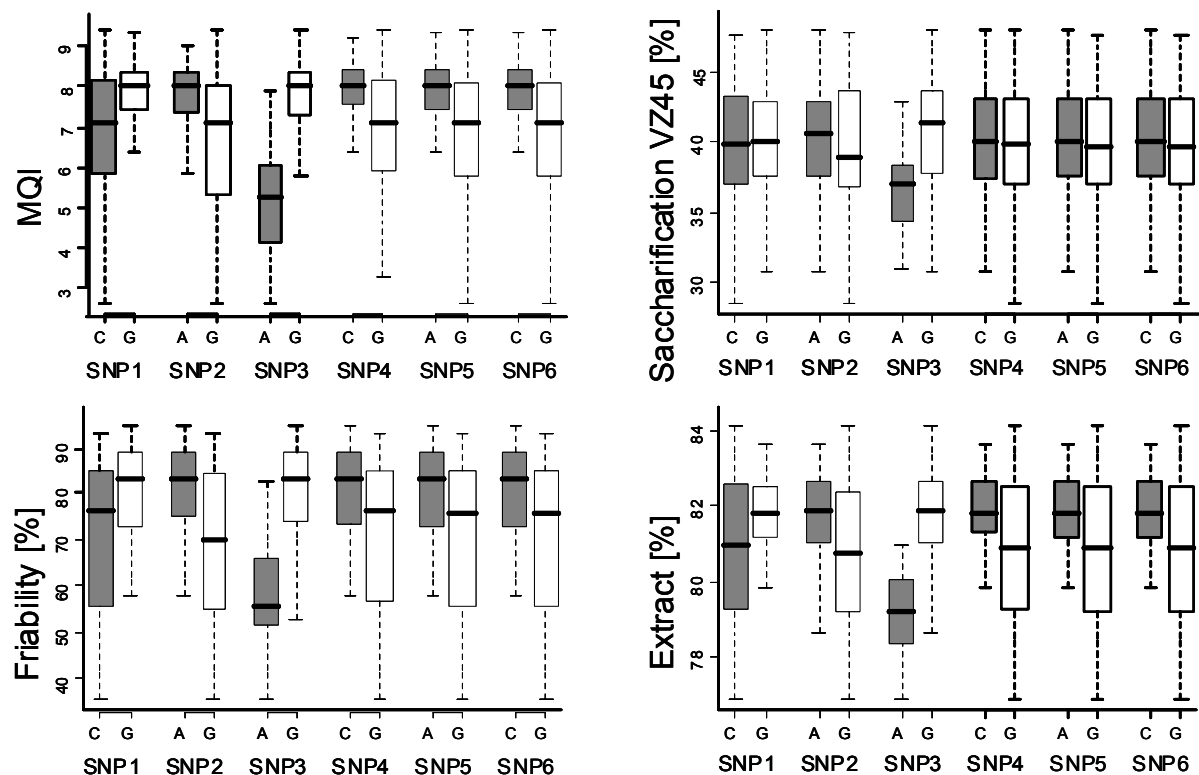


Fig. 6: Phenotypic distribution of (a) the malting quality index (MQI), (b) saccharification VZ45 [%], (c) friability [%] and (d) extract [%] within 117 cultivars in relation to the six SNPs of *amy1* and their alleles. \perp = minimum, \top = maximum values, boxes are 0.25 to 0.75 quartiles including — = median

A high MQI which represents the sum of four weighted malting components (saccharification VZ45, friability, extract, final attenuation) is desired. The presence of nucleotide G in SNP3

resulted in a significant increase of MQI, as well as saccharification VZ45, friability and extract compared to the presence of nucleotide A at SNP 3 (Fig. 6). Therefore, SNP3 with the favourable allele G can serve as a diagnostic marker for those traits. It occurs predominantly in two-rowed spring, but also in two- and six-rowed winter barleys (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/alpha-amylase>).

Malt extract is one of the most important properties for assessing brewing quality and describes the percentage of soluble ingredients, mostly starch and protein, in the wort. Only 7 % and 8 % of the variation in all cultivars was explained by *amy1_H2* and SNP3, respectively, with regard of population structure. But *amy1_H2* and SNP3 explained 28 % and 29 % of the phenotypic variation in the subset of 72 winter cultivars while 30 % (31 %) can be ascribed to population structure.

E.2. Association mapping and marker development of the candidate genes (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucanohydrolase and (1→4)-β-Xylan-endohydrolase 1 (Matthies et al. 2009b)

Cell wall degradation is a crucial process within the malting process of barley. Therefore the haplotype diversity of genes for two cell wall degrading enzymes, (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucanohydrolase and (1→4)-β-Xylan-endohydrolase 1, was investigated and associations to malting quality parameters were performed.

The (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucanohydrolase gene *glb2* had two major haplotypes defined by three SNPs and one INDEL, which explained 8.9 % and 9.5 % of the total variation of malt extract content and viscosity in the spring barley gene pool, respectively. Malt extract is one of the most important properties for assessing brewing quality and describes the percentage of soluble ingredients, mostly starch and protein, in the wort. By comparing the average values for malt extract among the spring barleys a decrease of 1.2 % (from 82.7 to 81.7) from haplotype *glb_H1* towards *glb_H2* was observed, which is also reflected by each of the four markers (Fig. 7). Malt extract content [%] and viscosity [mPas] were significant at $p < 0.05$ with F-values of 5.27 and 4.96. All other traits regarded here were not significant.

The most significant associations of (1→4)-β-Xylan-endohydrolase 1 gene X-1 were found for diastatic power, saccharification VZ45 and soluble nitrogen with 18 %, 12 % and 8 % of the total variation explained by SNP3 in the spring barleys.

In the spring subpopulation, the presence of nucleotide G in SNP3 resulted in a significant increase of diastatic power (DP), as well as saccharification VZ45 compared to the presence of nucleotide A at SNP 3 (Fig. 8 and Fig. 9). For the trait soluble nitrogen, the allele A of SNP3 could be shown to be the favourable one leading to diminished nitrogen content. A high content of soluble nitrogen is not wanted due to haze formation in the beer, while a high saccharification number VZ45 and high diastatic power are desired.

It can be concluded, that the haplotype X-2_H2 is mostly determined by SNP3. Therefore, SNP3 with the favourable allele G can serve as a diagnostic marker for those traits. It occurs predominantly in the two-rowed spring barleys.

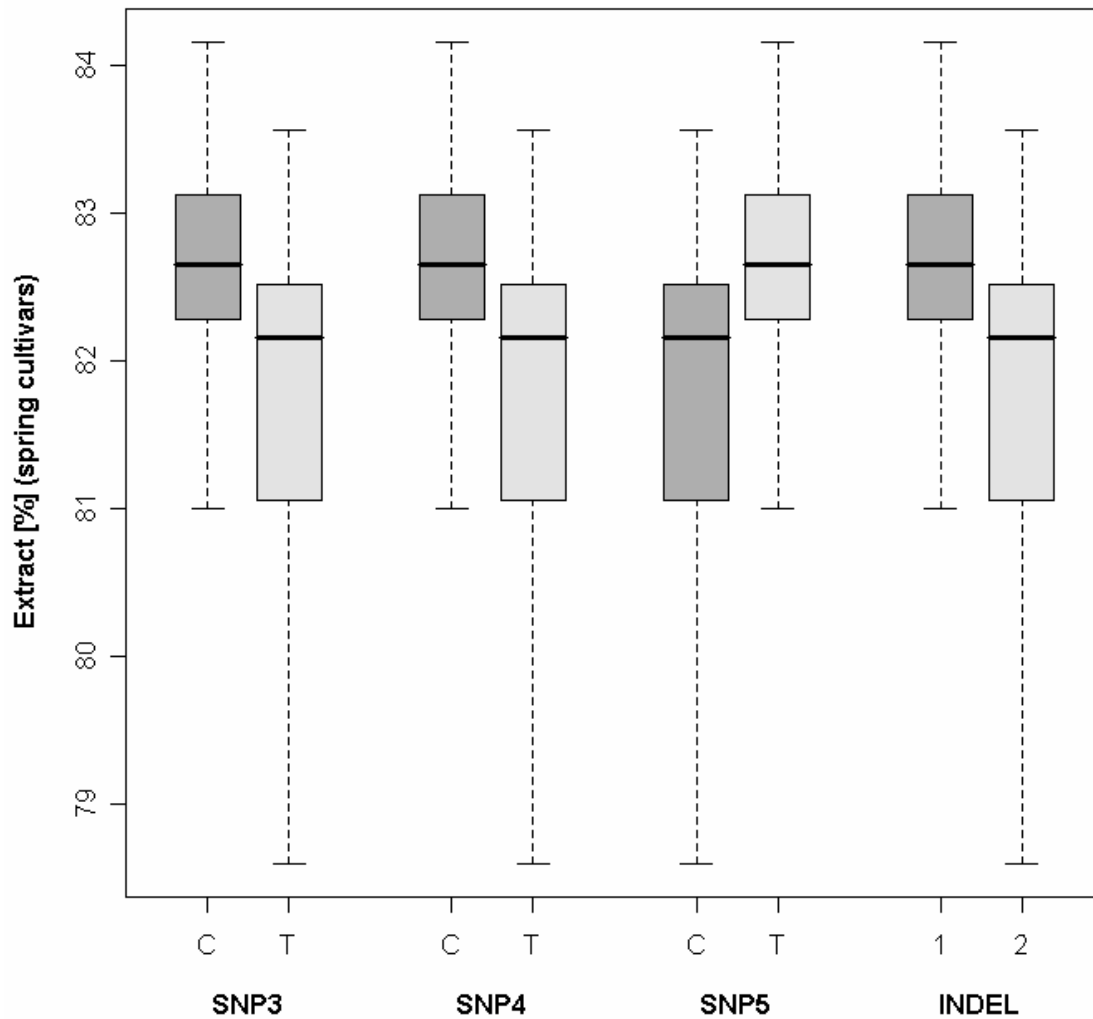


Fig. 7: Performance of malt extract content [%] related to each allele of the three SNPs and one INDEL marker of the (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucohydrolase (*glb2* gene) found in 41 two-rowed spring cultivars. \perp = minimum, \top = maximum values, boxes are 0.25 to 0.75 quartiles including — = median

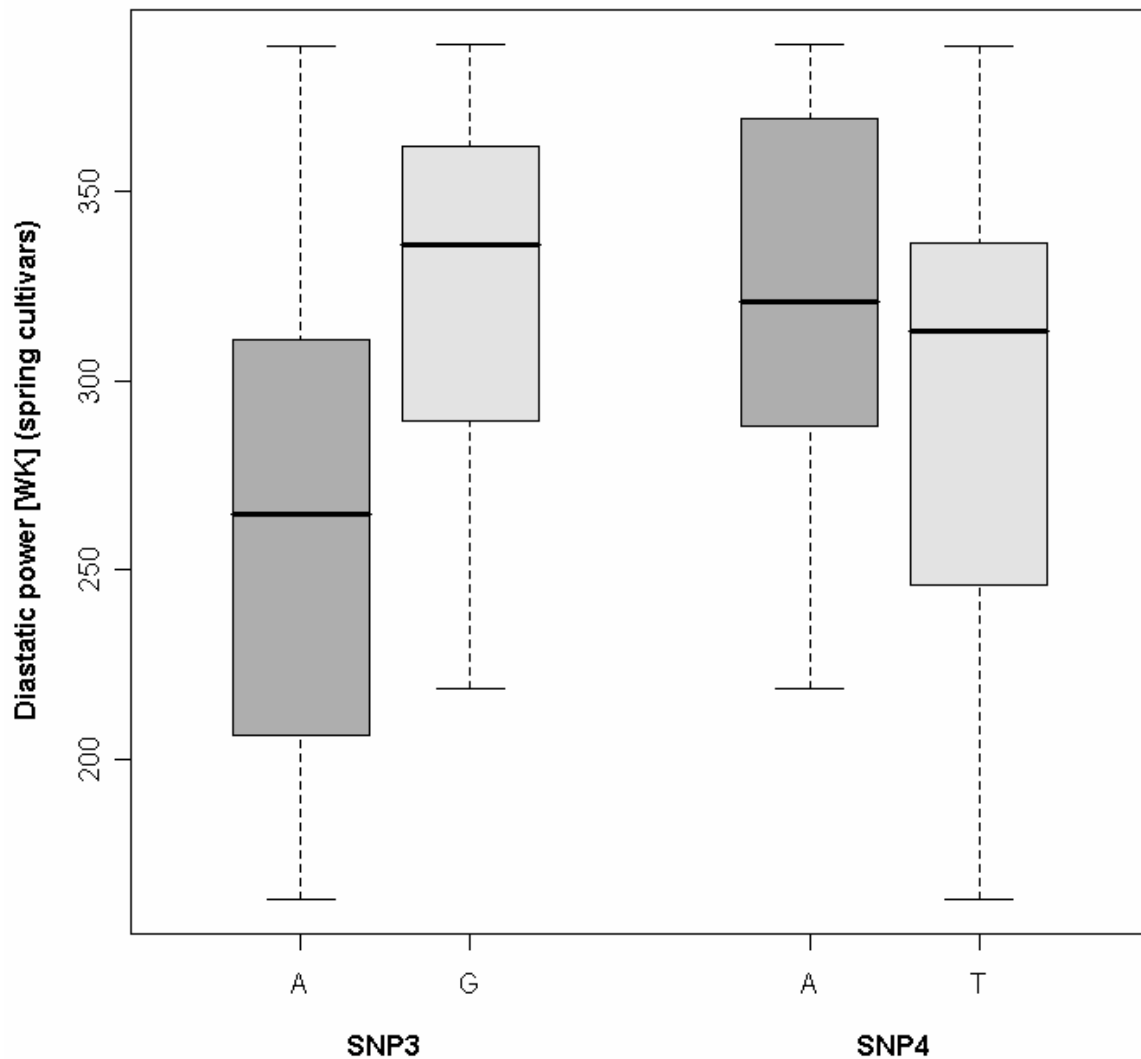


Fig. 8 Performance of the malting parameter diastatic power [WK] assigned to the alleles of both SNP markers found in the (1→4)-β-Xylan-endohydrolase 1 (X-1 gene) found in 60 two-rowed spring cultivars. ⊥ = minimum, ⊤ = maximum values, boxes are 0.25 to 0.75 quartiles including — = median

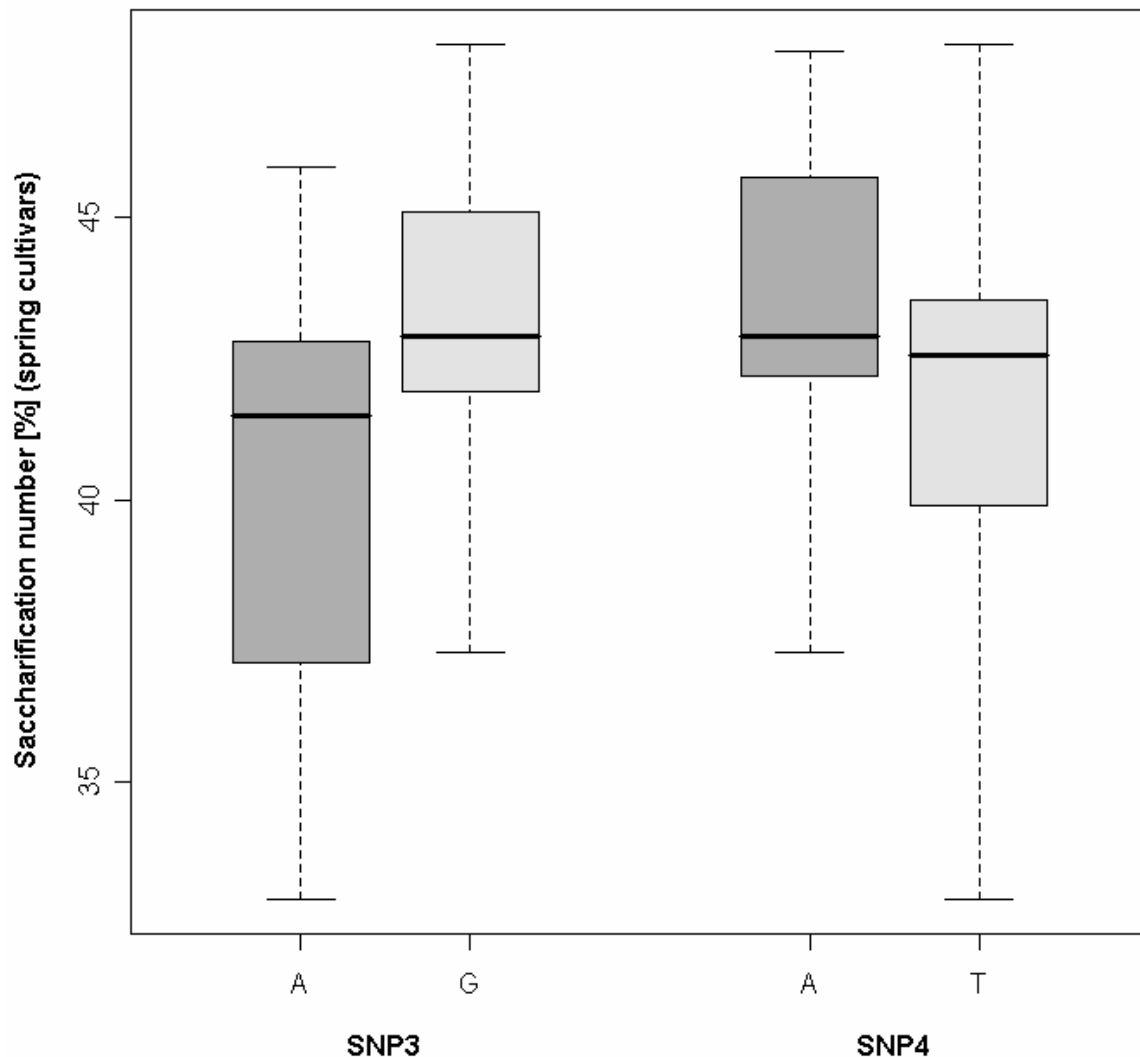


Fig. 9 Performance of the malting parameter saccharification number VZ45 [%] assigned to alleles of both SNP markers found in the (1→4)-β-Xylan-endohydrolase 1 (X-1 gene) found in 60 two-rowed spring cultivars. \perp = minimum, \top = maximum values, boxes are 0.25 to 0.75 quartiles including — = median

E.3. Association studies with further candidate genes

For all other candidate genes where high-throughput markers were obtained (Table 1), associations with phenotypic data available from the 'Metabrew' database were calculated. These studies were carried out firstly by considering the individual SNP and INDEL, or by combining all marker data in haplotypes for each gene. This was done with the whole set of 141 barley cultivars taking population structure into account while the subpopulations of 60 two-rowed spring cultivars and 81 two- and six-rowed winter cultivars were tested without regard of population structure. Depending on the availability of genotypic and phenotypic data there are some small variations in the numbers of varieties in the subpools.

ABA7 - induced protein:

All 121 varieties with regard of population structure as well as in the subset of 74 winter barleys the traits yield, saccharification VZ45, percent malt extract, friability and malt quality index (MQI) were significant at $p < 0.5$ for SNP4. Most significant were MQI and malt extract explaining 38.7 % and 19 % of the phenotypic variation within the winter barleys, respectively.

Catalase 1:

Within the subpool of 60 spring barleys SNP7 was significant for the traits kernel hectoliter weight, kernel raw protein, yield, final attenuation limit, malt quality index (MQI), malt extract and viscosity with $p < 0.5$. SNP8 was significant for kernel hectoliter weight, final attenuation limit, malt quality index (MQI) and viscosity. Regarding the haplotypes, haplotype 1 explained 25 % of kernel weight, 25 % of kernel yield, 21 % of MQI, 32 % of malt extract and 9 % of viscosity. Haplotype 2 explained 21 % of final attenuation limit, while haplotype 1 explained 13 % of this trait.

Cysteine proteinase:

The INDEL marker was highly significant with $p < 0.001$ for malt extract, friability and MQI in a subset of 76 winter barleys as well as in a total of 122 varieties with regard of population structure. This marker explained 32 % of the phenotypic variation for these traits in the winter subpopulation. Furthermore 18 % for Brabender and 20 % for viscosity could be accounted by this marker.

Phospholipase-D-like protein:

Within a subset of 60 spring barleys haplotype 3 was significant with $p < 0.001$ malt extract, colour, and MQI and explained 27 %, 23 % and 26 % of these traits respectively. Highly significant associations ($p < 0.001$) were detected for SNP1 and SNP3 each between final attenuation limit malt extract, friability and MQI. Both markers are explaining up to 30 % of these traits.

Proteinase-Inhibitor (*bci7* gene):

No significant associations at $p < 0.01$ were found.

Serpin:

Only associations of moderate significance ($p < 0.01$) were detected in the winter barley gene pool for some kernel quality traits and malt extract and soluble nitrogen. Approx. 15 % of the phenotypic variation was explained by SNP1 for both traits.

Dehydroascorbate-reductase:

The malting quality parameter final attenuation limit was significant with $p < 0.005$ in all varieties with regard of population structure as well as in the subset of 79 winter barleys. The INDEL marker explained approx. 30 % of the phenotypic variation.

Chalcone-Synthase:

The most significant association ($p < 0.001$) was found for friability where SNP1 explained 8.8 % of phenotypic variation found in 126 varieties with regard of population structure.

Starch-Synthase:

An INDEL marker was significant with $p < 0.001$ for several kernel quality parameters and the malting related traits MQI, viscosity and saccharification VZ45 explaining 13 %, 15 %

and 8 % respectively. Significant associations were found in 126 varieties with regard of population structure.

Serine Carboxypeptidase I:

In total, 11 SNPs deriving from three overlapping gene fragments amplified by PCR and resulting in 10 haplotypes were detected and could be converted into high-throughput markers. The most significant associations ($p < 0.001$) were found for haplotype 2 explaining 15 % of the phenotypic variation for Brabender, 8 % for friability and 22 % for glassiness, respectively. A highly significant association ($p < 10^{-11}$) was detected for haplotype 5 which explains 28 % for viscosity. All associations were performed in a set of 140 varieties consisting of 60 spring and 80 winter types with regard of population structure. Significant associations for haplotype 2 were also found in the subpool of 38 spring varieties by explaining of the phenotypic variation 57 % for Brabender, 46 % for friability, 67 % for glassiness and 77 % for viscosity. Haplotype 2 was not found to be significant in the winter barleys, but haplotype 5, which explained 64 % for the trait viscosity.

Protein-disulfide-isomerase:

In all varieties considering population structure haplotype 1 was the most significant ($p < 0.001$) for Brabender, friability and glassiness explaining 16 %, 8 % and 22 % of the phenotypic variation, respectively. These significant associations were also found in the subpool of 60 spring barleys explaining 42 %, 39 % and 58 % of the phenotypic variation. Additionally in the spring barleys 20 % of malt extract and 73 % of viscosity could be explained by this haplotype.

Endo- β -glucanase (*Cel I*):

In the subpool of 78 winter barleys an INDEL marker was found significant ($p < 0.001$) for several kernel quality traits as well as for the malting parameters malt extract and malt quality index (MQI) explaining 30 % and 41 %, respectively.

Lipoxygenases (LOX A, LOX B, LOX C):

No significant ($p < 0.01$) associations were found for LOX A and LOX B. In case of LOX C, a significant association was detected at $p < 0.001$ for final attenuation limit explaining 14 % of phenotypic variation in all varieties.

References:

Beló A, Zheng P, Luck S, Shen B, Meyer DJ, Li B, Tingey S, Rafalski A (2008) Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. *Mol Genet Genomics* 279:1-10

Buckler ES, Bradbury P, Kroon D (2007) TASSEL: Trait Association, Evolution, and Linkage Analysis software package. Buckler Lab for Maize Genetics and Diversity. Vers. 2.0.1 [<http://www.maizegenetics.net>]

Caldwell KS, Russell J, Langridge P, Powell W (2006) Extreme population-dependent linkage disequilibrium detected in an inbreeding plant species, *Hordeum vulgare*. *Genetics* 172:557-567

- Cockram J, White J, Leigh FJ, Lea VJ, Chiapparino E, Laurie DA, Mackay IJ, Powell W, O'Sullivan DM (2008) Association mapping of partitioning loci in barley. *BMC Genetics* 9:16 doi:10.1186/147-2156-9-16
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164:1567-1587
- Fox GP, Panozzo JF, Li CD, Lance RCM, Inkerman PA, Henry RJ (2003) Molecular basis of barley quality. *Australian J Agric Res* 54:1081–1101
- Han F, Romagosa I, Ullrich SE, Jones BL, Hayes PM, Wesenberg DM (1997) Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Mol Breed* 3:427-437
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Kandianis CB, Sowinski SG, Stapleton AE, Vallabhaneni R, Williams M, Wurtzel ET, Yan J, Buckler ES (2008) Natural genetic variation in *Lycopene epsilon cyclase* tapped for maize biofortification. *Science* 319:330-333
- Haseneyer G, Ravel C, Dardevet M, Balfourier F, Sourdille P, Charmet G, Brunel D, Sauer S, Geiger HH, Graner A, Stracke S (2008) High level of conservation between genes coding for the GAMYB transcription factor in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) collections. *Theor Appl Genet* 117:321-331
- Hayes PM, Liu BH, Knapp SJ, Chen F, Jones B, Blake T, Franckowiak J, Rasmusson D, Sorrells M, Ulrich SE, Wesenberg D, Kleinbofs A (1993) Quantitative trait locus effects and environmental inetraction in a sample of North American barley germplasm. *Theor Appl Genet* 87:392-401
- Hayes PM, Castro A, Marquez-Cedillo L, Corey A, Henson C, Jones BL, Kling J, Mather D, Matus I, Rossi C, Sato K (2003) Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In: R von Bothmer, Th van Hintum, H Knüpfper, Sato K (eds), *Diversity in barley (Hordeum vulgare)*, pp. 201-226. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Knüpfper H, van Hintum TJL (1995) The barley core collection: an international effort. in: *Core Collections of Plant genetic Resources* (eds. Hodkin T, Brown AHD, van Hintum TJL, Morales EAV), pp. 171-178
- Kraakman ATW, Niks RE, Van der Berg PM, Stam P, Van Eeuwijk FA (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168:435-46
- Kraakman ATW, Martinez F, Mussiraliev B, van Eeuwijk FA, Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol Breed* 17:41-58
- Li JZ, Sjakste TG, Röder MS, Ganai MW (2003) Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. *Theor Appl Genet* 107:1021-1027

Malysheva-Otto LV, Ganal MW, Röder MS (2006) Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in worldwide cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). BMC Genetics 7:6

Malysheva-Otto L, Röder MS (2006) Haplotype diversity in the endosperm specific β -amylase gene *Bmy1* of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). Mol Breed 18:143-156

Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Jones BL, Kleinhofs A, Legge WG, Rosnagel BG, Sato K, Ullric E, Wesenberg DM (2000) QTL analysis of malting quality in barley based on doubled-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm pools. Theor Appl Genet 101:173-184

Matthies IE, Weise S, Röder MS (2009a) Association of haplotype diversity in the α -amylase gene *amy1* with malting quality parameters in barley. Mol Breed 23: 139-152

Matthies IE, Weise S, Förster J, Röder MS (2009b) Association mapping and marker development of the candidate genes (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase and (1 \rightarrow 4)- β -Xylan-endohydrolase 1 for malting quality in barley. Euphytica DOI 10.1007/s10681-009-9915-6

Potokina E, Caspers M, Prasad M, Kota R, Zhang H, Sreenivasulu N, Wang M, Graner A (2004) Functional association between malting quality trait components and cDNA array based expression patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.). Mol Breed 14: 153-170

Potokina E, Prasad M, Malysheva L, Röder MS, Graner A (2006) Expression genetics and haplotype analysis reveal *cis* regulation of serine carboxypeptidase I (*Cxp1*) a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). Funct & Integr Genomics 6: 25-35

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945-959

Ramsay L, Macaulay M, Ivanissevich SD, Maclean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganal MW, Powell W, Waugh R (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics 156:1997-2005

Röder MS, Wendehake K, Korzun V, Bredemeijer G, Laborie D, Bertrand L, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Cooke RJ, Vosman B, Ganal MW (2002) Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. Theor Appl Genet 106:67-73

Rostoks N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR, Roose ML, Svensson JT, Stein N, Varshney RK, Marshall DF, Graner A, Close TJ, Waugh R (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. Proc Nat Acad Sci USA 103:18656-18661

Searle SR (1987) Linear Models for unbalanced data. John Wiley and Sons.

Stracke S, Presterl T, Stein N, Perovic D, Ordon F, Graner A (2007) Effects of introgression and recombination on haplotype structure and linkage disequilibrium surrounding a locus containing *Bymovirus* resistance in barley. Genetics 175:805-817

Stracke S, Haseneyer G, Veyrieras JB, Geiger HH, Sauer S, Graner A, Piepho HP (2008) Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of flowering time in barley. *Theor Appl Genet*. DOI 10.1007/s00122-008-0896-y

Swanston JS, Ellis RP (2002) Genetics and Breeding of Malt Quality Attributes. In: *Barley Science – Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Ed.: Slafer GA, Molina-Cano JL, Araus JL, Romagosa I. Food Products press, New York, London, Oxford. 85-114

Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES (2001) *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat Genet* 28:4673-4680

Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114: 1091-1103

II.2. Möglicher voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

A. Kostenneutrale Verlängerung von Teilprojekt 0313125A

Nach Bewilligung des GABI-MALT Projektes im August 2004 wurden alle Arbeiten mit einer dreimonatigen Verzögerung aufgrund von Schwierigkeiten bei der Gewinnung von geeignetem wissenschaftlichem Personal erst ab dem 15. 11. 2004 aufgenommen. Daher hat sich der Zeitplan wie im Forschungsantrag ursprünglich vorgesehen entsprechend nach hinten verschoben.

Für einen sinnvollen und erfolgreichen Projektabschluss waren insbesondere für WP 8.2.1 „Assoziation der Haplotypen mit phänotypischen Daten“ und WP 8.4.1 „Analyse der Populationsstruktur“ noch umfangreiche Berechnungen notwendig. Beide WP konnten nicht vor Abschluss aller praktischen Arbeiten zur Genotypisierung und Phänotypisierung und einer daraus resultierenden guten und auch statistisch abgesicherten Ausgangsdatenlage begonnen werden. Um diese zu erzielen, wurden zusätzlich Daten aus externen Quellen bezüglich der Malzqualität (mehrjährige Landessortenversuche an verschiedenen Orten sowie Jahrbücher der deutschen Brauerstengemeinschaft) aufbereitet.

Dadurch konnten die mitunter hohen Umwelteffekte weitgehend minimiert werden, was sich bei der Qualität der Ergebnisse der künftigen Assoziationsstudien positiv auswirkte. Zusätzlich wurden spezielle Datenbanken zur Verwaltung der im Projekt in großem Umfang anfallenden phänotypischen und Markerdaten zur effizienteren Durchführung von Assoziationsstudien (vergleiche Zwischenberichte) entwickelt.

B. Identifikation und richtige Zuordnung der 56 Sorten im GABI MALT Set

Hinsichtlich der Markerentwicklung und Haplotypenanalyse wurde ein Großteil der Sorten und Stämme aus verschiedenen Herkunftsorten zur Vermeidung von Stichprobeneffekten und zur Sicherstellung der Sortenidentität untersucht, sowie um mögliche Verwechslungen auszuschließen. Unerfreulichweise mussten wir im TP4 aufgrund der Genotypisierungsergebnisse vermehrt feststellen, dass diesbezüglich Unstimmigkeiten bestanden, die durch Lieferung von Saatgut mit falschen Sortenbezeichnungen schon bei Projektbeginn bedingt waren. Die eindeutige Aufklärung und nachträgliche Zuordnung bedeutete zum Projektende einen unerwartet hohen Mehraufwand an Zeit und Arbeit. Hierzu

waren zusätzlich noch umfangreiche Laboranalysen notwendig, die ursprünglich nicht geplant waren. Durch Überprüfung der 64 Sorten mit SSR-Markern (Material aus Freising) in enger Zusammenarbeit mit der LfL in Freising konnte die Vertauschung aufgeklärt werden (vergl. dazu auch den Abschlussbericht von TP3 der LfL Freising). Trotz dieser für uns gravierenden Problematik wurden gute und aussagekräftige Ergebnisse in TP4 erzielt.

Insgesamt wurden alle Meilensteine erfolgreich eingehalten und der dreijährigen Projektlaufzeit erfüllt (Tab. 5). Die Arbeiten zu Meilenstein 3 erfolgten in enger Zusammenarbeit mit der SURL.

Tabelle 5: Meilensteine im Teilprojekt 4.

Meilenstein	Aufgabe	Arbeitspaket	Projektmonat
1	Allel-spezifische Sequenzierung von Kandidatengen	8.1.1	1-20
2	Entwicklung von SNP-Markern und Assoziation mit phänotypischen Daten	8.1.2, 8.1.3, 8.2.1	12-24
3	SNP-fingerprinting von 1000 Genotypen	8.2.2, 8.3.1	14-36
4	Identifikation nützlicher Allele und Analyse der Populationsstruktur	8.4.1	28-36

C. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Sämtliche im TP4 durchgeführten Arbeiten waren einerseits zur Erreichung der gesetzten Projektziele sowie andererseits auch für den im gesamten Projekt vorgesehenen Daten- und Materialaustausch notwendig. Dabei stellten die Sequenzierung von Kandidatengen, die Detektion von SNPs und INDELs sowie deren Konvertierung zu Hochdurchsatz-Markern für die anschließende Genotypisierung einer Vielzahl von Sorten und Zuchtstämme besondere Schwerpunkte in diesem Teilprojekt dar. Von den Sequenzinformationen und den vielen entwickelten Markern profitierten insbesondere TP2 und die beteiligten Züchterhäuser. Für letztere stellt diese Ressource eine wertvolle Basis für die künftige Sortenentwicklung mittels Markergestützter Selektion = MAS dar. Auch die relevanten Ergebnisse aus den Assoziationsstudien sind sowohl nicht nur für die züchterische Praxis, sondern auch für die Malz- und Brauindustrie interessant und repräsentieren außerdem einen wertvollen Beitrag zur aktuellen Forschung auf diesem Gebiet.

D. Verwertbarkeit der erzielten Ergebnisse

Alle im TP4 entwickelten Marker-Assays werden am IPK das bereits vorhandene umfangreiche Angebot an molekularen Markern für die Gerste erweitern. Somit stehen erstmals spezifische Marker für Kandidatengene mit signifikantem Bezug zur Malzqualität zur Verfügung. Diese werden weiterhin in eigenen Forschungsarbeiten sowie in Züchtungsprogrammen auch genutzt (z.B. in GABI GENOBAR oder von der KWS-Lochow GmbH, SU Biotec (vormals SURL)). Es besteht ein großes allgemeines Interesse bezüglich der wirtschaftlichen Verwendbarkeit dieser Marker, da die Züchter sich dadurch einen eindeutigen Wettbewerbsvorteil versprechen. Einige der hier entwickelten Marker wurden auch von den anderen Teilprojekten (z.B. zur Lokalisation von QTLs in TP2 und TP3) für

ihre Forschungsarbeiten genutzt. Alle Ergebnisse aus den Assoziationsstudien der Kandidatengene dienen als Selektionshilfe für züchterisch bedeutsame Malzqualitätsparameter mittels funktionaler Marker.

Während des Projektes ergab sich keine Änderung des ursprünglichen Verwertungsplanes. Es wurden keine Erfindungen oder Schutzrechte innerhalb des Projektes erzielt.

II. 3. Fortschritte bei anderen Forschungsprojekten auf dem Gebiet

Das Thema Assoziationskartierung gewinnt aufgrund des zunehmenden Interesse auch seitens der praktischen Pflanzenzüchtung eine größere Bedeutung in der Pflanzengenomforschung. Die Entwicklung von funktionalen Markern wie SNPs mittels des Kandidatengenansatzes sowie deren Anwendbarkeit mittels moderner Hochdurchsatzverfahren verspricht einige Vorteile gegenüber den herkömmlichen Methoden (Rafalski 2002). So kann z.B. die gesamte vorhandene genetische Diversität in Populationen oder Sorten vollständig genutzt werden im Gegensatz zu spaltenden Kartierungsnachkommenschaften.

Erste Assoziationsstudien wurden in menschlichen Populationen durchgeführt (Risch 2000). Mais und *A. thaliana* gehörten zu den ersten untersuchten Pflanzenarten (Remington *et al.* 2001, Thornsberry *et al.* 2001, Nordborg *et al.* 2005, and Kim *et al.* 2006). Auch für andere Kulturpflanzen wird die Assoziationsgenetik und deren Methodik immer mehr zu einem wichtigen Forschungsthema wie z.B. Baumwolle (Kantartzi and Stewart 2008), Kartoffel (Li *et al.* 2008; D'hoop *et al.* 2008), Sojabohne (Hyten *et al.* 2007; Choi *et al.* 2007), und Reis (Caicedo *et al.* 2007; Mather *et al.* 2007).

Mit Beginn des Projektes im Jahre 2004 existierten keine Veröffentlichungen diesbezüglich für Gerste. Auch dieses hat sich in den letzten Jahren schlagartig geändert was auf die hohe Aktualität dieser Thematik hinweist (Malysheva-Otto and Röder 2006; Rostoks *et al.* 2006; Kraakman *et al.* 2004 und 2006; Haseneyer *et al.* 2008, Cockram *et al.* 2008; Stracke *et al.* 2009; Matthies *et al.* 2009a und b).

Zitierte Literatur

Caicedo AL, Williamson SH, Hernandez RD, Boyko A, Fledel-Alon, York TL, Polato NR, Olsen KM, Nielsen R, McCouch S, Bustamente CD, Purugganan MD (2007) Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS Genet* 3:e163.

Choi I-Y, Hyten DL, Matukumalli LK, Song QJ, Chaky JM, Quigley CV, Chase K, Lark KG, Reiter RS, Yoon M-S, Hwang E-Y, Yi S-I, Young ND, Shoemaker RC, van Tassell CP, Specht JE, Cregan PB (2007) A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single nucleotide polymorphism analysis. *Genetics* 176:685–696.

Cockram J, White J, Leigh FJ, Lea VJ, Chiapparino E, Laurie DA, Mackay IJ, Powell W, O'Sullivan DM (2008) Association mapping of partitioning loci in barley. *BMC Genetics* 9:16.

D'hoop BB, Paulo MJ, Mank RA, van Eck HJ, van Eeuwijk F (2008) Association mapping of quality traits in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica* 161:47–60.

Haseneyer G, Ravel C, Dardevet M, Balfourier F, Sourdille P, Charmet G, Brunel D, Sauer S, Geiger HH, Graner A, Stracke S (2008) High level of conservation between genes coding for the GAMYB transcription factor in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) collections. *Theor Appl Genet* 117:321–331.

- Hyten DL, Choi IY, Song Q, Shoemaker RC, Nelson RL, Costa JM, Specht JE, Cregan PB (2007) Highly variable patterns of linkage disequilibrium in multiple soybean populations. *Genetics* 175:1937–1944.
- Kantartzi SK, Stewart JMD (2008) Association analysis of fibre traits in *Gossypium arboreum* accessions. *Plant Breed* 127:173–179.
- Kim S, Zhao K, Jiang R, Molitor J, Borevitz JO, Nordborg M, Marjoram P (2006) Association mapping with single feature polymorphisms. *Genetics* 173:1125–1133.
- Kraakman ATW, Niks RE, Van der Berg PM, Stam P, Van Eeuwijk FA (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168:435–446.
- Kraakman ATW, Martinez F, Mussiraliev B, van Eeuwijk FA, Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Mol Breed* 17:41–58.
- Li L, Paulo MJ, Strahwald J, Lübeck J, Hofferbert HR, Tacke E, Junghans, Wunder J, Draffehn A, van Eeuwijk F, Gebhardt C (2008) Natural variation at candidate loci is associated with potato chip color, tuber starch content, yield and starch yield. *Theor Appl Genet* 116:1167–1181.
- Malysheva-Otto L, Röder MS (2006) Haplotype diversity in the endosperm specific β -amylase gene *Bmy1* of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Breed* 18:143–156.
- Mather KA, Caicedo AL, Polato NR, Olsen KM, McCouch S, Purugganan MD (2007) The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 177:2223–2232.
- Matthies IE, Weise S, Röder MS (2009) Association of haplotype diversity in the α -amylase gene *amy1* with malting quality parameters in barley. *Mol Breed* 23(1):139–152.
- Matthies IE, Weise S, Förster J, Röder MS (2009b) Association mapping and marker development of the candidate genes (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase and (1 \rightarrow 4)- β -Xylan-endohydrolase 1 for malting quality in barley. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-009-9915-6
- Nordborg M, Hu TT, Ishino Y, Jhaveri J, Toomajian C, Zheng H, Bakker E, Calabrese P, Gladstone J, Goyal R, Jakobsson M, Kim S, Morozov Y, Padhukasahasram B, Plagnol V, Rosenberg NA, Shah C, Wall JD, Wang J, Zhao K, Kalbfleisch T, Schulz V, Kreitman M, Bergelson J (2005) The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol* 3:e196.
- Rafalski A (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5:94–100.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES 4th (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11479–11484.
- Risch NJ (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405:847–856. doi:10.1038/35015718

Rostoks N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR, Roose ML, Svensson JT, Stein N, Varshney RK, Marshall DF, Graner A, Close TJ, Waugh R (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18656–18661.

Stracke S, Haseneyer G, Veyrieras JB, Geiger HH, Sauer S, Graner A, Piepho HP (2009) Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of flowering time in barley. *Theor Appl Genet* 118(2):259–273.

Thornsberry JM, Goodman MM, Doebly J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat Genet* 28:4673–4680

II.4. Erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Publikationen:

RÖDER M, POTOKINA E, MALYSHEVA-OTTO L, MATTHIES I, GRANER A (2006) Der steinige molekulare Weg zu besserem Malz. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 69:83-85

MATTHIES IE, RÖDER MS (2006) Haplotypendiversität von Kandidatengenomen mit Einfluss auf Malzqualität in Gerste. *Vortr. Pflanzenzüchtg. Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, HBLFA Raumberg, Gumpenstein, 21. bis 23. 11. 2006 „Pflanzenzüchtung und Genomanalyse“.* P. 61-63

WEISE S, MATTHIES I, SCHOLZ U, RÖDER M (12/2006) Datenbankentwicklung für Assoziationsstudien bezüglich Malzqualität bei der Gerste, *IPK-Journal –Nr. 2*

MATTHIES IE, FOERSTER J, RÖDER MS(2007) GABI-MALT: Ein integrierter Ansatz zur Identifizierung von Kandidatengenomen für das Merkmal Brauqualität bei Gerste. Teilprojekt 4: SNP-Detektion und Haplotypen-Analyse in Kandidatengenomen für Malzqualität). *GABI-PROGRESS-REPORT 2007: 152-153*

MATTHIES IE, FOERSTER J, RÖDER MS (2007) GABI-MALT: An integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley. Subproject 4: SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes for malting. *GABI-PROGRESS-REPORT 2007: 30-32*

MATTHIES IE, RÖDER MS, FOERSTER J (2007) GABI-MALT A: Molekularbiologische Analyse von Kandidatengenomen für Malzqualität bei Gerste. *GenomXPress. Sonderausgabe 1/07: 36*

KUENNE C, GROSSE I, MATTHIES I, SCHOLZ U, SRETENOVIC-RAJICIC T, STEIN N, STEPHANIK A, STEUERNAGEL B, WEISE S (2007) Using Data Warehouse Technology in Crop Plant Bioinformatics. *J Integr Bioinformatics*, 4(1):88, 2007 <http://journal.imbio.de> doi:10.2390/biecoll-jib-2007-88

MATTHIES IE, WEISE S, RÖDER MS (2009a) Association of haplotype diversity in the α -amylase gene *amy1* with malting quality parameters in barley. *Mol Breed* 23: 139-152

MATTHIES IE, WEISE S, FÖRSTER J, RÖDER MS (2009b) Association mapping and marker development of the candidate genes (1→3),(1→4)-β-D-Glucan-4-glucanohydrolase and (1→4)-β-Xylan-endohydrolase 1 for malting quality in barley. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-009-9915-6

WEISE S, SCHOLZ U, RÖDER MS, MATTHIES IE (2009) MetaBrew: A comprehensive database of malting quality traits in brewing barley. *Barley Genetics Newsletter* 39:1-4.

KHLESTKINA EK, SALINA EA, MATTHIES IE, LEONOVA IN, BÖRNER A, RÖDER MS (2009) Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley. (*submitted to Genome*)

MATTHIES IE, WEISE S, FÖRSTER J, RÖDER MS (*in preparation for Mol Breed*) Marker development and association studies in barley for candidate genes encoding catalase1, dehydroascorbate reductase, and phospholipase D-like Protein concerning malting quality.

Vorträge:

MATTHIES IE, RÖDER MS: Haplotypendiversität von Kandidatengenen mit Einfluss auf die Malzqualität bei Gerste. Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs HBLFA Raumberg - Gumpenstein, 21. - 23. November 2006, p. 61-63.

MATTHIES I., S. WEISE, U. SCHOLZ & M. RÖDER: GABI-MALT - Association genetics for malting quality in barley. "Molecular Mapping & Marker Assisted Selection in Plants" in Vienna, Austria, February 3-6, 2008

MATTHIES I., S. WEISE, J. FÖRSTER & M. RÖDER: Marker development and association mapping for malting quality in barley. "18th EUCARPIA General Congress" in Valencia, Spain, September 9-12, 2008

Poster:

MATTHIES I, RÖDER M, GRANER A (2005) Sequence diversity in genes encoding enzymes and in differentially expressed ESTs related to malting quality in barley. – The 8th Gatersleben Research Conference "Genetic Diversity & Genome Dynamics in Plants", June 3rd to 6th, 2005, Meisdorf / Gatersleben: Programme, abstracts and list of participants, IPK, Gatersleben (2005) P52, p.115

MATTHIES I, RÖDER M, GRANER A (2005) GABI-MALT: An integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley. SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes for malting. – 4th Plant Genomics European meetings (PlantGEMs), 20th to 23th September 2005, Amsterdam. P 3-015, p141

MATTHIES I, RÖDER M, GRANER A (2005) GABI-MALT: An integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley. SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes for malting. – Institutstag IPK, Gatersleben, 13th October 2005

MATTHIES I, RÖDER M, GRANER A (2005) GABI-MALT: An integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley. SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes for malting. – Fachtagung "Wirtschaftskraft Pflanze – Zukunft durch Innovationscluster" auf der Biotechnica 19th October 2005, Hannover. P 20, p.69

MATTHIES I, RÖDER M, GRANER A (2006) GABI-MALT: An integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley - SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes for malting. 6th GABI Status Seminar, Potsdam, 21th to 22th February 2006, P19

MATTHIES I, RÖDER M, GRANER A (2006) GABI-MALT: An integrated approach to the genetic and functional dissection of malting quality in barley - SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes for malting. 8. GPZ-Vortragstagung „Pflanzenzüchtung für bessere Lebens- und Futtermittel“, Freising-Weihenstephan, 14th to 16th March 2006

MATTHIES, IE, RÖDER MS, GRANER A (2006) GABI-MALT: SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes with impact on malting quality. Plant Genetics – Joined Conference of the German Genetics Society and the German Society for Plant Breeding, Kiel, 20th to 23th September 2006, GTPB-PO-05, p.144

MATTHIES I, RÖDER M, WEISE S, SCHOLZ U (2006) SNP detection and haplotype analysis in candidate genes with impact on malting quality. First Joint Conference of The German Society for Plant Nutrition –DGP (Annual Meeting) and The Research Centre Biotechnology & Plant Breeding University of Hohenheim –FSP (21st Colloquium) “Plant nutrition meets Plant Breeding”, University of Hohenheim, Stuttgart, 26th to 28th September 2006

MATTHIES IE, GRANER A, RÖDER MS (2006) GABI-MALT: SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes with impact on malting quality. Institutstag, IPK, Gatersleben, 10th October 2006

WEISE S, MATTHIES I, RÖDER M, SCHOLZ U (2006) MetaBrew – managing and analysing data about barley malting and brewing quality. Institutstag, IPK, Gatersleben, 10th October 2006

MATTHIES IE, RÖDER MS, GRANER A (2006) GABI-MALT: SNP-detection and haplotype analysis in candidate genes with impact on malting quality. European Science Foundation Research Conference on Crop Genomics, Trait Analysis and Breeding. 8th to 11th November 2006, Hinxton, UK.

MATTHIES IE, FOERSTER J, WEISE S, SCHOLZ U, RÖDER MS (2007) GABI-MALT: SNP- and INDEL-Marker-Development for Candidate Genes associated with Malting Quality Traits. 7th GABI Status Seminar, Potsdam, 6th to 8th March 2007. P42

MATTHIES IE, WEISE S, SCHOLZ U, RÖDER MS (2007) Association genetics for malting quality in barley. Institutstag, IPK, Gatersleben, 16th October 2007

MATTHIES I, WEISE S, SCHOLZ U, RÖDER M (2008) Association genetics for malting quality in barley. 8th GABI Status Seminar, Potsdam, 04.-06.03.2008

KHLESTKINA EK, SALINA EA, MATTHIES I, TERESCHENKO O, LEONOVA IN, BÖRNER A, RÖDER MS (2008) Comparative molecular-genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in

wheat, rye and barley. XX International Congress of Genetics, Berlin, German, 12th to 17th July, 2008

WEISE S, MATTHIES I, RÖDER M, SCHOLZ U (2008) MetaBrew – managing and analysing data about barley malting and brewing quality. – 7th Plant Genomics European Meetings (PlantGEM), Albena, Bulgaria, 24th to 27th September 2008

B. STEUERNAGEL, S. WEISE, T. SCHMUTZER, M. LANGE, C. PIETSCH, I. MATTHIES, D. SCHULTE, N. STEIN & U. SCHOLZ (2008) CropHouse: Integrative Analysis of Crop Plant Data. Institutstag IPK Gatersleben, 29th to 30th September 2008, Gatersleben, Germany

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Die Kulturart Gerste wird im Rahmen der GABI-Projekte nicht nur am IPK in Gatersleben intensiv bearbeitet. Dieses aus vier Teilprojekten bestehende GABI-MALT-Projekte ist ein wichtiger Beitrag zu Erforschung der genetischen und funktionalen Hintergründe von Malzqualität bei Gerste.

In TP1 wurde ein funktionaler Ansatz gewählt, während in dem hier bearbeiteten TP4 ein struktureller Ansatz verfolgt wurde.

Es wurde besonderer Wert auf mögliche praktische Verwertbarkeit der Forschungsergebnisse gelegt. Insofern stellen die gewonnenen Informationen über die SNP- und INDEL-Häufigkeit sowie die Haplotypendiversität von den hier untersuchten Kandidatengenen und deren Einfluss auf die Malzqualität einen hohen Erkenntnisgewinn für die weitere züchterische Nutzung dar. Insbesondere die im TP4 entwickelten Hochdurchsatz-Marker können direkt von den Zuchtunternehmen als Selektionshilfe verwendet werden und es besteht ein nachgewiesenes hohes Interesse, diese auch anzuwenden. Damit bieten sie unseren beteiligten KMU grosse Wettbewerbsvorteile, was auch ein förderpolitisches Ziel ist. Die hier entwickelten Marker sind neuartig.

Auch der wissenschaftliche Erkenntnisgewinn über die Struktur der Gene und dem Einfluss von besonders günstigen Allelen für die Malzqualität ist nicht zu unterschätzen.

Durch die gute Zusammenarbeit der einzelnen Teilprojekte untereinander sowie mit den beteiligten KMU (SURL und KWS-Lochow GmbH) konnte jeder von den Ergebnissen des anderen profitieren und in die eigenen gegenwärtigen und künftigen Forschungsarbeiten integrieren.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens

Alle im TP4 angestrebten Ziele wurden erfolgreich erreicht. Es sollten ursprünglich 50 Kandidatengene ausgewählt und auf das Vorhandensein von Polymorphismen überprüft werden. Insgesamt wurden dann jedoch 62 Kandidatengene (44 in der Literatur beschrieben und 16 aus Expressionstudien eines früheren Projektes am IPK (Potokina *et al.* 2004)) für die Untersuchungen herangezogen. Von diesen wurden genomische Fragmente z.T. erstmals bei der Gerste sequenziert und die gefundene SNP und INDEL-Frequenz war recht genspezifisch. Durch Assoziation mit phänotypischen Daten konnten signifikante Zusammenhänge zwischen SNP-Allelen und einzelnen Malzparametern belegt werden. Insgesamt wurde die angestrebte Zahl von 50 Markern mit der Konvertierung von 8 INDELs und 40 SNPs aus 19 Genen für Hochdurchsatzverfahren (Kapillarelektrophorese und Pyrosequencing) erreicht. Zusätzliche 57 Marker wurden inzwischen im anschließenden GABI-Projekt (GENOBAR) aus 17 weiteren in GABI-MALT untersuchten Genen zur Genotypisierung herangezogen, insofern eigneten sich Polymorphismen aus ca. zwei Drittel aller betrachteten Gene zur Markerentwicklung. Diese wurden nach Möglichkeit auch alle kartiert, um Angaben über die genaue Lokalisation der Gene im Gerstengenom zu erhalten. Ein genauer Abgleich mit QTLs für Malzqualität (Information aus TP2 und TP3) sollte noch erfolgen. Jedoch tragen unsere etablierten SNP- und INDEL-Marker schon jetzt zur wesentlichen Effizienzsteigerung bei der Züchtung für gute Malzqualität bei.

Die in diesem Projekt gewonnenen Erfahrungen bezüglich der Etablierung effizienter Methoden und Arbeitstechniken bei der Sequenzierung, Markerentwicklung und Hochdurchsatzgenotypisierung kommen auch anderen gegenwärtigen und zukünftigen Projekten zugute.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

die vom ZE oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standort-bezogene Verwertung (Lizenzen u. a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten.

Im Rahmen dieses Projektes wurden auch für die Züchtungsindustrie genomische Primerkombinationen zur Identifizierung von Kandidatengenabschnitten sowie interessante Marker für Malzqualität in Gerste entwickelt, die nach Unterzeichnung eines Materialtransferabkommens (MTA) für diese verfügbar sind.

Außerdem wurden jeweils zwei Datenbanken neu etabliert. Eine dient der Dokumentation aller Marker- und Haplotypeninformationen und die andere zur Organisation und Verwaltung der umfangreichen phänotypischen Daten, die „Metabrew“ genannt wurde. Letztere wurde war nicht im Projekt geplant, wurde aber parallel zum Projekt entwickelt und hat maßgeblich zum Projekterfolg beigetragen. Sie wird laufend aktualisiert und im derzeitigen GABI-Projekt namens GENOBAR intensiv genutzt.

Sowohl für die Marker- und für die „Metabrew“-Datenbank wurden die Möglichkeiten für eine Patentanmeldung intensiv geprüft. Für beide wurde jeweils eine Erfindungsmeldung beim IPK Gatersleben als Dienstort eingereicht. Da beide eher im Hinblick des wissenschaftlichen Interesses genutzt werden sollen und somit wahrscheinlich nicht einen hohen finanziellen Gewinn versprechen, wurde beschlossen, zumindest die Datenbank „Metabrew“ im Internet öffentlich verfügbar zu machen (<http://metabrew.ipk-gatersleben.de>) und die Markerinformationen nach MTA an Interessierte abzugeben.

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

(mit Zeithorizont) - z. B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)

Die nunmehr öffentlich verfügbaren Informationen aus „Metabrew“ bilden eine wertvolle Orientierungshilfe bezüglich der Selektion von Ausgangsmaterial für weitere Züchtungsprogramme. Auch die in diesem TP4 etablierten Marker verhelfen den beteiligten KMU zu Wettbewerbsvorteilen. Durch die hier erfolgte Entwicklung von PCR-basierten Hochdurchsatzmethoden können diese auch sofort in der züchterischen Praxis angewendet werden.

Die Ergebnisse der Assoziationsstudien bieten ein wertvolles Kriterium bei der Planung von zukünftigen Braugerstenzuchtprogrammen. So konnte insbesondere in TP4 gezeigt werden, dass die Populationsstruktur (Sommer- oder Winterform) und mitunter die Zeiligkeit der betrachteten Gerstensorten einen Einfluss auf das Niveau der Malzqualitätsparameter hat. Zusammenfassend kann eine Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit bei kombinierter Nutzung aller Erkenntnisse aus den vier Teilprojekten bei den beteiligten KMU erwartet werden.

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

(mit Zeithorizont) - u. a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z. B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist

auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u. a. einzubeziehen

Laut des für GABI-MALT geschlossenen Kooperationsvertrages sind alle in diesem Verbundprojekt gewonnenen Ergebnisse allen beteiligten Projektpartnern aus Forschung und Industrie uneingeschränkt sowie für andere auf Anfrage bzw. gegen MTA zugänglich.

Die sich daraus ergebenden wirtschaftlichen Erfolgsaussichten können zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht genau beurteilt werden, da dieses Projekt insgesamt erst vor kurzem abgeschlossen wurde.

Das hier erworbene technologische Know-How und die gemachten Erfahrungen bei der Detektion von SNP- und INDEL-Polymorphismen und deren Konvertierung zu Hochdurchsatz-Markern wird auf jeden Fall im gegenwärtigen Folgeprojekt (GABI-GENOBAR) genutzt und ausgeweitet und steht auch für andere wissenschaftliche und industrielle Vorhaben dieser und ähnlicher Art zur Verfügung.

Die beiden Datenbanken für molekulare Marker und phänotypische Daten werden weiter genutzt und laufend aktualisiert. Beide stellen eine wertvolle Ressource für laufende und zukünftige Forschungsprojekte dar.

Die während des GABI-MALT-Verbundprojektes geknüpften Beziehungen und Netzwerke zwischen beteiligten Forschern, Züchtern, Instituten und Industrie werden auch gegenwärtig und zukünftig bei weiteren Vorhaben dieser Art genutzt. Somit wird eine optimale Weiterführung der Forschung in der Genomanalyse und der Braugerstenzüchtung sowie eine praxisnahe und wirtschaftlich anwendbare Umsetzung der Ergebnisse gewährleistet.

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Projektphase

bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der FE-Ergebnisse

Die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten werden als sehr gut bewertet. Der ZE wird weitere Forschungsprojekte auf Basis des hier berichteten Projektes beantragen.

Die in diesem Teilprojekt generierten SNP- und Markerinformationen sowie die etablierte phänotypische Datenbank „Metabrew“ bildeten eine wichtige Voraussetzung für das derzeit laufende Projekt GABI-GENOBAR, in dem Assoziationsstudien in einem noch größeren Umfang durchgeführt werden sollen. Beide stellen eine wichtige Ressource für die Entwicklung von verschiedenen statistischen Modellen dar. Außerdem ist beabsichtigt, noch mehr funktionale Marker bezüglich Malz- und Brauqualität in der Gerste zu entwickeln, da eine hohe Nachfrage seitens der Züchter besteht. Dabei können viele der in GABI-MALT gewonnenen Erfahrungen, Erkenntnisse und Ergebnisse sinnvoll weiter genutzt und entwickelt werden. Markerdaten können von den Züchtern in der praktischen Anwendung validiert werden.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Im TP4 haben alle Arbeiten zu einem Ergebnis und zu einer Lösung geführt. Allerdings gestalteten sich die Bewertung der SNP- und INDEL-Analysen von Polymorphismen aus Kandidatengenomen, die einer Genfamilie angehörten oder in mehreren Genkopien vorlagen als etwas schwierig (nicht eindeutig und wenig reproduzierbar). Insofern wurden solche Polymorphismen nicht als Marker etabliert und von den Hochdurchsatzanalysen ausgeschlossen. Es gab auch Primerkombinationen die zu keiner Amplifikation von genomischen Genfragmenten trotz Methodenoptimierung bei der PCR geführt haben. Diese wurden verworfen (ca. 45 % aller untersuchten Primer). Eine Erklärung ist die Generation der

Primersequenzen basierend auf cDNA-Informationen, wenn keine genomischen Sequenzinformationen für die Kandidatengene zur Verfügung standen.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer - z. B. Anwenderkonferenzen

Viele der in diesem Teilprojekt erhaltenen Ergebnisse wurden bereits auf mehreren nationalen und internationalen Tagungen in Form von Postern oder Vorträgen präsentiert. Detaillierte Studien bezüglich einiger interessanter Kandidatengene wurden schon und werden noch veröffentlicht.

Empfehlungen für mögliche Züchtungsstrategien mit dem Ziel einer verbesserten Malz- und Brauqualität mittels MAS wurden oft auf Tagungen und bei Zusammenkünften mit Vertretern aus der praktischen Gerstenzüchtung erörtert.

Auch die optimale Methodik bei der Assoziationskartierung wurde häufig diskutiert. Aufgrund des stark gestiegenen Interesses in wissenschaftlichen Kreisen an dieser Thematik ist am IPK eine Initiative gegründet worden, die dem Austausch von Wissen und Erfahrung über aktuelle Methoden in der Assoziationskartierung und als Diskussionsforum dient.

Das IPK-GGK wird im Rahmen seiner Forschungsaufgabe die in GABI-MALT gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen/Erkenntnisse auch in gegenwärtigen, nachfolgenden und verwandten Projekten mit Schwerpunkt Assoziationskartierung (Gerste und Weizen als Modellorganismen / Kulturarten) einfließen lassen.

6. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Das Projekt konnte hinsichtlich Zeit und Kosten wie beantragt planungsgemäss abgeschlossen werden. Das Projekt wurde mit einer dreimonatigen Verzögerung aufgenommen, konnte aber aufgrund einer Verlängerung um diese drei Monate erfolgreich beendet werden.