



Hans H. Ruthenberg-Graduierten-Förderpreis 2014/

Hans H. Ruthenberg Award for Graduates 2014

Elsa Matthus “Genome wide association study (GWAS) to identify genes associated with tolerance to iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) - greenhouse experiment and field validation“

Universität Bonn, 2012

Supervisor: Prof. Dr. M. Frei

Zusammenfassung

PROBLEMSTELLUNG

Um die rasant wachsende Weltbevölkerung zu ernähren, muss die weltweite Nahrungsmittelproduktion steigen bzw. sich verdoppeln (Godfray et al., 2010). Dabei spielt Reis (*Oryza sativa* L.) eine bedeutende Rolle, da es das wichtigste Grundnahrungsmittel für mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist (FAO, 2003). Drei Viertel der weltweiten Ernte werden in Nassreisanbau kultiviert. Die Überstauung der Böden schafft einzigartige Wachstumsbedingungen, die Reis drastisch von anderem Getreideanbau unterscheidet. Des Weiteren beschäftigt Reisanbau mehr als ein Fünftel der Weltbevölkerung, wobei ein Großteil auf Farmen angebaut wird, die kleiner als ein Hektar sind, zumal von schlechter Bodenqualität. Sogenannte „problem soils“ sind besonders verbreitet in Entwicklungsländern (Lynch, 2007). Hier trifft es vor allem bäuerliche Kleinbetriebe, die unter schlechten Ernten durch biotische und abiotische Stressfaktoren leiden. Im Nassreisanbau ist Eisentoxizität ein weitverbreitetes Problem. Unter sauerstoffreichen Bedingungen ist Eisen im Boden für Pflanzen nur gering verfügbar. Die anaeroben, reduzierenden Bedingungen der überstauten Felder führen jedoch zu einer drastischen Freisetzung von Eisen. Wird dieses im Übermaß aufgenommen, führt es in der Reispflanze zur Bildung von hochgradig schädigenden, reaktiven Sauerstoffspezies. Visuell wird dies anfänglich sichtbar durch braune Verfärbungen der Blätter, das sogenannte „leaf bronzing symptom“. Eisentoxizität betrifft Pflanzen unabhängig von Trocken- und Regensaison und Wachstumsphase (Becker & Asch, 2005). Es tritt weltweit auf, weitverbreitet von West Afrika bis Südostasien, und führt von Ernteverlusten bis hin zu kompletten Ernteaussfällen (Audebert et al., 2006).

Bodendegradierung, ökonomisch und ökologisch steigende Kosten von chemischen Düngemitteln und Pestiziden sowie die Auswirkungen des Klimawandels machen eine „nachhaltige Intensivierung“ (Royal Society Report, 2009) der Landwirtschaft unabdingbar. Wie können wir nachhaltig mehr Nahrungsmittel auf „problem soils“ produzieren?

ZIELSETZUNG

Ein besseres Verständnis des komplexen Stresses „Eisentoxizität“ und dessen Wirkmechanismus in der Pflanze ist die Voraussetzung für die Züchtung toleranter Sorten. Die Grundlage bildet dabei ein genaues genetisches Verständnis der Eigenschaft der Eisentoleranz. Diese ist abhängig vom Genotyp und wird als „complex trait“ beschrieben; als eine Eigenschaft, die durch mehrere Gene reguliert wird. Traditionell werden solche „complex traits“ durch QTL-Analysen untersucht: in Populationen aus der Kreuzung zweier Linien werden die Regionen im Genom einzukreisen versucht, die eng mit der untersuchten Eigenschaft zusammenhängen. Nachteil dieser Analyse ist, dass sie die oftmals überwältigende genetische Diversität aufgrund des bi-parentalen Ansatzes außer Acht lässt. Unterschiedliche Toleranzmechanismen, wie Eisenexklusion an der Wurzel, Kompartimentierung innerhalb verschiedener Pflanzenorgane oder effiziente Detoxifizierung der radikalen Sauerstoffspezies im Blattgewebe, wurden vorgeschlagen, sind bisher jedoch wenig untersucht.

Dieses Projekt führt zusammen: (i) die große genetische Diversität von Reis, (ii) die einzigartigen bioinformatischen Ressourcen, die die Modellpflanze Reis bietet, (iii) eine moderne Mappingmethode sowie (iv) Validierung der Ergebnisse auf einem natürlich eisentoxischen Feld in den Philippinen in Kooperation mit den Internationalen Reiserforschungszentrum (IRRI). Ein Verständnis der genetischen Grundlage von Eisenaufnahme, -transport und -toleranz sind die Grundlage für nachhaltige Erntesteigerung auf eisen toxischen Böden und biofortifizierte Nahrungsmittel.

METHODISCHES VORGEHEN

Genomweite Assoziationsstudien (aus dem Englischen: „Genome-wide association studies“, GWAS) sind eine moderne Art der QTL-Analyse, wobei sie genetisch sehr diverse Linien einbeziehen. Dabei werden genotypische und phänotypische Daten miteinander assoziiert, um Genombereiche zu erkennen, die signifikant mit der betrachteten Eigenschaft (hier: Eisentoleranz) in Verbindung stehen. In diesem Genombereich können daraufhin per bioinformatischer Analyse Kandidatengene ausgemacht und in weiteren physiologischen Studien überprüft werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die weltweit erste Assoziationsstudie mit Fokus auf Eisentoxizität. Dazu wurden 329 diverse Linien aller fünf Sub-Populationen von Reis aus 79 Ländern in einem Nährlösungsversuch angezogen. Nach vier Wochen wurden die Pflanzen mit 1000 ppm Eisen (Fe^{2+}) für fünf Tage gestresst. Phänotypisiert wurden hiernach die sichtbaren „leaf bronzing symptoms“ sowie generelle Wachstumsparameter wie Wuchs- und Wurzellänge. Alle verwendeten Reislinien wurden bereits genotypisiert (Zhao et al., 2011), die Daten sind im Internet frei verfügbar (www.ricediversity.org). Die genotypischen Daten bedeuten 44000 sequenzierte SNPs (single nucleotide polymorphism) pro Linie. Phänotypische und genotypische Daten wurden assoziiert, unter Verwendung eines mixed linear models, welches die Verwandtschaftsverhältnisse einkalkuliert und somit besonders mächtig ist. loci, die signifikant mit Eisentoleranz assoziierten, wurden per Datenbankanalyse auf potentielle Kandidatengene, involviert in Eisenaufnahme, -transport, etc., untersucht.

Um die Ergebnisse, die unter kontrollierten Bedingungen gewonnen wurden, auch unter Feldbedingungen zu überprüfen, wurde ein Feldversuch in Kooperation mit dem IRRI unternommen. Dazu wurden 32 Linien ausgewählt, die im Nährlösungsversuch besonders tolerant bzw. empfindlich auf Eisenstress reagierten. Die Pflanzen wurden während der Regensaison auf einem natürlich vorkommenden eisentoxischen Standort in Ajuy, Provinz Iloilo, auf den Philippinen kultiviert und Wachstumsparameter sowie „leaf bronzing symptoms“ durchgängig bestimmt.

ERGEBNISSE

Der Nährlösungsversuch zeigte eine große phänotypische und somit zugrunde liegende genotypische Variabilität bei Eisenstress unter den diversen Reislinien. So reagierten die *temperate japonica* und aromatische Sub-Populationen signifikant toleranter auf Eisenstress ($p < 0.001$) als die Sub-Populationen *tropical japonica*, *indica* und *aus*. Die Assoziationsanalyse von phänotypischen und genotypischen Daten ergab 224 Loci auf allen zwölf Chromosomen des Reisgenoms (ausgenommen Chromosom 12), die hochsignifikant ($p < 0.0001$) mit Eisentoleranz in Verbindung gebracht wurden. Die Loci wurden auf Linkage Disequilibrium untersucht und per Datenbanksuche mögliche Kandidatengene bestimmt. In der vorliegenden Masterarbeit wurden exemplarisch vier Loci auf den Chromosomen zwei, fünf, sechs und acht analysiert, da sie auffällig mit bereits beschriebenen QTLs für Eisentoleranz co-lokalisieren. Kandidatengene, die bereits die Grundlage für weiterführende physiologische Studien an der Universität Bonn bilden, sind zum Beispiel Gene involviert in Redox-Reaktionen (Peroxidasen, Thioredoxine, Quinone, etc.), Transporter (ATPasen, Metal tolerance protein 1) und Genprodukte, die mit Stressen assoziiert werden, welche häufig in Verbindung mit Eisentoxizität auftreten wie Phosphordefizienz (Phosphate starvation protein).

Der Feldversuch erlaubte eine weitere Charakterisierung von interessanten Genotypen. Die vorliegende Arbeit beschreibt mehrere, diverse Reislinien, die unterschiedlichste Phänotypen unter Eisenstress zeigen. Diese sind sowohl für die weitere Forschung an Toleranzmechanismen wie auch für die Züchtung toleranter Sorten interessant, besonders dahingehend, da sie die Nutzung der beeindruckenden genetischen Diversität der Kulturpflanze Reis ermöglichen.

REFERENZEN

- Audebert, A., Narteh, L. T., Kiepe, P., Miliar, D., & Beks, B. (2006). Iron Toxicity in Rice-based Systems in West Africa Upland Hydromorphic zone Lowland. Africa Rice Center (WARDA).
- Becker, M., & Asch, F. (2005). Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 558-573.
- FAO (2003). International Rice Commission Newsletter.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* (New York, N. Y.), 327(5967), 812-818.
- Lynch, J. P. (2007). Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany*, 55(5), 493.
- Royal Society Report (2009). Reaping the benefits: science and the sustainable intensification of global agriculture.
- Zhao, K., Tung, C.-W., Eizenga, G. C., Wright, M. H., Ali, M. L., Price, A. H., McCouch, S. R. (2011). Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communications*, 2, 467.