

Institut für Pflanzenbau

Lokalisation von Genen für die Vererbung des (1-3) (1-4)- β -D-
Glukangehalts bei Gerste

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

vorgelegt am
02.01.2001

von
Andrea S. Binder

aus
Sankt Augustin

D 98

Referent:	Herr Professor Dr. Jens Léon
Koreferent:	Frau Professor Dr. Heide Schnabl
Tag der mündlichen Prüfung:	26. April 2001
Gedruckt bei:	Shaker Verlag

Schriftenreihe des Institutes für Pflanzenbau

Band 1/2002

Andrea Binder

**Lokalisation von Genen für die Vererbung
des (1-3) (1-4)- β -D-Glukangehalts bei Gerste**

D 98 (Diss. Universität Bonn)

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Binder, Andrea:

Lokalisation von Genen für die Vererbung des (1-3)(1-4)- β -D-Glukangehalts bei Gerste / Andrea Binder.

Aachen: Shaker, 2002

(Schriftenreihe des Institutes für Pflanzenbau; Bd. 2002,1)

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8322-0316-8

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-0316-8

ISSN 1619-9456

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407/95 96-0 • Telefax: 02407/95 96-9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Lokalisation von Genen für die Vererbung des (1-3) (1-4)- β -D-Glukangehalts bei Gerste

(1-3)(1-4)- β -D-Glukane gehören zur Familie der linearen Polysaccharide. Man findet diesen Inhaltsstoff vornehmlich in Hafer und Gerste. Hochmolekulare gelöste β -Glukane können sich zu Gelen aggregieren. Diese Eigenschaft ist, je nach Verwendungsrichtung der Gerste, einerseits sehr willkommen, andererseits aber unerwünscht:

Beim Verzehr von glukanhaltigen Nahrungsmitteln kommt es beim Menschen zu einer Absenkung des Blutzucker- und des Cholesterinspiegels. Dieser aus ernährungsphysiologischer Sicht erwünschte Effekt wird durch die hohe Viskosität des Inhaltstoffes verursacht. Im Brauereigewerbe kann diese Eigenschaft den Brauprozess dagegen erheblich stören. β -Glukane können durch ungenügende Solubilisierung während des Brauvorgangs in die Würze gelangen. Dies kann im weiteren Verlauf zu Filterverstopfungen führen.

Bisher gibt es noch keine Untersuchungen für ein Kreuzungssystem, in das neben Kulturgersten auch Wildgersten, die sich durch hohe β -Glukangehalte auszeichnen, einbezogen worden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb als Kreuzungselter neben der Kulturform Lerche die Wildform 41936, die über 8 % β -Glukan enthält, zur Kreuzung verwendet. Ziel der Arbeit war die Gewinnung von Informationen über die genetische Struktur des β -Glukangehalts. Zu diesem Zweck wurde eine QTL-Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden 282 F_2 -Nachkommen, die aus dieser Kultur- x Wildgerstenkreuzung hervorgegangen sind, für Kartierungszwecke verwendet.

Die einfache Regression der Markerdaten auf den Phänotyp ergab insgesamt 20 signifikante Marker für den β -Glukangehalt. Mit Hilfe der Intervallanalyse konnten fünf verschiedene Genorte, drei auf Chromosom 1 H und zwei auf Chromosom 2 H, für das Merkmal β -Glukan detektiert werden. Der Mikrosatellit-Marker HvALAAT erklärt auf Chromosom 1 H 12,3 % der phänotypischen Varianz an der Gesamtvarianz, auf Chromosom 2 H erklärt Mikrosatellit HvXYLISOG 5,4 % phänotypische Varianz. Durch die Berechnung des multiplen B^2 s konnten 31,4 % phänotypische Varianz erklärt werden.

Die drei Genorte, die auf Chromosom 1 H detektiert wurden, zeigten jeweils additive Genwirkung. Einer der beiden Loci auf Chromosom 2 H wirkte ebenfalls additiv, der zweite Genort zeigte vollständige Dominanz. Neben diesen beiden Genwirkungen konnte weiterhin ein epistatischer Effekt zwischen dem β -Glukan-Locus GMS003 und dem Locus HvBDG, der das (1-3)(1-4)- β -D-Glukanase-Gen EI kodiert, nachgewiesen werden.

Mapping genes for the (1-3) (1-4)- β -D-glucan content in barley

The linear polysaccharid (1-3) (1-4)- β -D-glucan is a major component of starchy endosperm and alleurone cell walls in barley and oat grains. Barley β -glucans have properties of both technological and nutritional significance.

On one hand a high β -glucan level during the brewing process is responsible for retarding of malting, decreasing output during mashing, increasing of the viscosity of wort and beer and the formation of gelatinous precipitates during storage. On the other hand β -glucans are desirable for human nutrition, because they are considered to have hypocholesterolemic effects. They lower the cholesterol level by reducing low density lipoproteins.

Up to now no breeding program has been investigated that includes wild barley lines (*H. spontaneum*) as well as barley cultivars (*H. vulgare*). These wild barley lines distinguish themselves by a very high β -glucan content, in some cases the β -glucan content can reach up to 13 %. In the present investigation a wild barley line, that contains more than 8 % β -glucan, has been used as a parent of a cross with a barley cultivar.

The objective of this study was to achieve information on the genetic structure of the β -glucan content. For this reason a QTL-analysis was carried out. Therefore, 282 F₂ individuals originating from the cross of the German spring barley cultivar Lerche and the wild form BGR41936 were used for linkage mapping.

By single point analysis 20 significant markers were found. All in all five quantitative trait loci for barley β -glucan could be detected by interval mapping procedures. Three of them were located on chromosome 1 H, the remaining two were located on chromosome 2 H. A part of the phenotypic variance (12,3 %) could be accounted for by the microsatellite HvALAAT on chromosome 1 H. It was possible to explain another 5.4 % of the phenotypic variance by the marker HvXYLISOG on chromosome 2 H. Seven selected significant markers explain altogether 31.4 % of the phenotypic variance.

The three loci which were located on chromosome 1 H showed additive effects, just as one of the other two loci on chromosome 2 H. The second locus on chromosome 2 H showed a complete dominant effect. Beside these gene effects a further epistatic effect between the β -glucan locus GMS003 and the (1-3) (1-4)- β -D-glucanase-gene locus EI (HvBDG) could be detected.

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Die Struktur der (1-3) (1-4)- β -D-Glukane.....	3
2.2	β -Glukane in der Pflanze.....	5
2.3	Die Bildung von β -Glukanen.....	6
2.4	Der Abbau von β -Glukanen.....	7
2.5	Die Bedeutung der β -Glukane.....	9
2.6	Die Vererbung von β -Glukanen.....	11
2.7	Die QTL Analyse.....	12
2.7.1	QTL-Analyse mit Hilfe molekular- genetischer Marker.....	13
2.7.2	Klassen molekularer Marker und deren Anwendungsmöglichkeiten.....	15
2.7.2.1	RFLP.....	15
2.7.2.2	RAPD.....	15
2.7.2.3	STS.....	16
2.7.2.4	Mikrosatelliten.....	16
2.7.2.5	AFLP.....	17
2.8	Erstellung von Kopplungskarten als Grundlage für die QTL-Analyse.....	17
2.9	Aktueller Stand von QTL-Kartierungsarbeiten bei Gerste.....	18
2.10	Markergestützte Selektion auf QTL.....	20
2.11	Ziel der Arbeit.....	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Pflanzenmaterial.....	23
3.2	Standorte.....	23
3.3	Düngung und Pflanzenschutz.....	24
3.4	Bonitur und Ernte.....	25
3.5	Durchführung der QTL-Analyse.....	26
3.6	Molekularbiologische Untersuchungen.....	29

3.6.1	Isolierung von DNA aus Gerstenblattmaterial.....	29
3.6.2	Molekulare Marker.....	30
3.6.2.1	Mikrosatelliten.....	30
3.6.2.2	AFLP.....	33
3.7	Herstellung eines 6 % igen Acrylamidgels.....	35
3.8	Gelelektrophoretische Auftrennung amplifizierter PCR-Produkte.....	36
3.9	Silberfärbung der Polyacrylamidgele.....	37
3.10	Auswertung der Polymorphismen.....	37
3.10.1	Auswertung des Bandenmusters bei Mikrosatelliten.....	37
3.10.2	Auswertung des Bandenmusters bei AFLP-Markern.....	38
3.11	Untersuchung der Marker auf gestörte Segregation.....	39
3.12	Kopplungsanalyse und Berechnung von Kopplungs- gruppen.....	40
3.13	Bestimmung des β -Glukangehaltes.....	40
3.14	Ermittlung von transgressiven Linien.....	44
3.15	QTL-Analyse.....	44
3.16	Bestimmung der Allelwirkung.....	45
3.17	Verifizierung der gefundenen QTL.....	45
3.18	Statistische Analysen.....	46
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	48
4.1.1	Selektion von 14 neuen Mikrosatelliten und Primer-Design.....	48
4.1.2	Amplifikations-Fragment-Längen-Poly- morphismen.....	50
4.1.3	Kopplungsanalyse.....	51
4.1.4	Test auf gestörte Segregation.....	52
4.2	β -Glukanbestimmungen.....	54

4.2.1	β-Glukanbestimmung in der F ₂	54
4.2.2	β-Glukanbestimmung in der BC ₃ F ₂ und BC ₃ F ₃	55
4.2.3	Vergleich der durchschnittlichen β-Glukanwerte <i>gleicher</i> Pflanzenfamilien zwischen den beiden Generationen BC ₃ F ₂ und BC ₃ F ₃	58
4.2.4	Vergleich der Rangordnung <i>gleicher</i> Pflanzen- familien zwischen den beiden Generationen auf- grund ihrer durchschnittlichen Glukangehalte.....	59
4.3	QTL-Analyse für das Merkmal β-Glukan.....	60
4.4	Beschreibung der Allelwirkung.....	69
4.5	Kreuzvalidierung.....	70
4.6	Verifizierung der gefundenen QTL in der BC ₃ F ₂ - Generation.....	70
4.7	Bestimmung epistatischer Genwirkungen.....	74
4.8	Ermittlung der durch die Marker erklärten Varianz.....	77
4.9	QTL-Analyse für die Ertragsmerkmale Harvestindex, Kornertrag, TKG und Anzahl Karyopsen je Ähre.....	80
4.10	QTL-Analyse für die Merkmale Fläche je Fahnenblatt, Länge je Fahnenblatt und Phyllochron.....	87
4.11	Korrelationen zwischen einzelnen Merkmalen.....	91
5	Diskussion.....	92
5.1	Einsatz von molekularen Markern	92
5.1.1	Mikrosatelliten.....	92
5.1.2	AFLP-Marker.....	95
5.1.3	Gestörte Segregation molekularer Marker.....	99
5.2	Erstellung und Vergleich der eigenen genetischen Karte mit anderen Gersten-Genkarten.....	101
5.3	Bestimmung des β-Glukangehaltes.....	106
5.4	Merkmalskorrelationen.....	109

5.5	Lokalisierung von QTL für die Vererbung des β -Glukangehaltes.....	110
5.6	Verifizierung der gefundenen QTL.....	113
5.7	Die (1-3)(1-4)- β -D-Glukanase - ein wichtiges Enzym beim β -Glukanabbau.....	115
5.8	Auswirkungen der Epistasie auf unterschiedliche Genotypen der Verifizierungspopulation BC ₃ F ₂	119
5.9	Die QTL-Analyse und ihre wichtigsten Einflußfaktoren.....	123
5.10	Die QTL-Kartierung als Voraussetzung für eine Markergestützte Selektion (MAS).....	126
6	Zusammenfassung.....	128
7	Literaturverzeichnis.....	132
8	Anhang.....	151
9	Lebenslauf	