

15. JUN. 2012  
RA Tronje

Prof. Dr. Rixecker  
Saarländisches Oberlandesgericht  
66104 Saarbrücken

Department Biologie  
Lehrstuhl für Biochemie  
Prof. Dr. Uwe Sonnewald...  
Staudtstr. 5, 91058 Erlangen  
Telefon +49 9131 85-28255  
Fax +49 9131 85-28254  
Email: usonne@biologie.uni-erlangen.de

Eingegangen beim Saarländischen  
Oberlandesgericht Sbr., 1. JUN. 2012  
Anlagen

RE: 5U 241/10

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Rixecker,

Bezug nehmend auf Ihr Schreiben vom 30. Mai 2012 möchte ich auf Ihre Anfrage wie folgt antworten.

Anders als von Ihnen formuliert verfolgte das Verbundprojekte „Zur biologischen Sicherheit von gentechnisch veränderter Gerste, Teilprojekt: Auswirkung von Pilzresistenzgenen auf Inhaltstoffe und deren Wechselwirkung mit assoziierten Pilzen“ zwei Ziele:

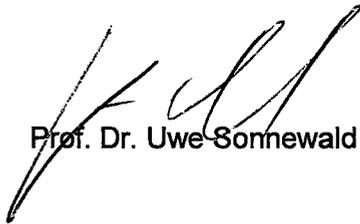
- (1) eine detaillierte Untersuchung der direkten Interaktion von (transgenen) Pflanzen mit pilzlichen Mikroorganismen sowie eine Studie zur Epidemiologie der Pilzentwicklung auf transgener Gersten (inkl. nützlicher Endophyten und pathogener Mykotoxinbildner) und
- (2) eine Evaluation der Effekte des Transgens auf die substanzielle Äquivalenz der Gerstenpflanzen unter Bedingungen des Feld- und Gewächshausanbaus bei Pathogendruck und Mykorrhizierung.

Mein Arbeitskreis an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg war für den zweiten Teil des Arbeitsprogramms verantwortlich. Dem angehängten Abschlussbericht können sie entnehmen, dass alle Ziele des ursprünglichen Arbeitsplans weitestgehend erreicht wurden. Einschränkend ist anzumerken, dass auf Grund von wiederholten Feldzerstörungen der Einfluss der Transgenexpression auf das Gerstenkorn nicht untersucht und die vorgesehenen unabhängigen Wiederholungen der Messungen nicht durchgeführt werden konnten. Dennoch sind die erhobenen Daten aus den Jahren 2006 und 2007 robust und zeigen, dass Sorten- und Umwelteinflüsse einen signifikanten Einfluss auf die Transkript und Metabolitzusammensetzung

der Gerstenblätter haben, wohingegen die Expression einer zusätzlichen Chitinase hier keinen messbaren Einfluss hat. Diese Schlussfolgerung wird auch durch Gewächshausdaten gestützt, die ebenfalls keinen Transgeneffekt auf metabolischer Ebene zeigten. Die Arbeiten konnten im Jahr 2010 mit unserem Kooperationspartner Prof. Karl-Heinz Kogel in der renommierten Fachzeitschrift PNAS veröffentlicht werden.

Demzufolge möchte ich der Aussage, die Mittel seien für „ganz andere Sachen“ verwendet worden zurückweisen und stehe für weitere Rückfragen gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. Uwe Sonnwald

Anlagen

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben 0313282C

Kopie der Publikation Kogel et al. 2010

Forschungsvorhaben: 0313282C

Verbundprojekt: „Zur biologischen Sicherheit von gentechnisch veränderter Gerste,  
Teilprojekt: Auswirkung von Pilzresistenzgenen auf Inhaltstoffe und deren Wechselwirkung  
mit assoziierten Pilzen“

Ausführende Stelle: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,  
Naturwissenschaftliche Fakultät, Department Biologie, Lehrstuhl Biochemie, Staudtstrasse 5,  
91058 Erlangen

Projektleiter: Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Laufzeit: 01.04.2005 bis 30.09.2008

## I. 1. Aufgabenstellung

In einem Verbundprojekt der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg sollten transgene Gerstenlinien mit erhöhter Pilzresistenz und/oder verbesserter Futtereigenschaft bezüglich sicherheitsrelevanter Eigenschaften untersucht werden. Folgende Transgene standen zur Verfügung: (a) Das thermostabile (1,3-1,4)- $\beta$ -Glucanase Gen aus *Bacillus amyloliquefaciens* liegt bereits in modernen Hochleistungssorten vor und wird seit 1996 unter Feldbedingungen an der Washington State University, Pullman, evaluiert. (b) Transgene Pflanzen, die das *Trichoderma harzianum* *ThEn42* Gen für Endochitinase-Aktivität exprimieren, zeigen Resistenz gegenüber einem Wurzelkrankheitskomplex verursacht durch *Rhizoctonia solani* und *Rhizoctonia oryzae* mit soweit heute bekannt hoher Gattungsspezifität. Der künftige Markt für diese und weitere erst zu erstellende verbesserte Pflanzen mit der transgenen Eigenschaft „Pilzresistenz“ ist deshalb so groß, weil insbesondere die Kontrolle von Wurzel- und Ährenpathogenen unter heutigen Produktionsbedingungen aufgrund fehlender oder unzureichender chemischer Wirkstoffe und nicht existierenden resistenten „germplasms“ problematisch ist. Zudem werden diese Krankheiten in teilweise massivem Ausmaß durch moderne low input (Direktsaat, reduzierte Bodenbearbeitung) gefördert. Ganz gezielt könnte damit ein Einsatz der hier unter Sicherheitsaspekten bearbeiteten transgenen Pflanzen oder Pflanzen mit ähnlichen „traits“ zu einer substanziellen Lösung von schwerwiegenden Problemen des weltweiten Pflanzenschutzes auf Basis biotechnologischer Strategien beitragen.

In dem vorgeschlagenen Projekt sollen die transgenen Pflanzen im Gewächshaus und im Feldanbau unter folgenden Aspekten untersucht werden:

- (a) Eine detaillierte Untersuchung der direkten Interaktion von (transgenen) Pflanzen mit pilzlichen Mikroorganismen sowie eine Studie zur Epidemiologie der Pilzentwicklung auf transgener Gerste (inkl. nützliche Endophyten und pathogene Mykotoxinbildner).
- (b) Eine Evaluation der Effekte des Transgens auf die substanzielle Äquivalenz sowie auf Inhaltsstoffe und Kornqualität unter den Bedingungen des Feld- und Gewächshausanbaus (Pathogendruck und Mykorrhizierung).

Die Feldstudien sollen unter den Produktionsbedingungen des „low inputs“ (reduzierte Bodenbearbeitung, reduzierte Pflanzenschutzmaßnahmen, reduzierte Saatedichte, reduzierte Düngung) im Vergleich zu intensiver Bewirtschaftung vergleichend angelegt werden.

Einen Kern des Projektes bildet die Frage nach dem Verhalten von transgener pilzresistenter Gerste gegenüber der Besiedlung durch schädliche Pathogene und pilzliche Symbionten. Die Sicherheitsrelevanz und ökologische Bedeutung der Fragestellung wird insbesondere durch die Tatsache deutlich, dass etwa 80% aller Landpflanzen in Symbiose mit Pilzen der arbuskuläre Mykorrhiza leben, die ein erhebliches ökologisches sowie phytomedizinisches Potenzial besitzen: Mykorrhizierte Pflanzen sind widerstandsfähiger gegenüber Pathogenen und

toleranter gegenüber abiotischen Faktoren wie Salzstress oder Wassermangel. Auch Getreide ist in einem weiten Ausmaß mykorrhizierbar, so dass es dringend geboten erscheint, im Zusammenhang mit der Eigenschaft „Pilzresistenz“ Effekte von Transgenen gegenüber den ubiquitär verbreiteten, auch in Agroökosystemen funktionellen Mikroorganismen zu prüfen.

Das vorgeschlagene Projekt hat große Erfolgsaussichten, weil die beteiligten Partner sich ergänzende Kompetenzen besitzen, die das methodisch notwendige *know how*, wie epidemiologische Methoden für Feldstudien, *low input* Strategien und phytomedizinische Methoden (Uni Gießen) sowie Feldanbau gentechnisch veränderter Nutzpflanzen, molekularbiologische und biochemische Methoden (FAU, Erlangen-Nürnberg) abdecken. Synergien sind auch deshalb zu erwarten, da die Gießener und Erlanger Arbeitsgruppen in GABI-Agrotec kooperieren und Ressourcen erstellt haben (wie defence-related *macroarray* chips), die direkt in dem hier beantragten Projekt genutzt werden können. Eine enge Kooperation mit der Washington State University (Partner 3) ist für dieses Projekt essentiell. Die transgenen Gersten werden von diesem Partner zur Verfügung gestellt. Es besteht von US amerikanischer Seite bereits große praktische Erfahrung und ein enormes technisches *know how* bezüglich der transgenen Gersten im Feldanbau.

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

Voraussetzung für die Durchführung des Verbundprojektes waren zum einen die zur Verfügungsstellung des transgenen Saatguts, sowie die Genehmigung der Freilandtestung der gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen. Beide Voraussetzungen wurden erfüllt.

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

Um den Projektzielen gerecht werden zu können, wurden die Arbeiten in 8 Arbeitspakete eingeteilt:

- 1) Untersuchungen zur Interaktion der transgenen Gerstenpflanzen mit den endophytischen Pilzen *Glomus mosseae* und *Piriformospora indica* unter Gewächshausbedingungen.
- 2) Beantragung und Durchführung von Feldversuchen mit gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen.
- 3) Evaluierung der Interaktion transgener Gerstenpflanzen mit dem Mycorrhiza Pilz *Glomus mosseae* und unterschiedlichen Schadpilzen unter Feldbedingungen.
- 4) Untersuchungen zur Epidemiologie pilzlicher Schaderreger.
- 5) Etablierung der Metabolomanalyse für Gerste
- 6) Analyse transkriptioneller Unterschiede zwischen transgenen Gerstenpflanzen und untransformierten Kontrollpflanzen unter Feldbedingungen.
- 7) Analyse metabolischer Unterschiede zwischen transgenen Gerstenpflanzen und untransformierten Kontrollpflanzen unter Feldbedingungen.
- 8) Strukturelle Bestimmung unbekannter Metabolite

- 9) Bestimmung agronomischer Parameter unter besonderer Berücksichtigung von Kornertrag und -qualität.

In Erlangen wurden der Versuchsplanung entsprechend Arbeiten zu Arbeitspaketen 5-7 durchgeführt. Da die Metabolomanalysen keinen Anhaltspunkt für transgen-spezifische Metabolite ergaben, wurde auf die strukturelle Analyse unbekannter Metabolite (Arbeitspaket 8) verzichtet.

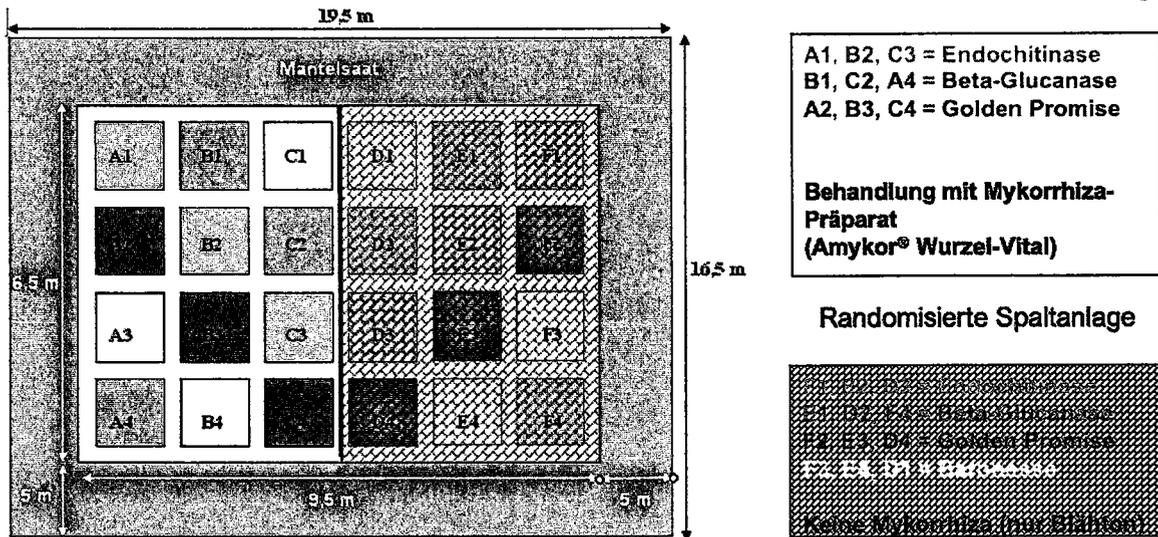
Im Jahr 2006-08 standen die deutschlandweit ersten Freisetzungsversuche mit transgenen Gerstenpflanzen und begleitende molekulare/biochemische Untersuchungen im Vordergrund unserer Bemühungen. Bei den transgenen Pflanzen handelte es sich um Endochitinase (ThEn42) bzw. Glucanase (1,3-1,4- $\beta$ -Glucanase) exprimierende Gerstenlinien der Sorten Baronesse und Golden Promise. Der Freilandversuch wurde unter der Federführung von Partner 1 in Giessen durchgeführt. Die Anbauschemata der Jahre 06 und 07 sind Abbildung 1 zu entnehmen. Weitere Details zum Versuch finden sich im Bericht von Partner 1.

Da der Versuch im Jahr 2006 auf Grund erheblicher Beschädigung durch Aktivisten vorzeitig beendet werden musste, beschränkten sich die ersten Untersuchungen auf Messungen an Jungpflanzen in der vegetativen Wachstumsphase. Leider wurde auch im Jahr 2007 das Freilandexperiment durch Aktivisten erheblich beschädigt. Hier konnte aber noch eine von drei Wiederholung durch unsere Gruppe biochemisch / molekularbiologisch untersucht werden. Der für das Jahr 2008 geplante Freisetzungsversuch konnte wegen einer Feldbesetzung durch Aktivisten nicht mehr durchgeführt werden.

Parallel zum Freilandversuch vom Jahr 2007 wurde vom Partner 1 die Endochitinase exprimierende transgene Gerste auch im Gewächshaus kultiviert. Neben der Studie zur Besiedlung mit Mykorrhizapilzen wurden hier auch Effekte einer Phosphatdüngung getestet. Auch zu diesem Experiment führte unsere Gruppe dem Freilandexperiment entsprechende biochemische Untersuchungen durch. Der Versuchsplan für die Aufzucht unter den kontrollierten Wachstumsbedingungen im Gewächshaus ist in Abbildung 2 dargestellt. Weitere Details werden im Bericht von Partner 1 genannt.

### **Konzeption der Feldversuche 2006 und 2007**

2006



2007

Versuchsplan 2007 (Split-Plot)

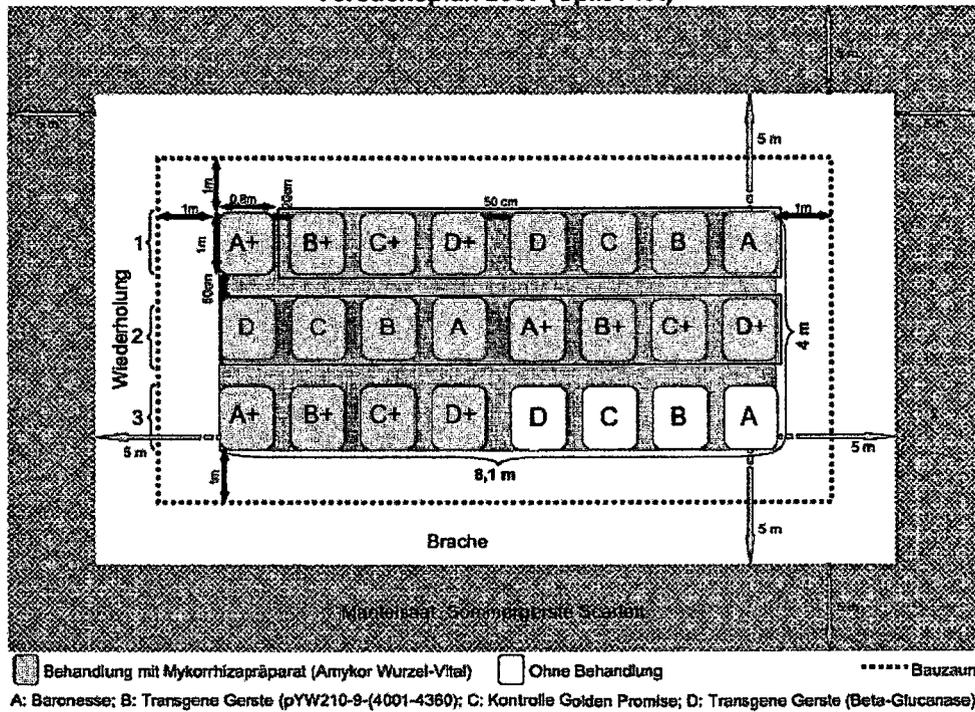


Abb 1. Versuchsfeld/ Konzeption der Freisetzungsversuche 2006 und 2007 (Details s. Bericht K. Kogel, Giessen) Die grau überdeckten Parzellen bei 2007 wurden von Aktivisten zerstört (62%)

Versuchsplan Gewächshaus 2007

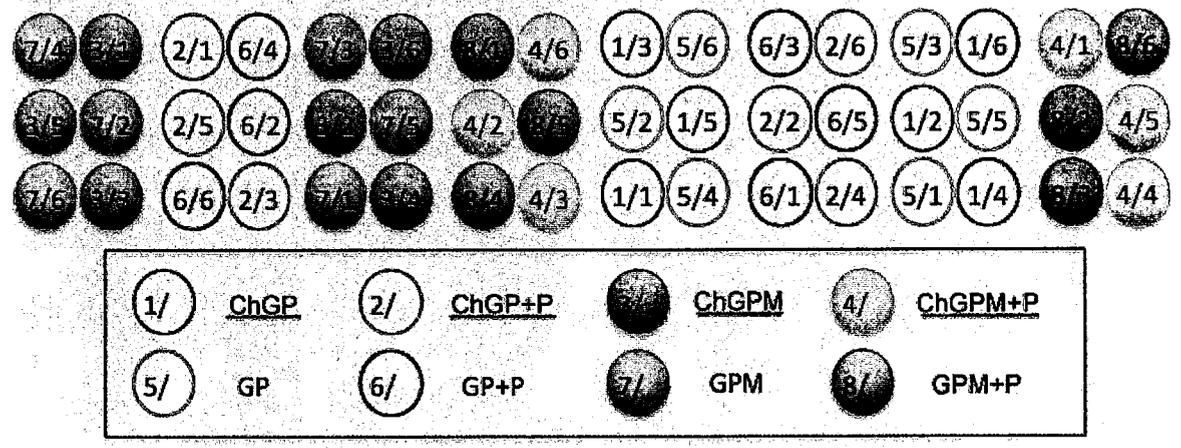


Abb 2. Konzeption des Gewächshausexperiments 2007

48 Töpfe a 4 Pflanzen waren im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen auf P-Mangelboden (Kleinlinden) mit und ohne Bodenpilz kultiviert. Zu jeder der 8 Varianten ( 1-8/ ) waren je 6 Wiederholungen ( /1- /6) angelegt worden. Gefüllte Kreise mit Bodenpilz, leere Kreise ohne Bodenpilz; (Ch) Endochitinase , (GP) Golden Promise (Sorte), (+) Wurzelbesiedlung mit Mykorrhiza durch Glomus mosseae (BEG 12)), (+P) P-Düngung mit 2,15g Hyperphosphat je Gefäß

I.4. wissenschaftlicher und technischer Stand

Der wissenschaftliche und technische Stand wurde für den Projektantrag zusammengestellt. Grundsätzlich handelt es sich bei dem beschriebenen Vorhaben um den ersten Feldversuch mit transgener Gerste in Deutschland. Der wissenschaftliche Hintergrund ist im Folgenden in englischer Sprache dem Antrag entnommen.

*Agronomical Significance of Endophytes:* Plant compatibility with mycorrhizal fungi is a generalized and ancient phenomenon. In terrestrial ecosystems, species in more than 80% of extant plant families are capable of establishing arbuscular mycorrhiza (AM), and fossil evidence suggests that symbiosis of this kind existed more than 400 million years ago in the tissues of the first land plants (Remy et al., 1994). As such the ability of plants to form AM must be under control of mechanisms that have be conserved in new plant taxa as they appeared during evolution. This compatibility also implies that selective recognition processes in plants discriminate between beneficial and harmful microorganisms and that the essential genetic determinants for AM establishment are common to an extensive part of the plant kingdom.

Interactions between an AM fungus and a plant start when a hypha from a germinating soilborne spore comes into contact with a host root. This step is followed by induction of an appressorium, from which an infection hyphae penetrates deep into parenchyma cortex, where inter- and intracellular proliferation of mycelium is intense. Here fungal development culminates in the differentiation of intracellular haustoria-like structures, known as arbuscles. This fungal structure, which establish a large surface of contact with the plant protoplast, is

attributed a key role in reciprocal nutrient exchange between the plant cell and the AM fungus. AM development continues within a root system as the fungus spreads to newly emerging roots. In this way, fungal colonization occurs concomitantly in different roots in an unsynchronized manner.

Through their function in the efficient exploitation of soil mineral resources and their bioprotective role against a number of common soilborne pathogens (Barea et al. 2002; Sanders 2003), AM fungi are instrumental in the survival and fitness of many plant taxa in diverse ecosystems, including many crop species (Allen 1991; Bethlenfalvai and Lindermann 1992). Thus, AM clearly affects prime agronomical parameters like quantity and quality of yield.

Earlier investigations demonstrated already that AM is present and plays a crucial role in agroecosystems (WINTER 1951, KRUCKELMANN 1975, LAND 1990, BALTRUSCHAT und DEHNE 1988 and 1989, BALTRUSCHAT 1990). In these systems, the AM is able to strengthen the plant against adverse environmental conditions rather than it is a factor for improved plant nutrition (PEUSS 1957). Mycorrhizal fungal species adapted to diverse agro-ecosystems seems to enhance resistance to biotic and tolerance to abiotic stress factors even under optimized nutritional conditions (DEHNE, 1987; BALTRUSCHAT, 1993).

Because of its significant agronomical potential, we will also investigate another endophyte that does not belong to AM fungi. *Piriformospora indica* is a root-colonizing endophytic fungus that was isolated from a rhizosphere soil sample of the woody shrubs *Prosopis juliflora* and *Zizyphus nummularia* growing in the Thar desert of Rajasthan, northwest India in 1997 (Verma et al. 1998). The fungus was named after its characteristic pear-shaped asexual spores. According to the analysis of 18S rDNA and the ultrastructure of the septal pore, its phylogenetic relationship is within the *Hymenomycetes (Basidiomycota)* with fungi from the genus *Rhizoctonia* as the nearest relatives. The fungus establishes symbioses within a broad host range comprising many mono- and dicotyledonous plants (Varma et al. 1999). In clear contrast to the worldwide most successful fungal group of symbiotic endophytes, the AM fungi (Smith and Read, 1997), for which the new taxonomic phylum "*Glomeromycota*" has been recently established (Schüßler et al. 2001), *P. indica* is not an obligate biotrophic fungus. Consequently, its propagation is not dependent on the host, and mass inoculum production is easily obtained from axenic cultures of the fungus in the absence of a host plant (Varma et al. 2001), which per se makes this fungus economically much more interesting for broad agronomical applications.

**Safety aspects:** AM, due to their key position at the plant-soil interface, are important to consider in the study of ecosystem impacts due to anthropological action. Human-induced changes in the earth's environment are clearly multi-factorial, and may have positive or negative impacts on mycorrhizal associations. One factor, that might directly affect

mycosymbionts, is a change in the plant genotypes associated with fungal disease resistance. Both, a systematic epidemiological analysis as well as a direct interaction study are crucial for a mechanistic understanding of the impact of specific as well as broad fungal resistance traits on changes in mycosymbionts. It can be expected that relevant effects rarely occur in isolation or under semi-artificial conditions but only under natural i.e. field situations. The complexity of regional combinations further highlights the need for mechanistic studies, since direct experimental exploration of a large number of scenarios would be virtually impossible. Processes and patterns at larger temporal and spatial scales have to be considered in an assessment of the impact on AM by transgenes conferring fungal resistance. Most laboratory experiments only allow access to short-term responses, while longer-term responses are really relevant. Large scale processes such as shifts in the regional distribution of transgenic plant certainly could effect AM, for example, alter the current distribution of AM types. With potential impacts on host biodiversity, mycosymbiont species diversity may also be impacted at global scales.

***Agronomical Significance of cereal ear and root diseases:*** The *spike* is one target for *Fusarium* species (*Fusarium graminearum* and to a lesser extent *Fusarium culmorum*). Infections not only result in a significant yield reduction, but also contaminate grains with mycotoxins produced by the pathogens. Thus, spike infections are highly critical for food safety (for a comprehensive overview: Proceedings of the 23. Mycotoxin-Workshop, Wien 2001, Society of Mykotoxin Forschung e.V.).

The *root* is the target for pathogens bearing – in present crop production systems - a highly devastating potential. Among the genus *Fusarium*, *F. culmorum* is predominantly present at the root. Furthermore, *Gaeumannomyces graminis* and *Rhizoctonia* species are serious fungal pathogens with world wide distribution. The lack of significant genetic (monogenic) sources for disease resistance as well as the unsatisfactory efficacy of specific chemical fungicides for controlling root pathogens creates the urgent need for genomic strategies. In this context it must be emphasized that, because of economical pressure, farmers are continuously forced to reduce crop rotations which will significantly elevate the threat to plant production by these pathogens.

***Requirement for root disease resistance cultivars for direct seed (no till) cropping systems:*** Compared to traditional cropping systems that use tillage, direct-seed cropping systems place seed and fertilizer directly into undisturbed soil with all residues of the previous crops left on the soil surface. These systems are being increasingly adopted by farmers worldwide because of their potential to reduce input costs, increase yields where water is limiting, reduce soil erosion, and conserve energy (Cook and Veseth, 1991; Cook, 1992; Cook *et al.*, 1995; Cook, 2000).

One of the main limiting factors to the adoption of direct-seeding for wheat and barley are root rot epidemics caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 8 (AG8) and *R. oryzae* (Weller *et al.*, 1986; Pumphrey *et al.*, 1987; Ogoshi *et al.*, 1990; Mazzola *et al.*, 1996, Bockus and Shroyer, 1998; Cook, 2000). Both have a very wide host range, causing root rot on other cereal as well as on many broadleaf crops, including peas, canola, safflower, lentils, chickpeas, and potatoes (Cook *et al.* 2000a), which encompasses all crops available for rotation with cereals. This broad host range makes *Rhizoctonia* root rot of barley and wheat virtually impossible to control by crop rotation. Of the many practices tested to limit the severity of *Rhizoctonia* root rot, only two work consistently. These are 1) timely elimination of volunteer-cereal and grass-weed hosts of the pathogens (Smiley, *et al.*, 1991, 1992), which minimizes the sources of inoculum; and 2) placement of fertilizer directly beneath each seed row (Cook, 2000b), which makes nutrients more accessible to diseased roots. However these two practices combined only can elevate grain yields to 80-85% of potential yield without root disease (Cook *et al.*, 2002).

No useful resistance has been identified in germplasm comprised of 114 accessions of hexaploid and tetraploid wheat, triticale, wild *Triticum* species and barley (Smith *et al.*, 2003 a,b). Only germplasm of *D. villosum* exhibited some level of seedling resistance. However, *D. villosum* chromosomes do not pair well with wheat (*Triticum*) chromosomes (Maan, 1987; Smith *et al.*, 2003) and thus make it difficult to transfer the resistance to wheat via traditional chromosome manipulation. Root rot caused by *R. solani* AG8 and *R. oryzae* can therefore be considered a logical candidate for control by transgenic resistance.

Two observations led to an investigation of the hypothesis that expression in barley of the 42-kDa endochitinase-encoding gene *ThEn42* of *Trichoderma harzianum* can confer resistance to one or both pathogens responsible for *Rhizoctonia* root rot. (1) Zeilinger *et al.* (1999) monitored expression of this endochitinase during mycoparasitism with a fusion of the green fluorescent protein (GFP) to the 5' regulatory sequence of the chitinase as a reporter in *T. harzianum* P1 during confrontation assays with *R. solani*. In contrast to other enzymes, this endochitinase was induced before *T. harzianum* is in physical contact with its host and was able as such to inhibit the growth of *R. solani* strain 1450. (2) In 1998, Lorito *et al.* (1998) successfully transferred the 42-kDa chitinase gene *ThEn42* (*chit42*) into tobacco and potato and obtained high expression of this chitinase in different plant tissues. Selected transgenic lines were coordinately tolerant or highly resistant to *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea*, and *R. solani*. Their research provides the first demonstration that plants transformed for expression of a fungal chitinase gene show high resistance to several fungal pathogens. Recently resistance to apple scab was conferred with the endochitinase in transgenic apples (Bolar *et al.*, 2000) and to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli (Mora and Earle, 2001a,b).

A cDNA encoding the 42 kDa endochitinase [*cThEn42(GC)*], GenBank accession L14614, was synthesized from 28 overlapping oligonucleotides. It included the nucleotide sequences of the fungal signal and activation peptides and of the signal peptide from the barley 26-kDa endochitinase HVChi26, GenBank accession M36989. The gene was expressed in *Pichia pastoris*. The produced and purified enzyme turned out to inhibit efficiently the hyphal growth of *R. solani* AG8 and *R. oryzae*. The gene was accordingly provided with suitable gene promoters and also other signal peptide codes. With constructs for *Agrobacterium* mediated transformation 52 transformants were obtained in the barley cultivar Golden Promise. Expression of the endochitinase was demonstrated in leaves and roots of a considerable number of these transformants. Segregating T<sub>1</sub> plants displayed in seedling assays disease resistant phenotypes, when compared to infected control plants (Wu, Cook, von Wettstein & Kannangara unpubl., Wu Ph.D. thesis, WSU 2003). This provides a large transgenic material for further investigation in the present proposed project. Permits for initial field nurseries at the experimental farm of Washington State University have been obtained from USDA-APHIS-BRS [USDA Animal and Plant Health Inspection Service/Biotechnology Regulatory Services].

### References

- Baltruschat, H. and H.-W. Dehne, 1989: The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in agro-ecosystems. II. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential in winter barley. *Plant and Soil* 113, 251-256
- Baltruschat, H., 1990: Der Einfluß mineralischer Düngung auf die VA Mykorrhiza. *Kali-Briefe (Büntehof)* 20, 77-91
- Barea et al. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 343-351.
- Bockus, W.W. and Shroyer, J.P. 1998. The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36:485-500.
- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Wong, K.W., Hayes, C.K., Harman, G.E. and Aldwinckle, H.B. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90(1): 72-77.
- Bousset L, Pons-Kühnemann J (2003) Effects of Acibenzolar-S-Methyl and Ethirimol on the composition of a laboratory population of barley powdery mildew. *Phytopathology* 93:305-315.
- Cook, R. J. 2001. Management of wheat and barley root diseases in modern farming systems. *Australasian Plant Pathology* 30:119-126.
- Cook, R. J. 2003. Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:87-98.
- Cook, R. J., D. M. Weller, A. Y. El-Banna, D. Vakoch, and H. Zhang. 2002. Yield responses of direct-seeded wheat to fungicide and rhizobacteria seed-treatments. *Plant Disease* 86:780-784.
- Cook, R. J., W. F. Schillinger, and N.W. Christensen. 2002. Rhizoctonia root rot and wheat take-all in diverse no-till cropping systems. *Can. J. Pl. Pathology* 24:349-358

- Cook, R.J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 76-85.
- Cook, R.J. 2000a. Advances in plant health management in the twentieth century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 95-116.
- Cook, R.J. 2000b. Influence of paired-row spacing and fertilizer placement on yield and root diseases of direct-seeded wheat. *Crop science* 40(4): 1079-1087.
- Cook, R.J. and Veseth, R.J. 1991. *Wheat health management*. St. Paul, MN: APS Press.
- Cook, R.J., Adams, E., Guy, S., Huggins, D., Kennedy, A., Ruark, D., Smiley, R., Thill, D., Veseth, R., Wilkins, D., Wysocki, D., Zakarison, E. and Zenner, R. 2003 *Retooling Agriculture. A Report on Direct-Seed Cropping Systems Research in the Pacific Northwest. A Pacific Northwest Extension Publication*. Washington State University. Oregon State University. University of Idaho. In cooperation with USDA ARS and the Pacific Northwest Direct Seed Association pp.1-42
- Cook, R.J., Gabriel, C.J., Kelman, A., Tolin, S. And Vidaver, A.R. 1995. Research on plant disease and pest management is essential to sustainable agriculture. *BioScience* 45: 354-357.
- De Vallavieille-Pope C, Giosue S, Munk L, Newton AC, Niks RE, Østergård H, Pons-Kühnemann J, Rossi V, Sache I (2000): Assessment of epidemiological parameters and their use in epidemiological and forecasting models of cereal airborne diseases. *Agronomie*, 20: (7) 715-727 NOV 2000.
- Dehne, H.-W., 1997: Arbuskuläre Mykorrhizapilze als Faktoren im Integrierten Pflanzenbau. In: Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau. *Mitteilungen aus der Biol. Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft*, Heft 332, 8-15
- Hau B, Pons J (1996) Selection of populations of barley powdery mildew influenced by fungicide strategies. In: Lyr H, Russell PE, Sisler HD (eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Intercept, Andover, 357-364.
- Heier T, Pons-Kühnemann J, Kogel KH (2002) Resistenzinduktion und Fungizideinsatz – Chancen für den Ackerbau? *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. H.* 390, 341.
- Horvath H., N. Rostoks, R. Brueggeman, B. Steffenson, D.von Wettstein & A.Kleinhofs (2003) Genetically engineered stem rust resistance in barley using the Rpg1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 364-369.
- Knecht C, Pons-Kühnemann J (2002) Effekte einer großflächigen Anwendung von Benzothiadiazolen (BTH) auf die Dynamik von Populationen des Gerstenmehltaus (*Blumeria graminis* f. sp. hordei). 53. Deutsche Pflanzenschutztagung, Bonn 16-19. September 2002.
- Kruckelmann, H.W., 1975: Effects of fertilizers, soils, soil tillage and plant species on the frequency of endogone chlamydospores and mycorrhizal infection in arable soils. In. SANDERS, F.E., B. MOSSE und P.B.
- Land,S., 1990: Auftreten und Charakterisierung der vesikulär-arbuskulären (VA) Mykorrhiza in intensiv genutzten Ackerböden. *Diss. Universität Hannover*
- Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci,G., Harman, G.E. Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S. and Scala, F. 1998. Gene from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7860-7865.
- Maan, S.S. 1987. Interspecific an intergeneric hybridization in wheat. P.453-461. In E.G.Heyne (ed.) *Wheat and wheat improvement*. 2<sup>nd</sup> ed. Agron. Monogr. 13. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Mazzola, M., Wong, O.T. and Cook, R.J. 1996 Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. *Phytopathology* 86: 354-360.
- Mora, A. and Earle, E.D., 2001. Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 306-310.

- Mora, A.A. and Earle, E.D. 2001. Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Molecular breeding* 8(1): 1-9.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 125-143.
- Østergård H, Pons J (1996) Epidemic development of a barley powdery mildew population. In: *Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin*, Vol.24, Supplement, 279-283.
- Peuss, H., 1957: Untersuchungen zur Ökologie und Bedeutung der Tabakmykorrhiza. *Arch. f. Mikrobiol.* 29, 112-142
- Pons J, Balzter H, Langsdorf A, Köhler W (1998) Population Genetics: Genetic Analysis and Modelling of Natural Populations. *Progress in Botany* 59, 194-226.
- Pons J, Hau B (1992) Variation in Fungicide Sensitivity in Populations of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 24, 332-334.
- Pons J, Hau B (1996) Modelling the dynamics of fungicide sensitivity within populations of powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). In: EUR 16884 - COST 817 - Population studies of airborne pathogens on cereals as a means of improving strategies for disease control. Integrated control of cereal mildews and rusts: Towards coordination of research across Europe. (Limpert E, Finckh MR, Wolfe MS, eds.) 269-270.
- Pons J, Hau B, Köhler W (1996) Dynamics of fungicide resistance and virulence of powdery mildew populations. In: *Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin*, Vol.24, Supplement, 275-278.
- Pons J, Löwer C, Braun P, Köhler W (2000): Coevolution in Host-Pathogen Systems. *Progress in Botany. Progress in Botany*, 61, 148 – 166.
- Pons-Kühnemann J (1994) Struktur und Dynamik der Fungizidresistenz in Populationen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* bei verschiedenen Applikationsstrategien mit Triadimenol und Ethirimol. Aachen, Shaker.
- Pumphery, F.V., Wilkins, D.E., Hane, D.C. and Smiley, R.W. 1987 Influence of tillage and nitrogen fertilizer on *Rhizoctonia* root rot (bare patch) of winter wheat. *Plant Dis.* 71: 125-127.
- Remy Taylor Hass Kerp 1994. Four hundred-million-years-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *PNAS* 91, 11841-11843.
- Sanders, I. R. 2003. Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends in Plant Science* 8, 143-145.
- Simón Pérez Martínez, Rod Snowdon, Jörn Pons-Kühnemann (2004). Variability of Cuban and international Populations of *Alternaria solani* from Different Hosts and Localities: AFLP Genetic Analysis. *European Journal of Plant Pathology* (accepted).
- Smiley, R.W., Ogg, A.G.Jr. and Cook, R.J. 1991. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* root rot, growth, and yield of barley. *Plant disease* 76(9): 937-942.
- Smiley, R.W., Ogg, A.G.Jr. and Cook, R.J. 1992. Impact of sulfonylurea herbicides on *Rhizoctonia* root rot, growth, and yield of winter wheat. *Plant disease* 76(4): 399-404.
- Smith, J.D., Kidwell, K.D., Evans, M.A., Cook, R.J. and Smiley, R.W. 2003a. Assessment of spring wheat genotypes for disease reaction to *Rhizoctonia solani* AG-8 in controlled environment and direct-seeded field evaluations. *Crop Sci.* 43:694-700.
- Smith, J.D., Kidwell, K.D., Evans, M.A., Cook, R.J. and Smiley, R.W. 2003b. Evaluation of spring cereal grains and wild *Triticum* germplasm for resistance to *Rhizoctonia solani* AG-8. *Crop Sci.* 43:701-709.
- Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2741-2744
- Verma S, Varma A, Rexer K-H, Hassel A, Kost G, Sarbhoy A, Bisen P, Bütehorn B, Franken P (1998) *Piriformospora indica*, gen. nov. sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 90: 898-905
- Weller, D.M., Cook, R.J., MacNish, G., Bassett, E.N., Powelson, R.L. and Petersen, R.R. 1986. *Rhizoctonia* root rot of small cereals favored by reduced tillage in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 70: 70-73.

Wettstein D. von, G. Mikhaylenko, J.A. Froseth & C.G. Kannangara (2000) Improved barley broiler feed with transgenic malt containing heat-stable (1,3-1,4)- $\beta$ -glucanase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13512-13517.

Wettstein, D.von, J. Warner & C.G. Kannangara (2003) Supplements of transgenic malt or grain containing (1,3-1,4)- $\beta$ -glucanase to barley based broiler diets lift their nutritive value to that of corn. Brit. J. Poultry Sci. 44, 438-449.

WINTER, A.G., 1951: Untersuchungen über die Verbreitung und Bedeutung der Mykorrhiza bei kultivierten Gramineen und einigen anderen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Phytopath. Z. 17, 421-432

Wu Yongchun 2003. Transformation of barley for resistance to Rhizoctonia root rot. Ph.D. thesis. Washington State University, Department of Plant Pathology. P.1-97.

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer K., Woo, S.L., Mach R.L., Fekete, C., Lorito, M. and Kubicek, P. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of Trichoderma harzianum with its host. Fung. Genet. 26: 131-140.

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

Im Rahmen des verbundprojektes gab es eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Diter von Wettstein, Department of Crop and Soil Sciences & School of Molecular Biosciences, Washington State University, Pullman, WA USA). Prof. Horst (Universität Hannover) führte die Elementanalysen durch.

## **II. 1 Darstellung der erzielten Ergebnisse**

### **Etablierung der Metabolomanalyse für Gerste:**

Zur Optimierung bzw. Etablierung der Metabolomanalysen an Gerstenblättern wurden für die Probennahme unter Feldbedingungen, die Extraktion der Metabolite, sowie die Auftrennung und Detektion der Metabolite Routineverfahren entwickelt. Die Probennahme war für alle Metabolite gleich, wohingegen Extraktions- und Nachweisverfahren den jeweiligen Metaboliten angepasst wurden. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte detailliert beschrieben.

#### **(1) Probennahme**

Blattproben von 8 Wochen alten Gerstenpflanzen der Sorten Golden Promise und Baroness, die das heterologe Gen einer Endochitinase bzw. einer  $\beta$ -1,3-Glucanase exprimieren, sowie entsprechender Kontrollpflanzen wurden geerntet. Von je 15 Gerstenpflanzen einer Parzelle wurde jeweils ein mittlerer Blattabschnitt von ca. 15 cm geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für 10 Serien wurden nacheinander insgesamt 1200 Blätter gesammelt. Die Proben wurden dann auf Trockeneis nach Erlangen transportiert und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Die Gersteblätter einer Sammeltüte wurden im Mörser mit flüssigem Stickstoff vollständig zermahlen und unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in 2 ml Eppendorfgefäße zu ca. 50 -150 mg portioniert. Das Gewicht der gefrorenen Proben wurde mit einer Feinwaage ermittelt.

Jeder Messwert wurde aus der Bestimmung von 4 Proben gemittelt. Die so vorbereiteten Proben wurden für unterschiedliche Metabolitmessungen eingesetzt.

**(2) Zucker- und Stärkebestimmung**

Die gefrorenen Proben wurden mit 1 ml 80% EtOH vermischt und dann 1 h bei 80°C erhitzt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 13.000 U·min<sup>-1</sup> zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde zur Bestimmung der Stärke aufgehoben. Der Überstand wurde in einer Speedvac getrocknet (ca. 2 Stunden) und dann in 250 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lösung wurde kurz durchmischt, dann zwei Minuten bei 13000 U·min<sup>-1</sup> zentrifugiert und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. 4 µl der Lösung wurden für die photometrische Zuckerbestimmung eingesetzt. Hierzu wurden Glukose, Fruktose und Saccharose gemeinsam in einem gekoppelten optischen Test durch die sequentielle Zugabe von Kopplungsenzymen bestimmt. Die Messung wurden in Mikrotiterplatten mit dem 96 Well Plate Reader EL808 durchgeführt.

Die Stärkegehalte wurden durch Extraktion des bei der Gewinnung löslicher Zucker zurückbleibenden Pellets (s.o.) bestimmt. Hierzu wurde 1x mit 500µl 80% Ethanol durch vortexen gewaschen und dann 5 Minuten bei 13.000 U·min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet noch einmal mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. Zu den getrockneten Proben wurde 500 µl 0,2M KOH geben, kurz gevortext und dann bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde bei 95°C für 90 Minuten inkubiert und dann mit 1M Essigsäure neutralisiert (pH Wert ~ 7,0). Je 25 µl der neutralisierten Proben wurden mit 75 µl Amyloglucosidase (2 mg/ml Amyloglucosidase in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,2) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Schließlich wurden die Proben 5 Minuten bei 13.000 U·min<sup>-1</sup> zentrifugiert und die entstandene Glukose mittels gekoppeltem Enzymtest gemessen.

**(3) Bestimmung weiterer 22 Zuckermetabolite der Glykolyse und des Citratzyklus (Jahr 2006):**

Um einen Überblick über Veränderungen des zentralen Zuckerstoffwechsels zu erhalten wurden 22 Metabolite mittels IC/MS/MS untersucht. Hierbei wurden folgende Metabolite gemessen: Malat, Ribulose 1,5 Bisphosphat, Citrat, Isocitrat, AMP, Fructose 6-Phosphat, Glucose 6-Phosphat, Erythrose 4-Phosphat, Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerat, Pyruvat, alpha-Ketoglutarat, Succinat, ADP, UDP, Glucose 1-Phosphat, Fructose 1,6 Bisphosphat, Phosphoenolpyruvat, Sucrose 6-Phosphat, Trehalose 6-Phosphat, Glucose 1,6 Bisphosphat, Ribose 5-Phosphat,

Die gefrorenen Proben wurden mit 1ml Methanol/Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt und 10Minuten im Überkopfschüttler bei 4°C invertiert. Anschließend wurde 300 µl MilliQ-Wasser (22µm gefiltert, TOC 5-6 ppm) zugeben und gemischt. Nach einer Zentrifugation von

5 Minuten ( $13000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , Tischzentrifuge,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde die obere farblose Phase ( $600\text{-}700\mu\text{l}$  Methanol/Wasser Gemisch) in 2ml Eppendorfreaktionsgefäße übertragen und in der SpeedVac getrocknet (ca. zwei Stunden bei  $35^\circ\text{C}$ ). Der leicht gelbliche Rückstand wurde dann in  $200 \mu\text{l}$  MilliQ-Wasser gevortext. Die Lösung wurde kurz abzentrifugiert und durch Filtration gereinigt.  $10\mu\text{l}$  des Filtrats wurden schließlich für die IC/MS/MS-Analyse eingesetzt.

Für die Ionenchromatographie wurde eine ICS3000-Anlage (Fa. Dionex, Sunnyvale, CA) mit folgenden Komponenten eingesetzt: DP Dual Pump mit Vakuumentgaser, EO Eluenten Generator für einen KOH Gradienten bis  $100\text{mM}$ , CR-ATC Säule zur Eluentenreinigung, temperierbaren Autosampler AS 100 mit  $10\mu\text{l}$  Ladeschleife, Detektorcompartment mit Automation Manager-Modul, CD Leitfähigkeitsdetektor ( $0\text{-}15000\mu\text{S}$ ), Self -Regenerating-Suppressor ASRS<sup>®</sup>-Ultra II/ MS 2mm, IonPac<sup>®</sup>AS11-HC Vorsäule ( $2 \times 50\text{mm}$ ) und Trennsäule ( $2 \times 250\text{mm}$ ). Die Anlage wurde durch die Dionex Software Chromeleon VS 6.7 und DCMS-Link VS1.1 in Verbindung mit der MS Software Analyst 1.4.1. (Fa. Applied Biosystems (ABI), Darmstadt) gesteuert.

Zur Elution der Metabolite wurde ein KOH-Gradient von  $4\text{-}100\text{mM}$  KOH über einen Zeitraum von 40 Minuten bei einer Flußrate von  $0,25\text{ml} / \text{Minute}$  angelegt. Die Temperatur des Autosamplers war  $4^\circ\text{C}$ , die des Säulenofens  $35^\circ\text{C}$ . Das Injektionsvolumen betrug  $10\mu\text{l}$ . Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Methanol vermischt. Als Detektor diente die Q-Trap 3200, ein Triple-Quadrupol Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (Applied Biosystems, Darmstadt). Negative Ionen wurden durch eine Turbo V<sup>TM</sup> Elektrosprayquelle bei  $-4500 \text{ Volt}$  und einer Temperatur von  $600^\circ\text{C}$  erzeugt. Das Vorhangsgas der Ionenquelle war  $20\text{psi}$ , das Sprühgas (Gas1)  $30\text{psi}$  und das Heizgas (Gas2) auf  $20\text{psi}$  eingestellt. Die Versorgung mit ölfreiem Stickstoff wurde durch einen NGM22-Generator und einem SF4FF-Kompressor erreicht.

Anhand von  $1\text{-}10\text{mM}$  Standardlösungen (Methanol/Analyt 1:1) wurden am 1. Quadrupol (Q1) zunächst die Zerfalls-Spektren reiner Testsubstanzen (Bezugsquelle Sigma) ermittelt. Die Masse des Vorläufermoleküls und die Massen von ein oder zwei Zerfallsprodukten wurden dann ausgewählt und zum „tuning“ eingesetzt. Dabei wurde der Detektor auf die optimale Erkennung der Massen eingestellt. Die Verweildauer (dwelltime) der Ionen wurde auf  $75 \text{ msec}$  eingestellt. Die Analyse wurde schließlich im „multiple reaction monitoring“ (MRM)-Modus durchgeführt. Hierbei wird das Vorläufermolekül am ersten Quadrupol (Q1) und nach Kollision an Q2 ein ausgewähltes Tochtermolekül am Q3 detektiert. Das Signal des Massenpaares (Transition) wird schließlich als Peak aufgezeichnet. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte schließlich durch Integration der Peakflächen und Ableitung der Konzentrationen aus Standardkurven für die Reinsubstanzen im Bereich von  $0,5 - 250 \text{ pmol}$ .

#### **(4) Bestimmung von Carotinoiden und Chlorophyllen:**

Violaxanthin, Neoxanthin, Pigment 410.433.461, Antheraxanthin, Lutein, Zeaxanthin,

Transneoxanthin, Pigment 416.437.464., 464.657, Chlorophyll a, Pigment 435.462.561, Chlorophyll b, Pigment 390.410.434, Pigment 422.444.472, Alpha Carotin, Beta Carotin. Bisher nicht identifizierte Pigmente wurden mit ihren spektralen Maxima bezeichnet.

Während der Extraktion wurden die Proben in braunen Eppendorfgefäßen vor starkem Licht geschützt. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Schritte bei 4°C im Kühlraum ausgeführt. Die gefrorenen Proben wurden mit 0,4 ml Methanol in 2ml Rundboden-Eppendorfgefäßen 5 Minuten im Überkopfschüttler gemischt. Dann wurde 0,4 ml kalter Tris/NaCl Puffer (50mM Tris/HCl pH 8,0/ 1M NaCl ) zugegeben und weitere 5 Minuten invertiert. Nach Zugabe von 800 µl kaltem Chloroform wurde nochmals 5 Minuten gemischt, dann 10 Minuten geruht um eine Phasentrennung zu erhalten. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 13000 U·min<sup>-1</sup> wurde die untere chloroformhaltige Phase (800 µl) in neue braune Eppendorfgefäße überführt und die obere Phase mit weiteren 400 µl Chloroform extrahiert. Schließlich wurden beide unteren Phasen vereinigt und in der Speedvac ohne Heizung getrocknet (ca. 20 Minuten). Die getrockneten Rückstände wurden bis zur HPLC-Analyse bei -20°C aufbewahrt. Für die Analyse wurde das Material in 400 µl HPLC Puffer B (Methanol:Acetonitril:Isopropanol:Wasser (73:20:5:2)) gelöst. Unlösliche Partikel wurden durch kurze Zentrifugation sedimentiert und 100µl wurden dann in konische HPLC Analysengefäße übertragen. Schließlich wurden 20 µl der Extrakte injiziert.

Die Reversed Phased-Chromatographie wurde mit einer Ultimate 3000 Nano LC Anlage (Dionex) mit folgenden Komponenten durchgeführt: LPG-3600 Dual Gradient MicroPump, temperierbarer Autosampler WPS-3000T mit 20 µl Ladeschleife, Trennsatz: Vorsäule: Acclaim Polar Advantage (PA) C16 5 µm Guard Cartridge (4,3 x 10 mm) und Trennsäule Acclaim PA C16 5 µm, (4,6 x 150 mm). Detektor: ICS 2600 PDA Photodiodenarraydetector (Wellenlänge von 190-800 nm) Die Anlage wurde durch die Dionex Software Chromeleon VS 6.8 gesteuert. Zur Elution der Metabolite wurde ein trimärer Gradient aus Wasser gegen ein Gemisch aus Methanol, Acetonitril, Isopropanol, Wasser (73:20:5:2) und einem Gemisch aus Methanol, Ethylacetat (68:32) eingesetzt. Der Gradient wurde über einen Zeitraum von 40 Minuten bei einer Flußrate von 0,5 ml / Minute angelegt. Die Temperatur des Autosamplers war 4°C, die des Säulenofens 24°C. Das Injektionsvolumen betrug 20µl. Zur Auswertung wurde die Absorption bei 450 nm herangezogen. Zur Verifizierung der Pigmente wurden die Retentionszeiten von Reinsubstanzen sowie die pigmentspezifischen 3D-Absorptionsspektren ausgewertet. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte schließlich durch Integration der Peakflächen bzw. durch Ableitung der Konzentrationen aus Standardkurven für die Reinsubstanzen Violaxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Antheraxanthin,  $\beta$ -Carotin und  Carotin im Bereich von 20-400 pmol.

##### (5) Bestimmung organischer Stickstoffverbindungen

Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, Gly, His, Thr, Arg, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Lys, Leu, Phe,

## Gaba, Ammonium

Zur Bestimmung der Aminosäuren wurden dieselben ethanolischen Extrakte wie zur Bestimmung der Zucker verwendet (s.o.). Durch Derivatisierung mit dem fluoreszierenden Reagenz Aminoquinolyl-N-hydroxysuccimidyl carbamat (ACQ) wurden die Aminosäuren und Standards unmittelbar vor der Messung für die Detektion vorbereitet. Zur Vorbereitung des ACQ-Reagenz wurden je 100 Proben 3 mg gelbliches ACQ-Pulver in 1ml Acetonitril gelöst und 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Dabei wurde nach jeweils 3 Minuten invertiert. Je Probe wurden 10 µl des ethanolischen Extraktes mit 10 µl des kalten vorbereiteten ACQ-Reagenz und 80 µl 0,2 M Borsäure pH 8,8 in einem Eppendorfgefäß vermischt und 10 Minuten bei 55°C erhitzt. Schließlich wurden die Präparate nach einer kurzen Zentrifugation (eine Minute bei 13000 U·min<sup>-1</sup>) in konische HPLC Gefäße überführt

Die Reversed Phased-Chromatographie wurde mit einer Summit HPLC (Fa. Dionex) mit folgenden Komponenten durchgeführt: Pumpe P680HPG (Edelstahl), Säulenofen (TCC-100), Autosampler ASI 100T (temperierbar) mit 200µl Ladeschleife, A/D-Wandler UCI-50, Fluoreszenz Detector RF2000, Trennsatz: Trennsäule:Reversed Phase Luna C18(2) 5 µm, 250x4,6 mm und Vorsäule: Gemini C18, 3.1-8,0 ID (Fa. Phenomenex) . Steuersoftware: Chromeleon VS 6.7. Zur Elution der Aminosäuren wurde ein trimärer Gradient aus Puffer A (140 mM Natrium Acetate pH / 7 mM Triethanolamin (pH 6,2), Puffer B (Acetonitril) und Eluent C (MilliQ-Wasser) verwendet. Der Gradient wurde über einen Zeitraum von 40 Minuten bei einer Flußrate von 1,0 ml / Minute angelegt. Anfangsdruck: 90bar. Die Temperatur des Autosamplers war 10°C, die des Säulenofens 37°C. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl für unbekannte Proben und 10 µl für Standards. Die Detektorparameter waren wie folgt: Anregungs- / Emissionsfrequenz 300nm/ 400nm, mittlere Sensitivität, Gain 4.0, Response 0,5. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte schließlich durch Integration der Peakflächen bzw. durch Ableitung der Konzentrationen aus Standardkurven für die Reinsubstanzen im Bereich von 4-200 nmol.

### (6) Bestimmung von alpha und gamma-Tocopherol

Die gefrorenen Pulver wurden mit 0,5ml Methanol in 2ml Rundboden-Eppendorfgefäßen 30 Minuten im Eppendorf-Thermomixer geschüttelt (1400 U·min<sup>-1</sup>, 30°C). Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten (14000 U·min<sup>-1</sup>) wurde der Überstand aufgehoben und das Sediment noch zwei weitere Male mit je 250 µl Methanol extrahiert. Die vereinigten Überstände (1ml) wurden schließlich noch einmal 3 Minuten zentrifugiert (14000 U·min<sup>-1</sup>) und dann bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Zur Trennung der Tocopherole wurde eine Reversed Phase-Chromatographie auf einer Summit HPLC mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 1.0 ml / Minute für 30 Minuten durch einen isokratischen Gradient aus Methanol und Acetonitril im Verhältnis 1:1. Weitere

Parameter waren: Autosamplertemperatur 4°C, Säulenofens 30°C. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl für unbekannte Proben und 10 µl für Standards. Detektorparameter waren wie folgt: Anregungs-/Emissionsfrequenz 290 nm/ 325 nm, mittlere Sensitivität, Gain 4.0, Response 0,5. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte schließlich durch Integration der Peakflächen bzw. durch Ableitung der Konzentrationen aus Standardkurven für die Reinsubstanzen im Bereich von 1-20 ng/ml.

#### (7) Bestimmung von Thiolen:

Die gefrorenen Pulver wurden mit 1,0 ml 0,1M Salzsäure in 2 ml Rundboden-Eppendorfgefäßen vermischt und dann 15 Minuten im Eis inkubiert. Dabei wurde alle 2 Minuten gevortext. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten ( $14000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ ) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß übertragen und dann noch einmal für 10 Minuten zentrifugiert. Wegen der hohen Oxidationsempfindlichkeit der Thiole wurden Aliquots von 50µl in braune Eppendorfgefäße übertragen und sofort zur Derivatisierung mit dem fluoreszierenden Reagenz Monobrombiman (MBB) eingesetzt. Dabei wurde MBB an die SH-Gruppen der Thiole gekoppelt.

Zur Bestimmung des Gehaltes oxidiertes Thiole wurden zunächst die reduzierten Thiole an ihren SH-Gruppen irreversibel mit N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Dazu wurden je 50 µl Extrakt mit 50 µl 90 mM NaOH und 160 µl NEM-Mix (125 mM Tris pH 8.0, 0,3 mM NEM) vermischt und 10 Minuten im Eis inkubiert. Die nicht blockierten, oxidierten Thiolgruppen wurden dann mit 10 µl 10 mM DTT für 60 Minuten bei 24°C reduziert.

Zur Bestimmung des Gesamt-Gehaltes von Thiolen (oxidierte und reduzierte Formen) wurden diese zunächst alle in die reduzierte Form überführt. Dazu wurden je 50 µl Extrakt mit 50 µl 90 mM NaOH und 170 µl DTT-Mix (117,6 mM Tris pH 8.0, 0,6 mM DTT) vermischt und wie oben 60 Minuten bei 24°C inkubiert.

Zur Kopplung mit MBB wurden die Ansätze (270 µl) mit 20 µl 10 mM MBB für 10 sec gevortext, kurz abzentrifugiert und dann 15 Minuten im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Durch Zugabe von 70 µl 5% iger Essigsäure und 10sec vortexen wurde die Reaktion gestoppt. Abschließend wurde 5 Minuten zentrifugiert ( $13000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4°C). Die Überstände wurden durch folgende Chromatographie analysiert.

Zur Trennung der Thiole wurde eine Reversed Phase-Chromatographie auf einer Summit HPLC mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt. (wie oben: Bestimmung von Aminosäuren) Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 1.0-0,8 ml / Minuten für 40 Minuten durch einen trimären Gradient aus (A) 100 mM Kaliumacetat (pH5,5), (C) H<sub>2</sub>O und (D) Methanol wie folgt: 0 Minuten 11% D, 89% A, 1,0 ml / Minuten; 18 Minuten 11% D, 89 % A; 20 Minuten 25 % D, 75 % C, 0,8 m / Minuten; 23 Minuten 65 % D, 35 % C; 24 Minuten 100 % D; 30 Minuten 100% D; 33 Minuten 11% D, 89 % A, 1,0 ml / Minuten; 40 Minuten 11 % D, 89 % A.

Weitere Parameter waren: Autosamplertemperatur 4°C, Säulenofen 37°C. Injektionsvolumen 100 µl für unbekannte Proben und 10 µl für Standards. Detektorparameter: Anregungs-/Emissionsfrequenz 380 nm/ 480 nm, mittlere Sensitivität, Gain 4.0, Response 0,5. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte schließlich durch Ableitung der Konzentrationen aus Standardkurven für die Reinsubstanzen Glutahion, L-Cystein- und  $\alpha$ -Glutamylcystein im Bereich von 2-100 pmol.

#### **(8) Bestimmung von Ascorbat**

Die gefrorenen Proben wurden in 2ml Eppendorfgefäßen 2 mal 10 sec mit 1,1 ml 5 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure gevortext und dann 5 Minuten zentrifugiert (13.000 U·min<sup>-1</sup>, 4°C). Der Überstand wurde 1:1 mit 150 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer (pH 7.4) verdünnt und dann 5 Minuten im Eis inkubiert. Der pH der Lösung wurde mit 10 M NaOH auf 5,5-6,5 eingestellt. Zur Bestimmung von reduziertem Ascorbat wurden 200µl der neutralisierten Extrakte nacheinander mit folgenden Reagenzien vermischt: 100 µl MilliQ-Wasser, 200  $\mu$ l 10 % (w/v) TCA, 200  $\mu$ l 44 % (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 200  $\mu$ l 4 % (w/v) 2,2'-Dipyridyl gelöst in 70 % (v/v) Ethanol und 100  $\mu$ l 3 % (w/v) FeCl<sub>3</sub>.

Zur Bestimmung von Gesamtascorbat wurden 200µl der neutralisierten Extrakte anstelle der Zugabe von 100µl MilliQ-Wasser durch Zugabe von 50µl DTT (10mM) reduziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 50  $\mu$ l 0.5 % (w/v) N-ethylmaleimid und dann die übrigen Reagenzien wie oben zugegeben. Schließlich wurden alle Proben 60 Minuten bei 30°C inkubiert und die rötliche Verfärbung bei 525 nm im Uvikon Zweistrahlphotometer (Fa. Goebel, Steuersoftware Labpower Junior) vermessen. Der Ascorbatgehalt wurde anhand einer Standardkurve errechnet, die mit frisch angesetzten Ascorbat-Standards erstellt wurde.

#### **(9) Erstellung metabolischer Fingerprints aus Gerstepflanzen**

Im letzten Berichtszeitraum wurde eine neue und effiziente Methode etabliert, die es uns erlaubt ungerichtete Metabolitprofile von Gerstenblättern zu erstellen. Der Vorteil des multivariaten Ansatzes besteht in der weitgehenden Unabhängigkeit von Standardsubstanzen und der Möglichkeit zur Entdeckung unbekannter Biomarker. Durch die Analyse einer möglichst großen Zahl von Metaboliten ergibt sich ein erweiterter Blickwinkel auf eventuell vorhandenen Verschiebungen im Stoffwechsel der Pflanzen, die z.B. durch Genveränderungen oder den Einfluss einer Mykorrhizierung hervorgerufen werden.

Wie im letzten Berichtszeitraum für die Analyse zum gerichteten Profiling beschrieben, wurden hierfür wiederum je 4 Perchlorsäureextrakte jeder der 8 Gerstevarianten zunächst mit der oben beschriebenen Ionenchromatographiemethode getrennt. Weiterhin wurden die Metabolite der Eluate dann wieder durch Elektrospray ionisiert, nun aber nicht absichtlich fragmentiert, sondern in den Full Scan Modi Q1 bzw. EMS (Enhanced-MS, Einsatz der

Ionenfalle) im QTrap3200 Massenspektrometer analysiert. Ziel des Scans war es eine größtmögliche Zahl von Metaboliten anhand ihrer Massenpeaks zu detektieren um daraus eine globale, bzw. möglichst ungerichtete Bewertung von Metabolitverschiebungen zu ermöglichen.

Von den beiden möglichen MS-Scanmethoden Q1 und EMS war zunächst nur die erste Methode erfolgreich. In Vorexperimenten zur Ermittlung optimaler Ionenquellenparameter wurde gefunden, das sich das Profil zur Gesamtionenausbeute (TIC) vor allem durch die Variation des Parameters zum Declusteringpotential (DP) verändern lässt (Abb.3). Vorexperimente mit DP -15, -20, -35, -40 und -60 wurden dementsprechend durchgeführt. Eine Kontrollprobe mit Wasser zeigte wie erwartet nur ein flaches Profil des Hintergrundrauschens.

Anhand der vierfach wiederholten Injektion eines Extrakts wurde die technische Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt.

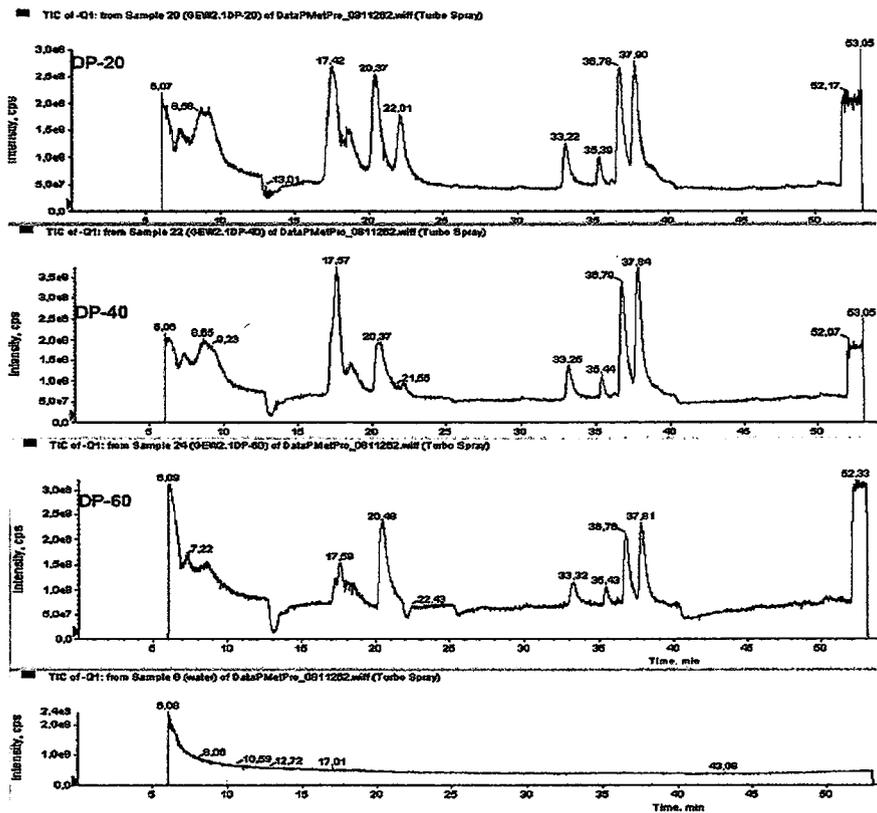


Abb. 3 ESI/MS Q1-Scans eines Gerste Extraktes mit verschiedenen Declustering-Potentialen, Gesamt-Ionen Ausbeute (TIC): von oben nach unten: DP 20, 40 und 60 Volt, Wasserkontrolle

Die in Vorversuchen erarbeiteten, optimalen Parameter für die Ionenquelle des Massenspektrometers waren wie folgt: Negative Ionisation (-4500V), Declusteringpotential 20 Volt, Massenbereich 60-610 amu, Scanrate 1 Scan/ sec über 80 min, Eingangspotential -6 V (Start) und -4V (Stop), Kollisoinzellen Eingangs- bzw. Ausgangspotential -13,876V, Vorhanggas 20psi, Gas1 30psi, Gas2 20psi, Interfaceheizer an. Zur Prozessierung der MS-

Daten, Peak-Extraktion und -Alignment wurde wiederum die MarkerView™ Software Version 1.2.0.1. eingesetzt. Im Gegensatz zum gerichteten Profiling wurden nun aber die Rohdaten der Massenspektrometer Software Analyst™ direkt importiert (Rechenzeit ca. 60min für 30 Proben). Zur sinnvollen Darstellung von Ausgabeplots musste bereits beim Import die randomisierte Probenreihenfolge geordnet werden. Zum Auffinden geeigneter Einstellungswerte der Software für den Datenimport wurden Test- Basislinienkorrekturen und -Alignments über einen Zeitraum von 10min anhand einer Qualitätskontrollprobe (QC) {Bijlsma, 2006 #17} durchgeführt. Die gefundenen Parameter wurden schließlich zur Extraktion von Massenspuren für ein Fenster von 6,2 bis 53min nach Probeninjektion angewendet, da nur während dieser Zeit der Eluentenstrom zum Detektor geleitet wurde. Zur Reduzierung des Hintergrundrauschens wurde der Schwellenwert auf 5 für ein Offset von 10 Scans bei einem Multiplikationsfaktor von 1,3 gesetzt. Die minimale spektrale Peakbreite war 1 amu, die minimale bzw. maximale Peakbreite für die Retentionszeit wurde auf 2 bzw. 300 Scans gesetzt. Für das Alignment wurde die Retentionszeittoleranz auf 0,75min bei einer Massentoleranz von 1 amu gesetzt. Die maximale Zahl der extrahierten Massenpeaks wurde auf 500 begrenzt, wobei durch eine Erhöhung z.B. auf 1000 Peaks keine zusätzlichen Massenpeaks lieferte. Die Retentionszeitkorrektur wurde anhand des in allen Proben mitgeführten internen Standards Pipes (m/z 301,1; RT 16,6 min; 4,76µM) durchgeführt. Die importierten Werte wurden schließlich über den Einwaagefaktor der Proben und über den internen Standard normalisiert. Die Retentionszeitabweichungen gefundener Massenpeaks wurden ebenfalls über den internen Standard korrigiert.

Mit den extrahierten Massenpeaks wurden schließlich Cluster- und Hauptkomponentenanalysen durchgeführt. Anhand der mit MarkerView™ errechneten Beladungsplots und den abgeleiteten Peak-Intensitäts-Profilen wurden die erhaltenen Datensätze „bereinigt“: Die Wasserkontrollproben, fehlerhaft zentrierte Peaks (Abb.4), sowie Massenpeaks mit Werten in weniger als 2 Proben wurden eliminiert. Für die verbliebenen Massen wurde dann die Mittelwerte der 4 biologischen Replikate berechnet und damit erneut eine Hauptkomponenten bzw. eine Clusteranalyse durchgeführt.

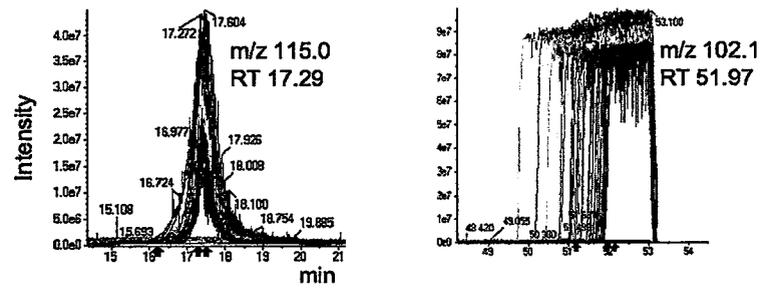


Abb.4 „Peak picking“ / Zentrierung zur Erstellung metabolischer Fingerprints  
Im linken Bild wurde die Massenpeaks 115.0 m/z aller Proben bei 17.29 Minuten richtig zentriert (roter Pfeil). Der Massenpeak 102 m/z bei 51,97 min wurde nicht richtig zentriert und folglich aus den multivariaten Analysen eliminiert.

## Analyse transkriptioneller Unterschiede zwischen transgenen Gerstenpflanzen und untransformierten Kontrollpflanzen unter Feldbedingungen

Um den Einfluss der Einführung eines zusätzlichen Gens in zwei verschiedene Gerstenkultivare auf die Genexpression zu untersuchen, wurde mit Probenmaterial vom Feldversuch 2007 Transkriptprofile aufgenommen und ausgewertet. Dabei wurden transgene Pflanzen, die entweder eine Glucanase oder eine saure Chitinase im Kultivar Baroness bzw. Golden Promise exprimieren, im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Pflanzen analysiert. Zusätzlich wurden Proben analysiert, die mit dem Mykorrhiza-Pilz *Glomus mosseae* behandelt wurden.

Für diese Analysen wurde ein Gerstenarray verwendet, der von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Fa. Agilent entwickelt wurde. Im Vergleich zu dem kommerziell verfügbaren Affymetrix-Microarray (Barley1) wurde dabei eine deutlich höhere Anzahl von EST-Sequenzen in die Analyse einbezogen. Während der von Affymetrix angebotene Array auf 238.350 EST Sequenzen beruht und im Jahr 2003 zusammengestellt wurde, haben wir die in den letzten Jahren deutlich gestiegene Anzahl von ESTs berücksichtigt und alle derzeit verfügbaren 444.652 EST Sequenzen (<http://www.harvest-web.org>) in die Analyse einbezogen. Die 444.652 ESTs konnten in 28.001 Konsensus-Sequenzen und 22.937 Singletons assembliert werden, die auf der HarvEST-Webseite verfügbar sind. Um die Anzahl der falsch-positiven Sequenzen sowie Verunreinigungen einzuschränken wurden für das Oligo-Design alle Konsensus-Sequenzen einbezogen und die Singletons, die einen signifikanten Blastx-Treffer (E-Value < E-10) in Arabidopsis oder Reis ergeben haben (13.265). Von diesen Sequenzen wurde mit Hilfe des von Agilent zur Verfügung gestellten web-basierten Analyse-Tools (<http://earray.chem.agilent.com/earray>) 41.196 60mer Oligonukleotide abgeleitet. Um den verfügbaren Platz von ca. 42K Oligonukleotiden („features“) effizient auszunutzen, wurden die Arrays durch zufällig ausgewählte Sequenzen aufgefüllt, so dass ca. 2600 Oligonukleotide doppelt gespottet wurden, und als zusätzliche interne Kontrollen dienen können. Der Array wird im 4x44K-Format gespottet.

Für die Erstellung der Transkriptprofile wurde die RNA von mindestens 2 Replikaten isoliert. Das Blattmaterial stammt vom Feldversuch, der 2007 durchgeführt (und vernichtet) wurde. Nachfolgend sind die entsprechenden Proben und die Anzahl der entsprechenden Replikate aufgeführt:

Probe	Bezeichnung	Genotyp	Anzahl der Replikate
Golden Promise	GP	Wildtyp	2
Golden Promise	ChGP	Transgen	2

Chitinase			
Golden Promise + Mykorrhiza	GP+	Wildtyp	2
Golden Promise Chitinase + Mykorrhiza	ChGP+	Transgen	3
Baronesse	B	Wildtyp	2
Baronesse Glucanase	GluB	Transgen	3
Baronesse Mykorrhiza	+ B+	Wildtyp	4
Baronesse Glucanase + Mykorrhiza	GluB+	Transgen	3

Die Integrität der RNA wurde mittels Bioanalyzer überprüft und je 0,5 mg RNA für die cDNA Synthese, die Markierung mit Cy3-Fluoreszenzfarbstoff und die anschließende cRNA-Synthese und Amplifizierung eingesetzt. Nach Reinigung und Quantifizierung des Einbaus von Cy3 und der cRNA-Menge wurden je 1.65µg cRNA für die Hybridisierung eingesetzt, die für genau 17h erfolgte. Anschließend wurden die Arrays gewaschen, gescannt und die Signalintensitäten der „features“ mittels der *Feature extraction* - Software extrahiert. Für die weitere Analyse der Daten wurde die Software *GeneSpring* verwendet. Zunächst wurden die Arrays pro Chip und Gen normalisiert.

Die normalisierten Daten wurden mittels „Condition tree“ analysiert, um zu überprüfen wie sich die einzelnen Replikate verhalten bzw. die unterschiedlichen Genotypen „clustern“. Wie in Abb. 5 zu erkennen ist „clustern“ die Replikate des entsprechenden Genotyps zusammen. Auffällig ist außerdem, dass sich die beiden Kultivare deutlich stärker voneinander abgrenzen, als die transgenen Linien von dem entsprechenden Wildtyp.

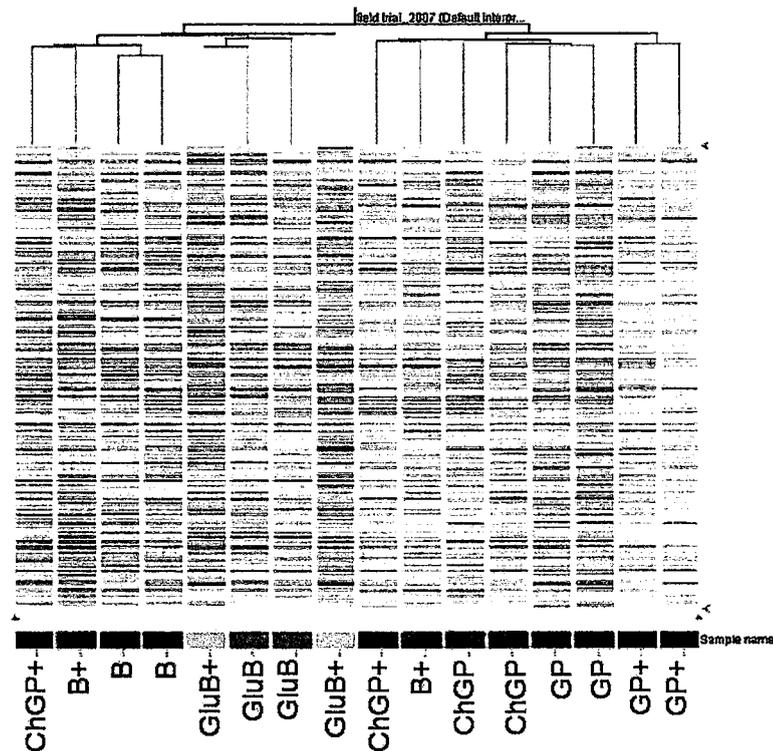


Abb.5 „Condition tree“ der untersuchten Gerstenpflanzen.

Analysiert wurden alle gespotteten „features“, wobei eine Standard Korrelation zugrunde gelegt wurde. B, cv. Baronesse; GluB, Glucanase exprimierende Pflanzen (Hintergrund cv. Baronesse); GP, cv. Golden Promise; Ch, Chitinase exprimierende Pflanzen (Hintergrund cv. Golden Promise), + Mykorrhizza

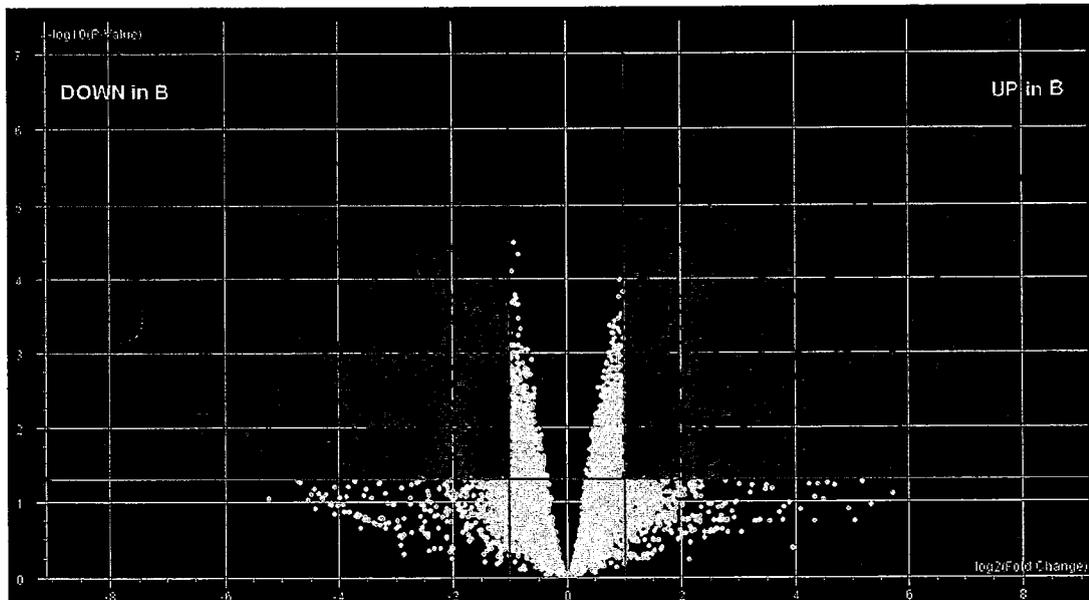
Im nächsten Schritt wurden dann die „features“ herausgefiltert, die als abwesend markiert sind oder den Qualitätskriterien nicht genügen (ca. 34.500). Von den verbliebenen ca. 34.500 „features“ wurden 18.836 identifiziert, die einen mindestens zweifachen Unterschied im Expressionsniveau in einen der untersuchten Genotypen bzw. Bedingungen aufwiesen.

Basierend auf den differentiell exprimierten Genen wurden folgende Vergleiche durchgeführt und statisch ausgewertet.

#### Vergleich verschiedener Genotypen

1. cv. Baronesse (B,) vs. cv. Golden Promise (GP, wt)
2. cv. Baronesse (wt) vs. Glucanase B (GluB; transgen)
3. cv. Golden Promise (wt) vs. Chitinase (Ch; transgen)

Dazu wurde ein Volcano Plot erstellt, der erlaubt nach statistisch signifikanten Unterschieden und nach x-fachen Veränderungen im Expressionsniveau zwischen zwei Bedingungen zu filtern. Wir haben die Gene mit einem mind. 2fachen Unterschied in der Expressionsstärke bei einem p-Value von 0.05 (5% falsch-positive Werte) ermittelt. Der Vergleich der beiden Wildtyp-Kultivare ist beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb. 6** Genexpression im cv. Baronesse (B) im Vergleich zum cv. Golden Promise (GP). Statistisch signifikante Gene, die sich 2fach im Expressionsniveau unterscheiden wurden mittels Volcano Plot identifiziert. Die Analyse basiert auf 18.836 „features“. Aufgetragen ist die Stärke der Genexpression der einzelnen „features“ (Gens) ( $\log_2$  des „fold change“) gegen den entsprechenden p-Value ( $-\log_{10}$ ). Signifikant differentiell exprimierte Gene sind rot gekennzeichnet.

Die Daten wurden durch Anwendung des „Benjamini-Hochberg false discovery“ Tests korrigiert. In der folgenden Tabelle ist die Anzahl der signifikant unterschiedlichen Gene für die verschiedenen Vergleiche aufgelistet.

Vergleich	Anzahl differentieller Gene	Anzahl hoch-regulierter Gene	Anzahl runter-regulierter Gene
1. B vs. GP (wt)	1333	565	768
2. B vs. GluB	58	22	34
3. GP vs. Ch	0		

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Wildtyp-Pflanzen der Kultivare Baronesse und Golden Promise in der Expression von 1333 Genen unterscheiden. Dabei ist auffällig, dass im Kultivar Golden Promise besonders viele Gene im vgl. zum Kultivar Baronesse exprimiert sind, die auf Infektion mit pilzlichen Pathogenen hindeuten. Übereinstimmend damit zeichnet sich das cv. Baronesse durch eine verstärkte Expression von Abwehr-relevanten Genen wie z.B. PR-Genen oder Mla7 aus. Insgesamt ist aber die Funktion der meisten differentiellen Gene nicht bekannt (annotiert als „unknown“ bzw. als „transcribed locus“)

Hingegen scheint das Einführen eines zusätzlichen Gens in transgenen Pflanzen nur einen sehr geringen bzw. keinen Effekt auf die Expression der endogenen Gene auszuüben.

Insgesamt unterscheiden sich die Kultivare deutlich stärker voneinander als die transgenen Pflanzen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

### **Einfluss der Mykorrhizierung auf die Genexpression des entsprechenden Genotyps**

4. cv. Golden Promise (GP) vs. Golden Promise + Mykorrhizza (GP+)

- 5. cv. Baronesse (B) vs. Baronesse + Mykorrhizza (B+)
- 6. cv. Chitinase (ChGP) vs. Chitinase + Mykorrhizza (ChGP+)
- 7. cv. Glucanase B (GluB) vs. Glucanase B + Mykorrhizza (GluB+)

Um differentielle Gene zu ermitteln wurde jeweils ein Volcano Plot erstellt mit den entsprechenden Bedingungen erstellt. Es wurden Genen gefiltert, die einen mind. 2fachen Unterschied in der Expressionsstärke bei einem p-Value von 0.05 (5% falsch-positive Werte) ermittelt. Die Daten wurden durch Anwendung des „Benjamini-Hochberg false discovery“ Tests korrigiert. In der folgenden Tabelle ist die Anzahl der signifikant unterschiedlichen Gene für die verschiedenen Vergleiche aufgelistet.

Vergleich	Anzahl differentieller Gene	Anzahl hoch-regulierter Gene	Anzahl runter-regulierter Gene
4. GP vs GP+	4	3	1
5. B vs. B+	0		
6. ChGP vs. ChGP+	0		
7. GluB vs. GluB+	0		

Basierend auf den Daten der vergleichenden Analyse ergibt sich, dass Mykorrhizierung einen nur geringen (im Fall von Golden Promise) bzw. keinen Einfluss (die übrigen Genotypen) auf die Genexpression in Blättern besitzt.

**Verifizierung der Kultivar-spezifischen Genexpression mittels qPCR**

Wie oben dargestellt, konnte bei der Transkriptomanalyse eine Genotyp-spezifische Expression einer Reihe von Genen nachgewiesen werden. Um dies unabhängig zu bestätigen, wurden jeweils vier Gene, die entweder in Golden Promise oder Baronesse erhöht exprimiert wurden, für eine quantitative PCR Analyse ausgewählt. Für die PCR wurden basierend auf den verfügbaren Sequenzdaten Oligonukleotide abgeleitet, die für die qPCR verwandt wurden. In den folgenden Tabellen sind die Primereffizienzen und die ausgewählten Gene zusammengefasst. Als Referenz wurde das Ubiquitingen (AK252410.1) verwendet, welches eine Effizienz von 103,8 % und einen Correlationsfaktor von 0,943 aufwies. Mit Ausnahme der Primerkombinationen für ein uncharakterisiertes Protein, (p35\_27344) welches in Golden Promise hochreguliert ist, waren die erzielten Primereffizienzen für die anschließende qPCR Analyse ausreichend.

**(1) Hoch regulierte Genen in cv. Baronesse**

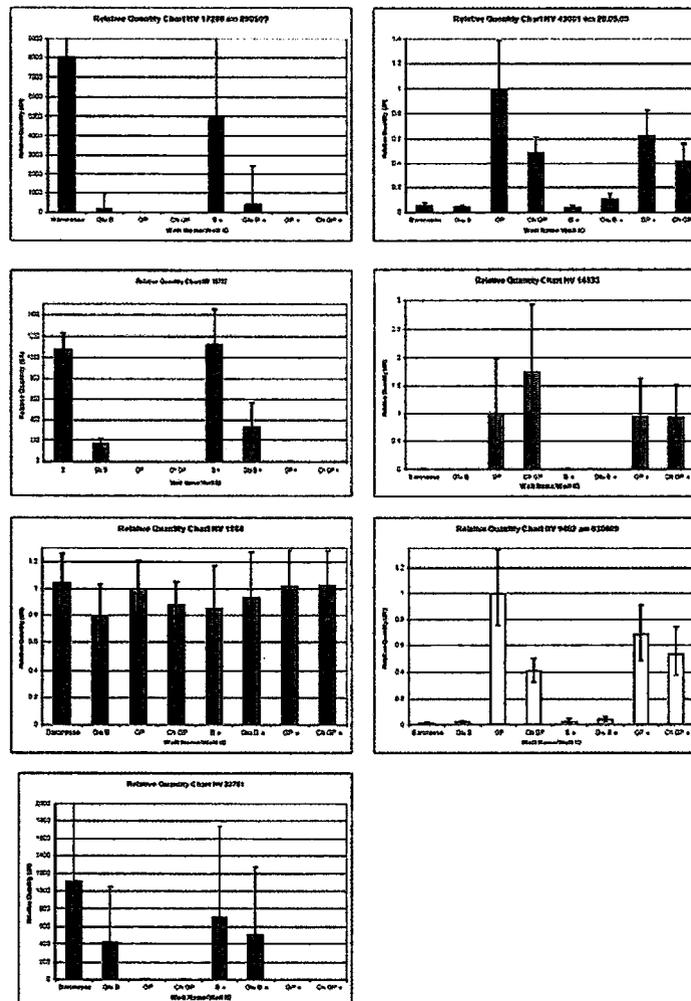
Bezeichnung ID	Effizienz (%)	Correlations - Factor	Bester BlastX Hit
p35_18644	118,4	0,951	Putative Dephospo-CoA kinase (Os01g03660600), <i>Oryza sativa</i> Japonica
p35_17288	110,2	0,997	PR4, <i>Triticum monococcum</i>

p35_22781	103,2	0,978	Uncharacterized protein, <i>Oryza sativa</i> Japonica
p35_19737	95,6	0,996	MLA7, <i>Hordeum vulgare</i>

(2) Hoch regulierte Genen in cv. Golden Promise

Bezeichnung	Effizienz (%)	Correlationsfaktor	Bester BlastX Hit
p35_14133	89,8	0,997	Thaumatococin-like Protein TLP5, <i>Hordeum vulgare</i>
p35_27344	165,2	0,945	Uncharacterized protein, <i>Oryza sativa</i> ; putative cytochrome P450 Protein
p35_9462	93,7	0,995	Protein ent-kaurene synthase, chloroplast precursor, putative, <i>Oryza sativa</i>
p35_43061	100,2	0,996	Uncharacterized protein, <i>Oryza sativa</i> Japonica ; putative cytochrome P450 Protein

Nach Überprüfung der Primereffizienz wurde zunächst eine qPCR mit den RNA-Proben, die für die Array Analysen verwandt wurden, durchgeführt. Hierbei wurden die im Array ermittelten Ergebnisse weitestgehend bestätigt. Anschließend wurde die Expression in drei weiteren Replikaten unabhängig überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst. Mit Ausnahme der putativen Dephospho-CoA Kinase (Identifiziert: p35\_18644) konnten die erwarteten Expressionsprofile reproduziert werden. Das Gen p35\_18644 zeigt ein uniformes Expressionsmuster in allen Proben.



### **Abbildung 7: qPCR Analyse Sorten-spezifisch exprimierter Gene.**

**Fazit:** Globale Transkriptomanalysen ergaben signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen Golden Promise und Baronesse. Demgegenüber können Transgen-bedingte bzw. Mykorrhiza-induzierte Unterschiede in der Genexpression kaum nachgewiesen werden. Einzig der Vergleich zwischen Baronesse und der transgenen Glucanase exprimierenden Linie ergab eine unterschiedliche Expression von 58 Genen. Dieser Unterschied ist vermutlich aber nicht auf Transgeneffekte zurückzuführen, sondern auf die Tatsache, dass die ursprüngliche Transformation des Glucanasegens im Kultivar Golden Promise erfolgte. Anschließend wurde das Transgen durch mehrere Kreuzungen in den Baronesse Hintergrund transferiert. Offensichtlich war der Transfer ziemlich erfolgreich, aber nicht hundertprozentig. Dieses Ergebnis belegt die Eignung des Testsystems auch marginale Unterschiede detektieren zu können.

### **Analyse metabolischer Unterschiede zwischen transgenen Gerstenpflanzen und untransformierten Kontrollpflanzen unter Feldbedingungen.**

Die Analyse metabolischer Unterschiede zwischen den untersuchten Pflanzen unter Feldbedingungen stellt einen Kernpunkt im Arbeitsprogramm des Verbundvorhabens dar. Durch den Einsatz von bekannten sowie neu entwickelten Methoden gelang es unserer Gruppe einen Einblick in den primären und sekundären Stoffwechsel der transgenen Gerstepflanzen zu erhalten. Dabei wurden Unterschiede im Zucker- und Aminosäurestoffwechsel, in den oxidativen Schutzsystemen, den zur Photosynthese wichtigen Blattpigmenten und den Schlüsselkomponenten der Glykolyse und des Citratcyclus erfasst.

Um dies zu erreichen wurde zunächst eine gezielte Analyse und Quantifizierung der Gehalte von 72 Metaboliten durchgeführt. Dazu wurden in den Jahren 2006 und 07 insgesamt 3360 Blattproben geerntet, wovon 1440 analysiert wurden. Aus zehn verschiedenen Extrakten wurden mittels enzymatischer Tests (Photometrie), Ionenchromatographie (Massenspektrometrie), C18-Reversed Phase Chromatographie (Fluoreszenzdetektion), C16-Reversed Phase Chromatographie (DAD-3D Spektrometrie) und einem Elementaranalysator incl. Kontrollen ca. 12000 Daten generiert.

Um eine globale Aussage über die Unterschiede zwischen den Pflanzen zu erhalten, wurden parallel zur Quantifizierung der ausgewählten Metabolite metabolische Fingerabdrücke der einzelnen Pflanzenlinien erarbeitet. Für diese ungerichtete Metabolitanalyse wurden die Profile von einer großen Zahl unbekannter Metabolite anhand ihrer Molekülmassen erstellt und dabei ca. 13000 weitere Daten erzeugt.

Neben dem Feldversuch wurde als Kontrollelexperiment die Chitinase transgene Golden Promise auch im Gewächshaus kultiviert. Hierbei wurde zusätzlich der Einfluss einer Phosphatdüngung studiert. Auch hierfür wurde eine Metabolomanalyse erstellt und die Ergebnisse mit dem Freilandversuch verglichen.

Neben mykorrhiza-bedingten Einflüssen wurden sowohl im Freiland- als auch im Gewächshausexperiment, wie erwartet, sortenspezifische Unterschiede zwischen den Pflanzen gefunden. Phosphatdüngungseffekte an den Gewächshauspflanzen wurden ebenfalls festgestellt.

## Ergebnisse zu den Feldversuchen der Jahre 2006 und 2007

### a) Gezielte Metabolitanalyse

Im Folgenden sind die Ergebnisse zum zentralen Zuckerstoffwechsel (Abb. 8-10), zum Aminosäurestoffwechsel (Abb. 12) zum Oxidationsschutz (Abb. 13 und 14) zu den Pigmenten (Abb. 16 und 30) und den Metaboliten der Glykolyse und des Citratcyclus (Abb. 16) schematisch zusammengefasst.

#### Untersuchungen zum zentralen Zuckerstoffwechsel:

In den Jahren 2006 und 2007 sind weder in den Gehalten löslicher Zucker (Glukose, Fruktose und Saccharose) oder Stärke (Abb. 8), noch bei Intermediaten des oxidativen Pentosephosphat- bzw. des Saccharosebiosynthese-Wegs (Abb. 10) signifikante transgen-bedingte Unterschiede zu beobachten. Im Jahr 2007 sind die Glucosegehalte der Chitinase exprimierenden Golden Promise gegenüber dem Wildtyp im Mittel zwar um ca. ein Drittel erniedrigt, außerdem sind die Saccharosegehalte in beiden mykorrhizierten transgenen Linien gegenüber den untransformierten Vergleichspflanzen etwa verdoppelt. Wegen der hohen Standardfehler sind die beobachteten Metabolitverschiebungen für die löslichen Zucker aber nicht signifikant.

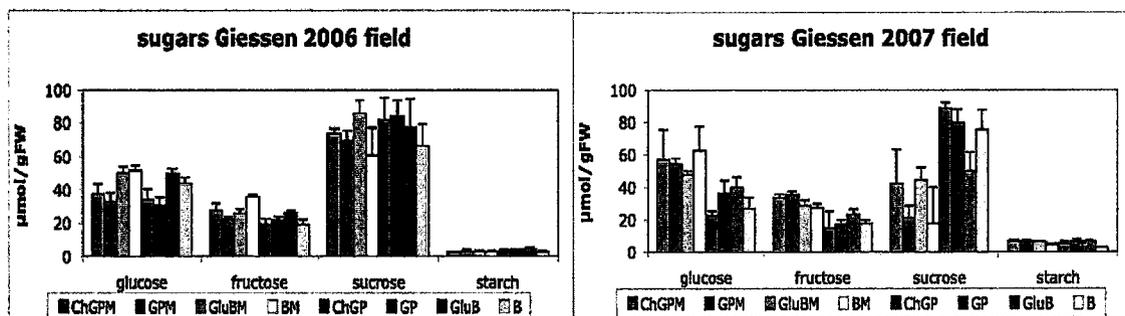
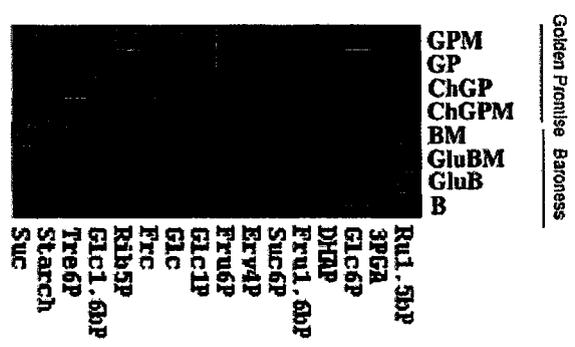


Abb. 8 Messung der Gehalte löslicher und unlöslicher Zucker Freiland 2006 und 2007

Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Frischgewicht (FW)

Die in Abbildung 9 gezeigte Clusteranalyse vom Jahr 2006 bestätigt diese Interpretation, da unabhängig von dem gentechnischen Eingriff Golden Promise und Baronesse in zwei Cluster getrennt werden können. Dies bedeutet, dass die züchterische Trennung der beiden Sorten einen nachweisbaren Einfluss auf die Metabolitenzusammensetzung beider Sorten hatte.

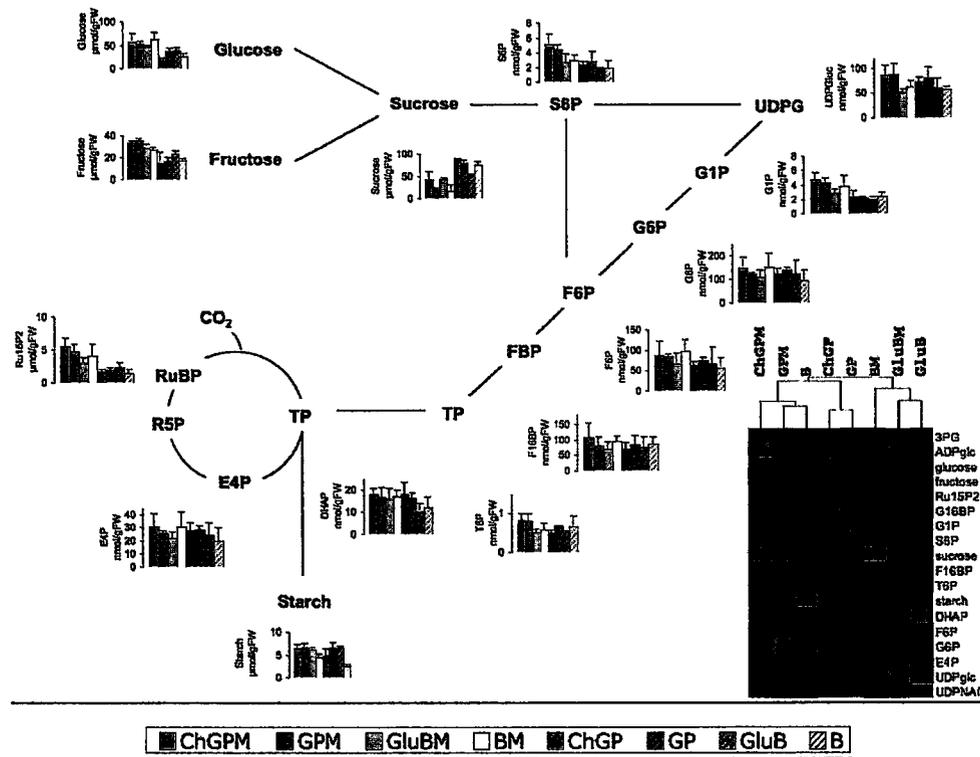


**Abb. 9:** Analyse des primären Kohlenhydratstoffwechsels transgener Gerstenpflanzen 2006. Die „heat map“ zeigt eine Clusteranalyse der Mittelwerte der angegebenen Metabolite. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an. Alle Messungen wurden mit vier unabhängigen Proben durchgeführt. Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M).

Anders als im Jahr 2006 wurden 2007 im Freilandversuch Mykorrhiza-bedingte Unterschiede festgestellt. Möglicherweise wirkten die von acht auf zehn Wochen verlängerte Standzeit und die etwas milderen Temperaturen während der Wachstumsphase des Jahres 2007 förderlich auf die Mykorrhizabildung. Im Jahr 2007 sind die Gehalte der löslichen Zucker Glucose und Fructose und der unlöslichen Stärke in den Gersten mit Mykorrhiza bis zum Zweifachen erhöht (Glucose: Baronesse und Chitinase-Golden Promise). Wegen der teilweise großen Standardfehler sind die Erhöhungen jedoch nur für zwei Linien bei Glucose (Baronesse und Chitinase-Golden Promise), für einer Linie bei Fructose (Golden Promise) und für eine Linie bei Stärke (Baronesse ) signifikant. Die Saccharosegehalte von drei mykorrhizierten Gersten sind etwa auf die Hälfte verringert. Lediglich bei der Linie Glukanase-Baronesse ist die Erniedrigung nicht signifikant (Abb. 8). Es ist allgemein bekannt, dass Mykorrhizapilze im Gegenzug zur Bereitstellung von bestimmten Nährstoffen mit Zucker versorgt werden. Die beobachtete tendenzielle Erhöhung der Glucose- und Fructosegehalte bzw. die Reduzierung der Saccharose könnte auf diese verstärkten Kohlehydratbereitstellung bzw. den raschen Abtransport der Saccharose als Transportform hin zur Mykorrhiza an die Wurzeln zurückzuführen sein.

Auch bei einigen Intermediaten des oxidativen Pentosephosphat- bzw. des Saccharosebiosynthese-Wegs sind 2007 tendenzielle und in Einzelfällen signifikante

Mykorrhiza-bedingte Unterschiede zu beobachten: Bei Ru15BP sind die Gehalte etwa verdoppelt und bei G1P (Golden Promise) etwa um ein Viertel erhöht.

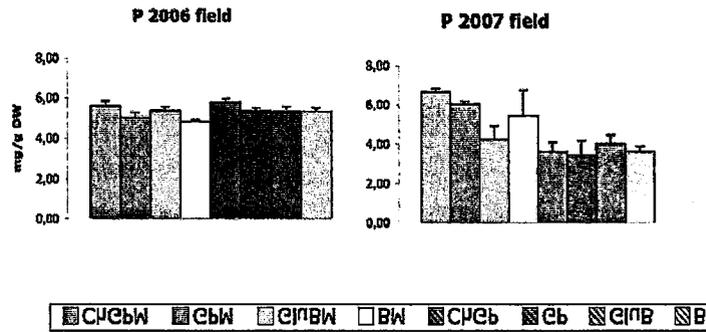


**Abb. 10:** Analyse des primären Kohlenhydratstoffwechsels transgener Gerstenpflanzen 2007. Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Die „heat map“ zeigt eine Clusteranalyse der Mittelwerte der angegebenen Metabolite. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an. Alle Messungen wurden mit vier unabhängigen Proben durchgeführt.

### Phosphatgehalte

Um nachzuweisen, ob die Besiedelung der Gerstenpflanzen mit *Glomus* einen Einfluss auf die Physiologie der Pflanzen hatte, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Horst (Universität Hannover) eine Elementanalyse durchgeführt (Abb.11)

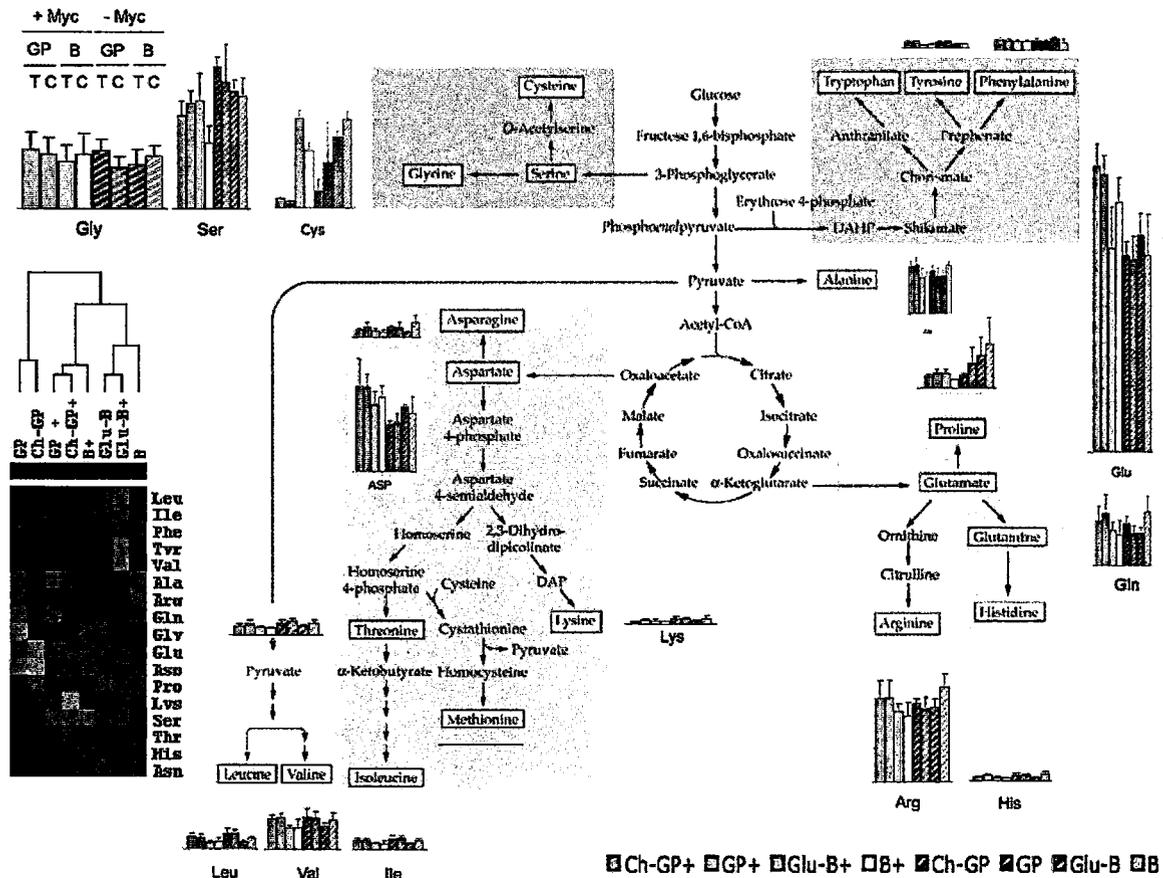
Während für beide Jahre wiederum kein Einfluss der Transgene gefunden wurde, konnte im Jahr 2007 aber nicht im Jahr 2006 ein Einfluss der Mykorrhizierung auf den Phosphatgehalt festgestellt werden. Wahrscheinlich begründet durch eine funktionelle Symbiose, zeichneten sich Blätter mykorrhizierter Pflanzen durch einen bis zu einem Drittel erhöhten Phosphorgehalt aus.



**Abb. 11** Analyse des Elementes Phosphor in Gerstebblätter der Freilandversuche der Jahre 2006 und 2007  
 Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Frischgewicht (FW)

**Untersuchungen zum Aminosäurestoffwechsel:**

Wie bei den Zuckermetaboliten wurden nur 2007 vereinzelte signifikante Änderungen der Aminosäurezusammensetzung der Gerstenblätter nach Mykorrhizierung gefunden (Abb. 12). So ist der Glutamat- und Aspartatgehalt in Golden Promise unabhängig von der gentechnischen Veränderung etwa um ein Viertel bis ein Fünftel erhöht.



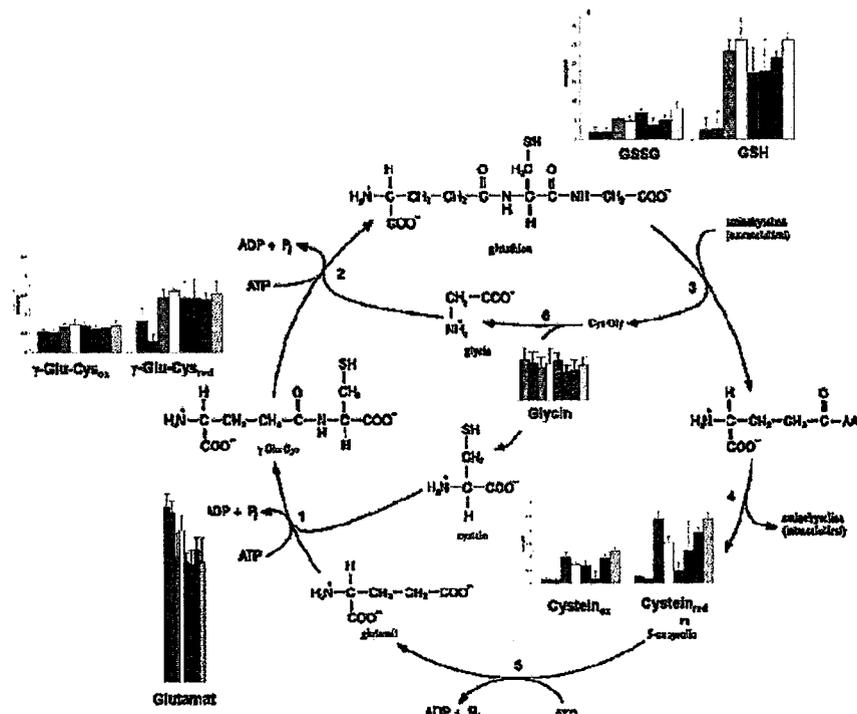
**Abb. 12:** Analyse der Aminosäurezusammensetzung in Blättern von Gerstenpflanzen 2007  
 CHGP, Chitinase transgene Golden Promise Linie; GP, Goldenpromise; GluB, Glukanase transgene Baronesse Linie; GluB, Baronesse; +, bezeichnet Proben die mit Mykorrhiza Pilzen infiziert wurden. Die „heat map“ zeigt eine Clusteranalyse der Mittelwerte der angegebenen

Metabolite. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an. Alle Messungen wurden mit vier unabhängigen Proben durchgeführt.

Sortenspezifische Unterschiede waren deutlich nur im Jahr 2007 nachweisbar. (Leu, Asp, Asn, Cys, Tyr, Thr, Val). Diese Interpretation wird durch die in Abb. 12 gezeigte Clusteranalyse bekräftigt, bei der eine Trennung von Golden Promise und Baronesse angedeutet wird. Signifikante Veränderungen die auf den gentechnischen Eingriff zurückgeführt werden können wurden in keiner Anzucht festgestellt, weder bei den stressindikativen aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin) noch bei den Transportaminosäuren (wie z.B. Glutamin, Glutamat, Asparagin).

### Untersuchungen zu oxidativen Schutzsystemen

Durch eine Kombination von fünf Extraktions- und Detektionsverfahren konnten wir zusätzlich zum Primärstoffwechsel den antioxidativen Stoffwechsel der Gerstenpflanzen untersuchen. Hierzu haben wir umfangreiche Daten zum Glutathionstoffwechsel (GHG, GSSG, Glycin, Glutamat, Cystein,  $\gamma$ -Glu-Cys) und zur Akkumulation von Ascorbat und Tocopherol erarbeitet. Die Ergebnisse zum Glutathionstoffwechsel und zum Oxidationsstatus von Glutathion sind in Abbildung 13 zusammengefasst.



**Abb.13:** Analyse des Glutathion Stoffwechsels in Blättern transgener Gerstenpflanzen. CH-GP, Chitinase transgene Golden Promise Linie; GP, Goldenpromise; Glu-B, Glucanase transgene Baronesse Linie; Glu-B, Baroness; +, bezeichnet Proben die mit Mykorrhiza Pilzen infiziert wurden.

Signifikante Änderungen in Blättern transgener Gerstenpflanzen wurden wiederum weder 2006 noch 2007 beobachtet werden.

Wie bereits für die Zuckermetabolite und Aminosäuren berichtet wurden 2007 tendenzielle aber auch vereinzelt signifikante Unterschiede bedingt durch die Mykorrhizierung bzw. durch die Pflanzensorte gefunden. So ist der Glutathiongehalt in Golden Promise mit Mykorrhiza etwa auf die Hälfte reduziert. Wie bereits erwähnt ist hier der Glutamatgehalt etwa um ein Fünftel erhöht. Der Gehalt von reduziertem Gamma-Glutamyl-Cystein ist in der mykorrhizierten transgenen Golden Promise etwa um die Hälfte reduziert.

Signifikante sortenspezifische Unterschiede ergaben sich 2007 bei Glutathion, und Cystein. Der Gesamtgehalt von Glutathion ist unabhängig vom Transgen, in der mykorrhizierten Baronesse etwa fünfmal höher als in Golden Promise. Der Gehalt von oxidiertem Glutathion ist hier ebenfalls, jedoch nur etwa um die Hälfte höher. Der Gehalt von reduziertem Gamma-Glutamyl-Cystein ist in der mykorrhizierten transgenen Golden Promise gegenüber der Baronesse etwa um die Hälfte reduziert.

Der Glutathion-Ascorbat Zyklus (s. Abb. 14) ist von zentraler Bedeutung für die Redoxregulation photosynthetisch aktiver Blätter. Daher gibt die Messung des Ascorbat- und Glutathiongehaltes, sowie die Bestimmung des Oxidationsstatus beider Antioxidantien einen guten Überblick über den Redoxzustand des Zellstoffwechsels.

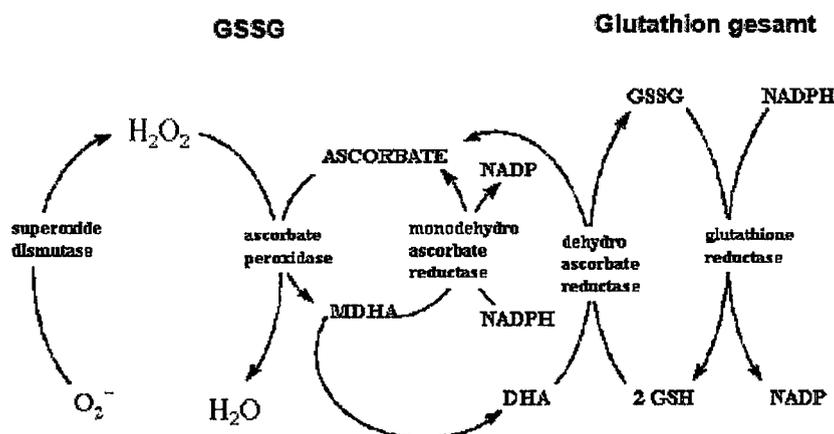


Abb.14: Glutathion-Ascorbat Zyklus

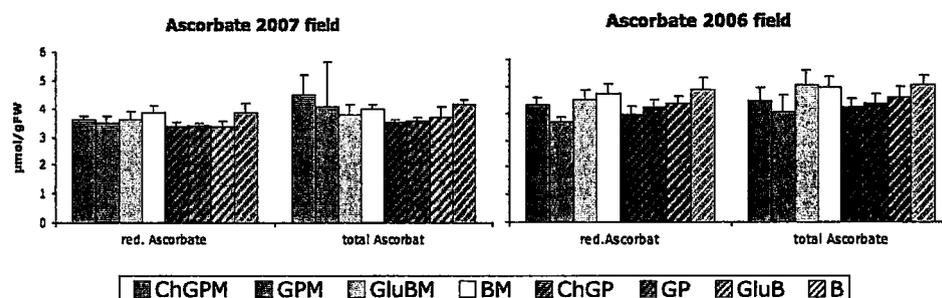


Abb.15: Messung der Ascorbatgehalte Freiland 2006 und 2007  
Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Frischgewicht (FW)

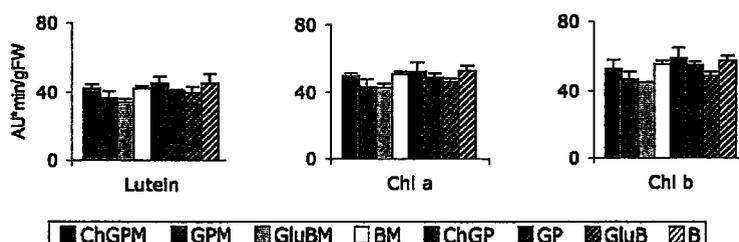
Da weder die Gesamtgehalte, noch der Oxidationsstatus beider Metabolite (Abb. 14-15) sich in den transgenen Pflanzen signifikant geändert haben, hat die Expression der Transgene keinen Einfluss auf den Redoxstatus der Pflanzen. Diese Daten werden durch Messung von Tocopherol und einigen Carotinoiden, bestätigt (Abbildungen 30 u. 31). Tendenziell lassen sich allerdings die beiden Sorten, Baronesse und Golden Promise zumindest im Jahr 2006 anhand ihrer Ascorbatakkumulation unterscheiden, wobei Baronesse den höheren Ascorbatgehalt aufweist (Abb. 13).

#### Untersuchungen zur Pigmentakkumulation

Durch unsere neu etablierte Methode konnten die Gehalte von 16 Pflanzenpigmenten bestimmt werden: Violaxanthin, Neoxanthin, Pigment 410.433.461, Antheraxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Transneoxanthin, Pigment 416.437.464., Chlorophyll a, Pigment 435.462.561, Chlorophyll b, Pigment 390.410.434, Pigment 422.444.472, Alpha Carotin, Beta Carotin

Durch den Einsatz einer, polaren C16 reversed Phase-Chromatographiesäule (Polar advantage, Fa. Dionex) und Kombination geeigneten Elutionspuffern war es uns möglich die Carotenoide Lutein und Zeaxanthin mit einer robusten und schnellen Methode zu trennen. Dadurch wurde erheblichen Schwierigkeiten publizierter Methoden umgangen, bei denen stark hydrophobe C30-Säulen verwendet werden. Im Zuge der Analyse wurden fünf unbekannte Carotinoide gefunden, die anhand ihrer für die Stoffklasse charakteristischen dreigipfeligen Absorptionsmaxima identifiziert und so bezeichnet wurden.

Außer einer tendenziellen Erniedrigung der Gehalte von Lutein und der Chlorophylle a und b in der mykorrhizierten transgenen Baronesse des Feldversuchs 2007 wurden keine signifikanten Unterschiede in den Gehalten der Pigmente der Pflanzen des Freilandexperiments gefunden. (Abb. 16).



**Abb.16:** Pigmentgehalte von Lutein, Chlorophyll a und b, Feldexperiment 2007 Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Absorptionseinheiten (AU), Frischgewicht (FW) (weiter Pigmentgehalte sind in Abb.30)

#### Untersuchungen zu Metaboliten der Glykolyse und des Citratcyclus

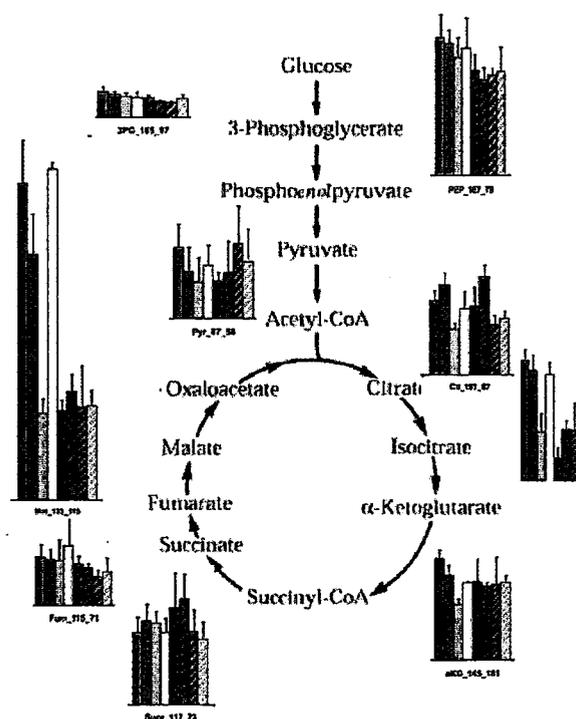
Im Jahr 2006 entwickelten wir eine neue IC/MS/MS Methode zur Analyse wichtiger Metabolite zentraler Stoffwechselwege wie der Glykolyse und des Citratcyclus. Vorallem durch Änderung des Extraktionsmittels von Methanol/Chloroform zu Perchlorsäure und durch eine Verdopplung der Trennstrecke in der Chromatographie erreichten wir eine bessere Wiederfindung und konnten im Jahr 2007 zusätzliche 6 Metabolite untersuchen.

So wurden die Gehalte folgender 27 Metabolite mit Hilfe der Massenspektrometrie ermittelt: Malat, Ribulose 1,5 Bisphosphat, Citrat, Isocitrat, AMP, Fructose 6-Phosphat, Glucose 6-Phosphat, Erythrose 4-Phosphat, Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerat, Pyruvat, alpha-Ketoglutarat, Succinat, ADP, UDP, Glucose 1-Phosphat, Fructose 1,6 Bisphosphat, Phosphoenolpyruvat, Sucrose 6-Phosphat, Trehalose 6-Phosphat, Glucose 1,6 Bisphosphat, (2007 zusätzlich:) Fumarat, Shikimat, UDP-Glucose, ADP-Glucose, Pyrophosphat und UDP-N-Acetylglucosamin

Die Gehalte von neun Vertretern der Analyse des Jahres 2007 ist in der Abbildung 17 gezeigt.

Auffällig sind hier die durch Mykorrhizierung bedingten erhöhten Werte der Malatgehalte auf das Doppelte bis Dreifache der Pflanzen ohne Pilzbesiedelung. Hier wie auch bei Citrat, Isocitrat sowie alpha-Ketoglutarat wurden Metabolitverschiebungen gefunden, die auf einen Einfluß der transgene Glukanase hinweisen könnten.

Die Gehalte der Metabolite sind bei der mykorrhizierten transgenen Baronesse signifikant niedriger als im Wildtyp bzw. auf dem Niveau der nicht mykorrhizierten Kontrolle: Isocitrat (ca. 40%), Citrat (ca. 75%), (alpha Ketoglutarat (ca. 75%) und Malat (ca. 30%)



■ ChGPM ■ GPM ■ GluBM □ BM ■ ChGP ■ GP ■ GluB ■ B

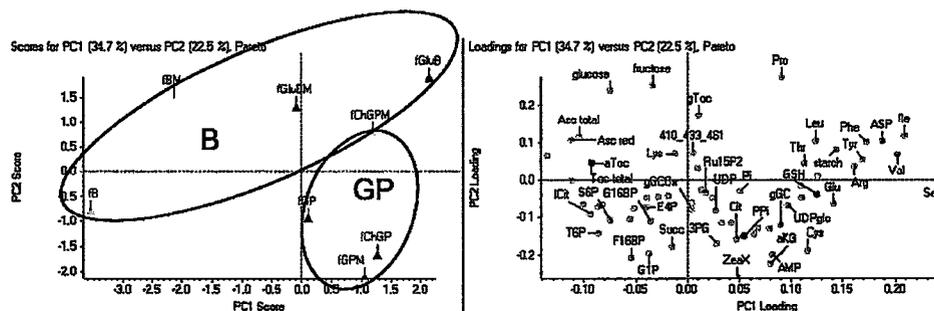
**Abb. 17:** Analyse von Metaboliten der Glykolyse und des Citratzyklus in Blättern transgener Gerstenpflanzen des Jahres 2007. CHGP, Chitinase transgene Golden Promise Linie; GP, Goldenpromise; GluB, Glucanase transgene Baroness Linie; GluB, Baroness; M, bezeichnet Proben die mit Mykorrhiza Pilzen infiziert wurden.

### Gerichtete Cluster- und Hauptkomponentenanalyse

Die erhaltenen Messdaten wurden zusätzlich mit zwei multivariaten Methoden, der hierarchischen Clusteranalyse und der Hauptkomponentenanalyse, interpretiert. Dadurch wurden einerseits Gruppierungen der Pflanzenlinien mit ähnlichen Metabolitgehalten gefunden und andererseits entscheidende Faktoren detektiert, die für die Differenzierung maßgeblich sind. Ein Einfluss der Transgene konnte durch die Clusteranalyse Analyse nicht gefunden werden.

Für die Messwerte des Jahres 2006 wurde eine Trennung nach Mykorrhizierung bzw. nach Sorte lediglich angedeutet (s. Abb.19). Wahrscheinlich war die Mykorrhiza wegen der vorzeitigen Ernte nicht wirkungsvoll ausgebildet. So clustert die mykorrhizierte Baroness mit ihrer Wildtyp Kontrolle deutlich mit einem positiven Korrelationswert (K) von 0,33 (Tab. 1). Demgemäß fallen auch der Wildtyp, die transgene und die mykorrhizierte Golden Promise in ein Cluster (K 0,02). Interessanterweise clustern auch die beiden mykorrhizierten transgen Gersten noch gut (K 0,2).

Bestätigung erhält die Interpretation durch die Hauptkomponentenanalyse. In Abbildung 18 sieht man im Scoringplot eine vage Trennung nach Sorte aber auch nach Mykorrhizierung. Die Sorten wurden eingekreist. Die Verteilung der Metabolite im Ladungsplot läßt schließen, dass PC1 nach Sorte und PC2 nach Mykorrhizierung trennt. Die Zuckermetabolite als Mykorrhizzazeiger wie Glucose, Fructose, G1P sind entsprechend in Richtung PC2 verteilt, während viele Aminosäuren in Richtung von PC1 beladen und den Sortenunterschied bestimmen.



**Abb. 18** Hauptkomponentenanalyse (Freiland 2006) mit Mittelwerten der Gehalte von 72 Metaboliten

Der Scoringplot links trennt und platziert die untersuchten Linien (farbige Dreiecke) nach deren errechneten Werten für die Hauptkomponenten PC1 und PC2. PC1 trennt nach Kultivar (Baroness (B) oder Golden Promise (GP)). und PC2 nach Mykorrhizierung (M). Linien der

gleichen Sorte sind eingekreist (B oder GP). PC1 deckt 34,7% und PC2 deckt 22,5% der gesamten Varianz ab, wobei die Varianz als Maß für den Gehalt an Information zu verstehen ist. Der Ladungsplot rechts zeigt die Bedeutung der Metabolite für die Berechnung des Scoringplots bzw. der Hauptkomponenten PC1 und PC2. So hat z.B. Serin, Isoleucin und Valin einen großes Gewicht für PC1, während z.B. die Fructose und Prolin stark auf PC2 hochladen. Zugrundegelegt wurden 576 Mittelwerte aus je 4 biologischen Replikaten.

#### CLUSTER 2006 field

Knoten	Datenreihe	Datenreihe	Korrelation	Cluster
NODE1X	ARRAY7X	ARRAY3X	0.33	BxBM
NODE2X	ARRAY2X	ARRAY0X	0.20	ChGPMxGluBM
NODE3X	ARRAY4X	ARRAY1X	0.11	GPMxChGP
NODE4X	ARRAY6X	NODE2X	0.08	ChGPMxGluBMxGluB
NODE5X	ARRAY5X	NODE3X	0.02	GPMxChGPxGP
NODE6X	NODE1X	NODE5X	-0.44	GPMxChGPxGPxBxBM
NODE7X	NODE6X	NODE4X	-0.56	ChGPMxGluBMxGluBxGPMxChGPxGPxBxBM

#### CLUSTER 2007 field

NODE1X	ARRAY1X	ARRAY0X	0.54	ChGPMxGPM
NODE2X	ARRAY6X	ARRAY7X	0.39	GluBxB
NODE3X	ARRAY5X	ARRAY4X	0.31	ChGPxGP
NODE4X	ARRAY3X	ARRAY2X	0.16	GluBMxBM
NODE5X	NODE3X	NODE2X	-0.06	ChGPxGPxGluBxB
NODE6X	NODE4X	NODE1X	-0.16	ChGPMxGPMxGluBMxBM
NODE7X	NODE5X	NODE6X	-0.56	ChGPMxGPMxGluBMxBMxChGPxGPxGluBxB

#### Cluster 2007 Gewächshaus

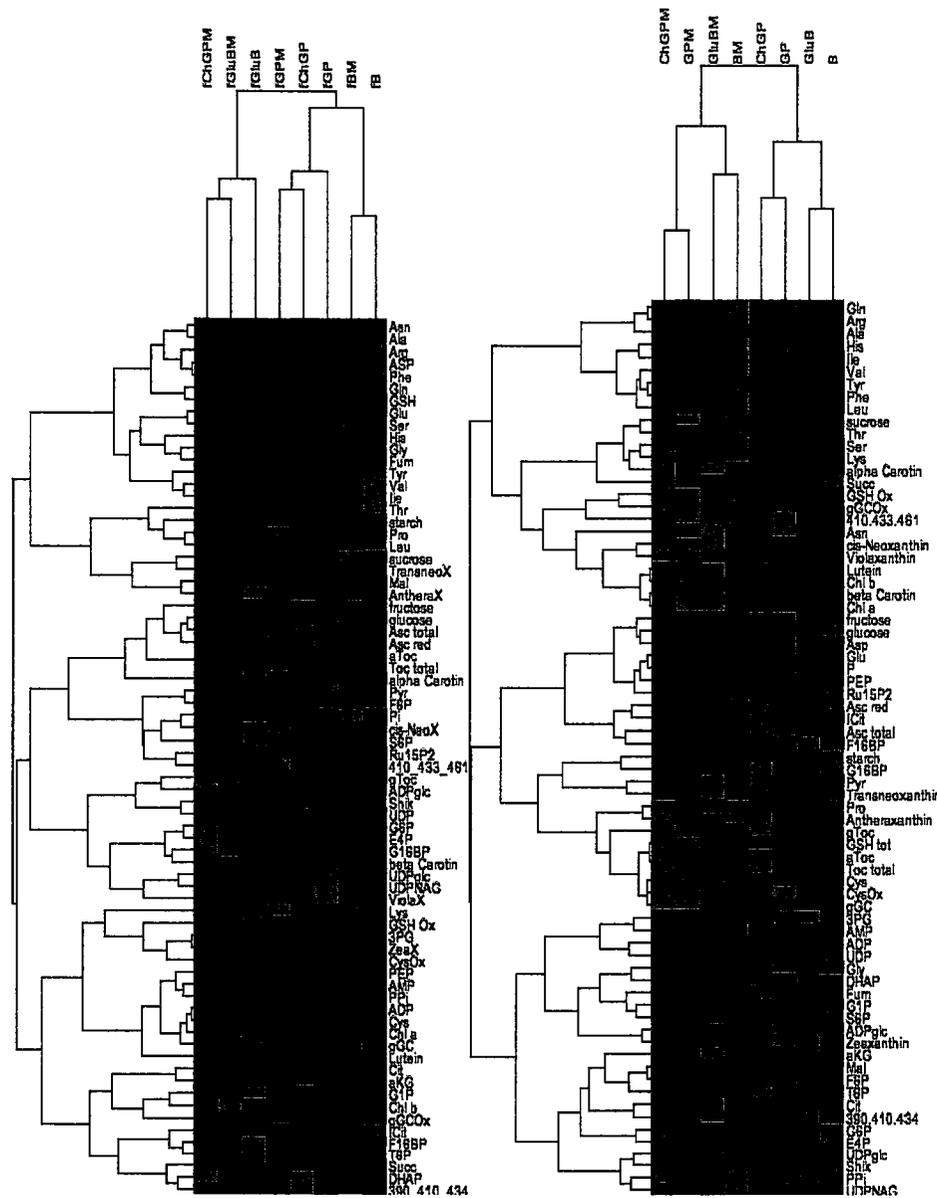
NODE1X	ARRAY4X	ARRAY0X	0.48	GCHGPxGGP+P
NODE2X	ARRAY6X	ARRAY3X	0.34	GCHGPM+PxGGPM+P
NODE3X	ARRAY5X	ARRAY2X	0.13	GChGPMxGGPM
NODE4X	ARRAY7X	NODE1X	0.08	GCHGPMxGGPM
NODE5X	NODE2X	ARRAY1X	0.02	GCHGPxGGP+PxGGP
NODE6X	NODE3X	NODE5X	-0.48	GChGP+PxGCHGPM+PxGGPM+P

Tab. 1 Korrelationsmatrices der Clusteranalysen

NODE, Knoten des Dendogramms der Datenreihen 0-7 (ARRY, von links beginnend) in der jeweiligen heatmap

Die Clusteranalyse des Feldversuchs des Jahres 2007 in Abbildung 19 zeigt eine wesentlich deutlichere Trennung nach Mykorrhiza und Gerstensorte. Alle Golden Promise sowie alle Baronesse Proben fallen jeweils in ein Cluster mit positiver Korrelation.

Ein ähnliches Bild ergab sich aus der Hauptkomponentenanalyse (Abb.20). Nicht unerwartet zeigte sich auch hier die Mykorrhizierung als maßgebend für die Clusterung. Als erste Hauptkomponente (PC1) mit dem größten Anteil der Varianz (48%) beeinflusst die Symbiose den Metabolitgehalt der Pflanzen am stärksten und trennt nach mykorrhizierten Pflanzenlinien auf. Hierbei hat die Chitinase transgene Golden Promise Linie mit 4,6 den höchsten Wert gefolgt von der untransformierten Kontrollpflanze Golden Promise (3,7), dem Baronesse Wildtyp (1,8) und schließlich der Glucanase transgenen Baronesse (1,2). Aus dem Ladungsplot werden die für die Trennung entscheidenden Metabolite erkennbar. Es sind dies Ribulose-1,5-Diphosphat, Malat, Sucrose-6-Phosphat, Fructose, Glucose, Isocitrat und Fructose-6-Phosphat mit den höchsten Werten und die Metabolite Cystein, reduziertes Gluthation, Sucrose und Gamma-Gluthamyl-Cystein mit den niedrigsten Werten. Dieses Ergebnis bestätigt die univariate Datenanalyse, wo ebenfalls eine Zunahme der Zuckermetabolite in den mykorrhizierten Pflanzenlinien festgestellt wurde.



**Abb.19** Clusteranalysen (Heatmaps) der Freilandproben mit 72 Metaboliten

Links, Analyse des Jahres 2006 ; rechts, 2007

Die normalisierten Mittelwerte der Metabolitgehalte aus vier Replikaten wurden mit dem Programm TreeView dargestellt. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an.

Transgene: Chitinase (Ch) und Glucanase (Glu), Kultivare: Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Linien mit Mykorrhiza (M), Jahr 2006 (f)

Der Clusteranalyse entsprechend trennt die zweite Hauptkomponente (PC2) die unterschiedlichen Kultivare Golden Promise und Baronesse deutlich und deckt dabei 21,7% der Varianz ab. Hier hat der Widtyp Golden Promise mit 2,7 den höchsten Wert, gefolgt von der Chitinase transgenen Golden Promise (2,2), der mykorrhizierten Golden Promise (1,15) und schließlich der Chitinase transgenen Golden Promise (0,35). Der Beladungsplot weist die Aminosäuren Leucin, Tyrosin, Phenylalanin und Isoleucin als hauptverantwortlich für die Trennung nach Kultivaren aus, während die Metabolite für den Oxidationsschutz Cystein, Tocopherol und reduziertem Glutathion den stärksten negativen Effekt auf die Beladung haben. Auch dieses Ergebnis bestätigt wiederum die univariate Analyse. Die weiteren errechneten

Hauptkomponenten wirken sich nur gering auf die Trennung der Pflanzenlinien aus (PC3 9,6%; PC4 8,7%; PC5 5,9%; PC6 3,9%; PC7 1,7%)

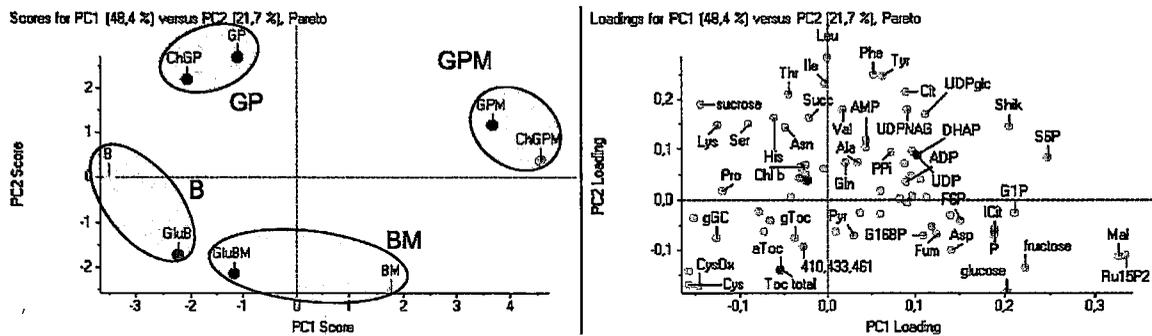


Abb. 20 Hauptkomponentenanalyse (Freiland 2007) mit Mittelwerten der Gehalte von 72 Metaboliten

Der Scoringplot links trennt and platziert die untersuchten Linien (farbige Punkte) nach deren errechneten Werten für die Hauptkomponenten PC1 und PC2. PC1 trennt nach Mykorrhizierung (M) und PC2 nach Kultivar (Baronesse (B) oder Golden Promise (GP)). Die Transgene Glucanase (Glu) und Chitinase (Ch) sind mit ihren Wildtyp-Kontrollen eingekreist. PC1 deckt 48,4% und PC2 deckt 21,7% der gesamten Varianz ab, wobei die Varianz als Maß für den Gehalt an Information zu verstehen ist. Der Ladungsplot rechts zeigt die Bedeutung der Metabolite für die Berechnung des Scoringplots bzw. der Hauptkomponenten PC1 und PC2. So hat z.B. Malat und Ru15P2 einen großes Gewicht für PC1, während z.B. die Aminosäuren Leucin und Phenylalanin stark auf PC2 hochladen. Zugrundegelegt wurden 576 Mittelwerte aus je 4 biologischen Replikaten.

Aus dem Scoringplot für PC1 und PC2 geht hervor, dass die Chitinase transgenen Golden Promise Linien mit ihren untransformierten Kontrollen etwas besser clustern, als die Glucanase transgenen Baronesse Linien. Im Vergleich ist die Distanz zwischen Baronesse und ihrer transgenen Vergleichslinie etwa doppelt bzw zwischen BM und GluBM etwa dreimal so hoch wie bei den Chitinase transgenen Linien. Die Verschiebung des PC1-Wertes hin zur mykorrhizierten Seite des Plots beträgt für GluB nach GluBM zudem nur etwa ein Fünftel der Verschiebung von B nach BM.

Folgende Überlegungen, zur beobachteten reduzierten Trennung der transgenen Glucanase Linie in der Hauptkomponentenanalyse seien angemerkt:

1. Die transgene Glucanase wurde zunächst im Kultivar Golden Promise etabliert und dann nach Baronesse rückgekreuzt. Der genetische Hintergrund der Transgenen könnte deshalb noch stark von der Wildtypkontrolle Baronesse abweichen, während Mykorrhizaeffekte sekundär wären.
2. Die Expressionsorte von Chitinase und Glucanase sind verschieden. Während die Chitinase in der ganzen Pflanze wirkt, kommt die Glucanase nur im Endosperm der Samen vor. Das Resistenzpotential gegen Schadpilze könnte deshalb in der Chitinase transgenen Pflanze höher sein als in der Glucanase Transgenen.



die Kultivare Golden Promise und Baronesse mit einer Varianz von 20,8 % verteilt. Wie auch weiter unten, für die ungerichteten Fingerprint-Analysen Analyse beschrieben, ist der geringe Shift der transgenen Baronesse für die erste Hauptkomponente nun auffälliger.

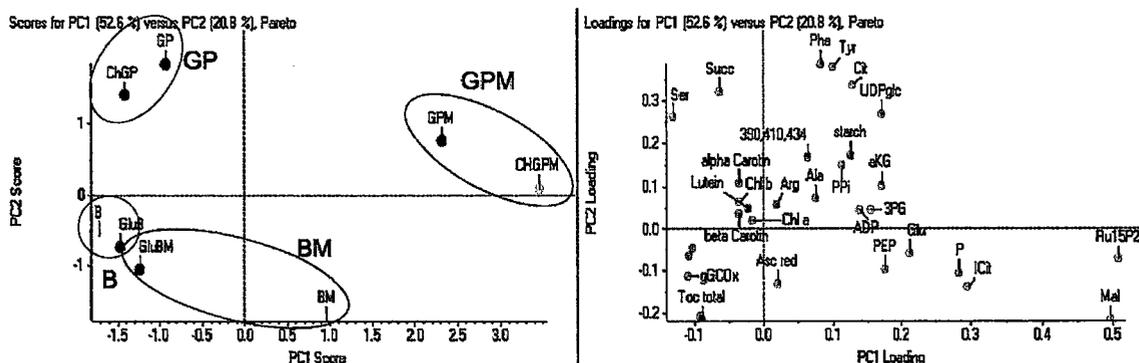


Abb.22 Modifizierte Hauptkomponentenanalyse (Freiland 2007) mit Mittelwerten der Gehalte von 31 Metaboliten

Hier wurden nur Metabolite betrachtet, deren prozentualer Fehler des Mittelwertes aus vier Replikaten geringer als 30 Prozent war. Die Abweichungen zur Analyse mit 72 Metaboliten (Abb.x) sind gering. Auffällig ist die nun etwas kürzere Distanz zwischen B und GluB.

Anhand der modifizierten Analyse wurde eine dritte Hauptkomponente (PC3) entdeckt (Abb 23). Die Varianzabdeckung beträgt hier 13,5%. Durch PC3 werden die Baronesse Wildtypen B und BM von allen Golden Promise Linien sowie von den clusternden Glucanase transgenen Baronesse Linien getrennt. Der Ladungsplot identifiziert Stärke, Malat und Ribulose-1,5-Bisphosphat als wichtige Metabolite für diese Interpretation. Dementsprechend ist der Stärkegehalt von Baronesse (ca.  $3\mu\text{mol/gFW}$ ) im Vergleich zu den transgenen and anderen Linien tatsächlich um etwa 50% reduziert (ca.  $6\mu\text{mol/gFW}$ ).

Die dritte Hauptkomponente weist möglicherweise auf Unterschiede im Metabolismus der Pflanzen hin, die vom genetischen Hintergrund abhängen. Wegen der Rückkreuzung aus Golden Promise könnten sich die Baronesse Linien GluB und GluBM nicht nur durch das Transgen von den Kontrollpflanzen unterscheiden sondern eben auch noch zu Golden Promise noch ähnlich sein.

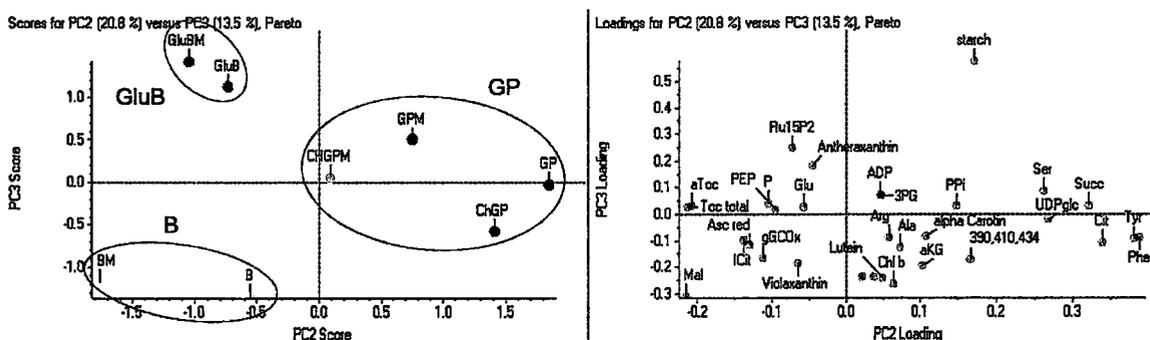


Abb.23 Detektion einer dritten Hauptkomponente (PC3)

Der Scoringplot links trennt über PC3 die eingekreisten Baronesse Linien (B) von den Golden Promise (GP) und den transgenen Glucanase Linien (GluB)

Um die Distanz der Pflanzenlinien zu verdeutlichen, wurden die Scoringplots der drei Hauptkomponenten in einen dreidimensionalen Graphen übertragen (Abb. 24).

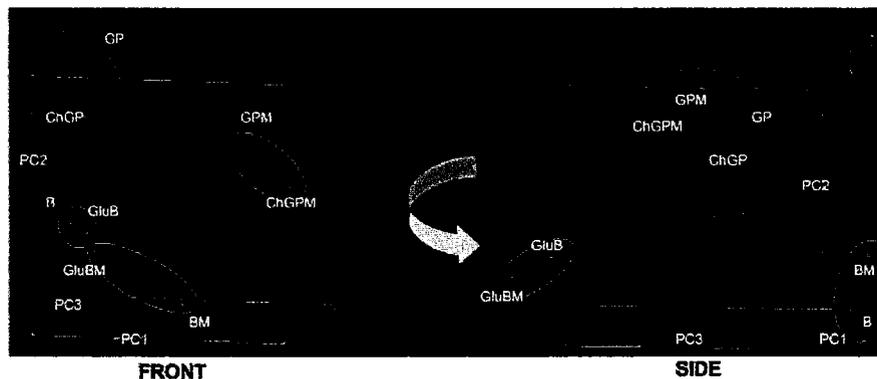


Abb 24. 3D-Ansicht der Scoringplots der Hauptkomponentenanalysen aus PC1-PC3 Ansicht von vorne (FRONT) und um 90° gedreht (SIDE). Der linke Raum muß um 90° gedreht werden um zum Seitenanblick zu kommen. Gelbe Linien markieren die Distanz vom Nullpunkt und enden bei den Pflanzenlinien: Mykorrhizierung (M) Kultivare Baronesse (B) und Golden Promise (GP), Transgene Glucanase (Glu) und Chitinase (Ch)

#### b) Analyse ungerichteter Metabolitprofile (fingerprints)

Die Analyse ungerichteter Metabolitprofile, ermöglicht einen erweiterten Blickwinkel auf das Metabolitspektrum der untersuchten Gerstepflanzen. Auch um bisherige Ergebnisse aus der univariaten und gerichteten multivariaten Analyse zur Metabolitverteilung in den Gerstepflanzen zu bekräftigen oder abzuschwächen wurde nun dieser Ansatz durchgeführt.

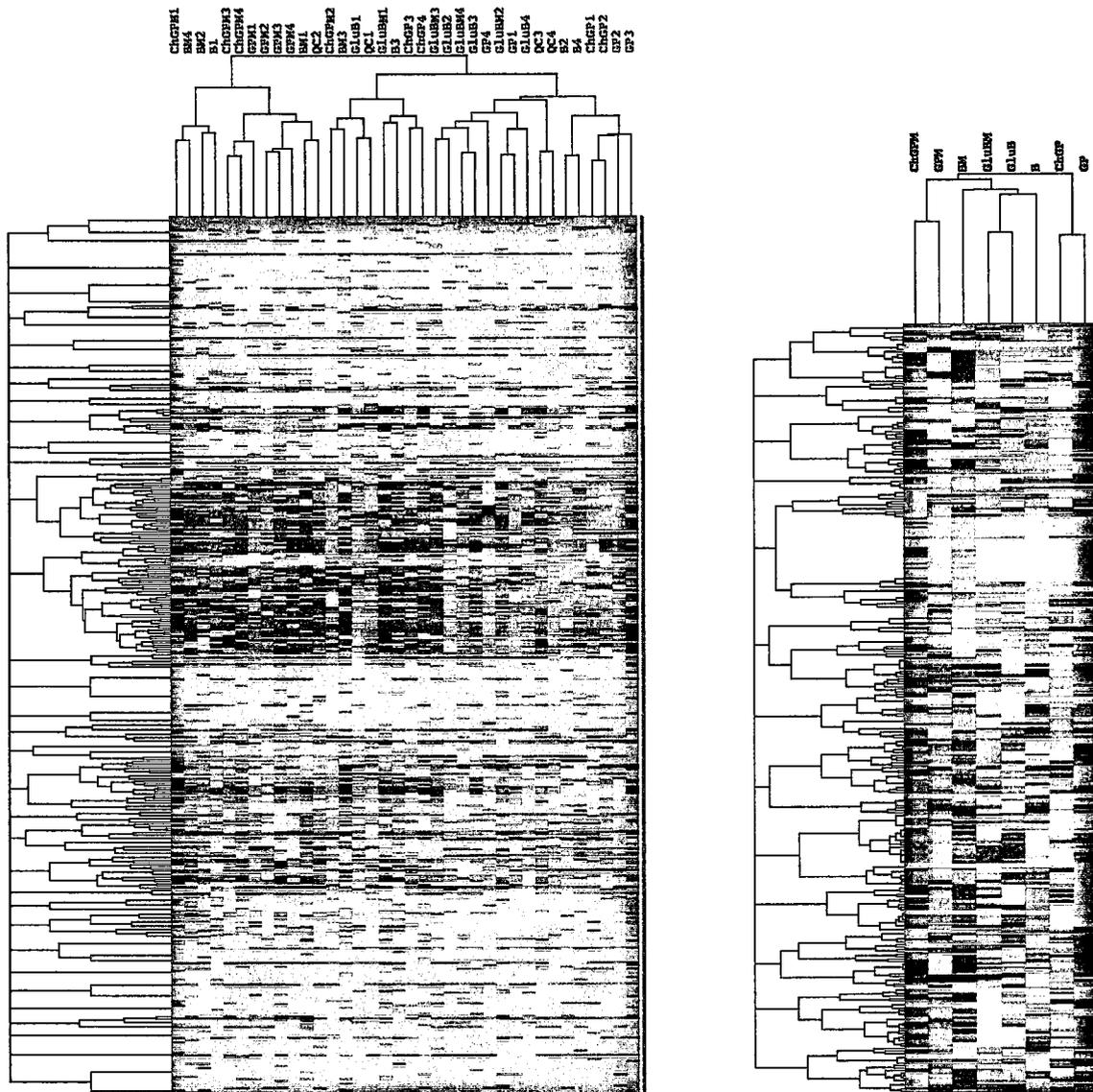
Für je 4 Replikate jeder der 8 Gersteliniien wurden Perchlosäureextrakte hergestellt und dann im Full-Scan Modus mit dem QTrap 3200 Massenspektrometer analysiert. Unter Verwendung der MarkerView™ Software wurden dann aus dem erzeugten Datensatz der QTrap 431 Massenpeaks extrahiert. Nach Extraktion von Spektren aus der Gesamtionenausbeute (TIC) und Vergleich der uns bekannten Retentionszeiten konnten eine Anzahl von Massenpeaks den uns bereits bekannten Metaboliten zugeordnet werden. (z.B. Zitrat m/z 191 Phosphat m/z 97)

Mit einem auf 405 Massenpeaks bereinigten Datensatz wurde eine Cluster- und Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Wie in Abbildung 25 gezeigt, ergab sich bei der Clusteranalyse ein Dendrogramm bei dem die vier Probenreplikate der einzelnen Linien, anders als erwartet, unterschiedlich clustern. So liegen z.B. bei der mykorrhizierten Linie Golden Promise alle Replikate (GPM1-4) nebeneinander, während bei Baronesse (B1-4) nur zwei Replikate benachbart sind. Auch in der Hauptkomponentenanalyse der 405 Massenpeaks ist die Streuung innerhalb der Replikate deutlich (Abb.4a). Allerdings streuen die mitgeführten QC-Kontrollen ähnlich, was auf eine erwartungsgemäße Variabilität der Messmethode

hinweist. Der Scoringplot läßt als Hauptkomponenten 1 und 2 wie schon beim gerichteten Profiling die Mykorrhizierung bzw. eine Trennung nach den Kultivaren Baronesse und Golden Promise erkennen. PC1 deckt 40,x % und PC2 10,4% der gesamten Varianz ab. Wie aus dem Loadingsplot zu erkennen sind die wichtigsten Marker für die Beladung von PC1 bzw. PC2 die Massen m/z 97.0 (RT 32,5 min) bzw. 190,8 (RT 37,5min).

Die Heatmap der Clusteranalyse mit 405 Massen weist viele fehlende, grau markierte Werte auf. Gründe dafür sind daß i) Peaks zwar in der Probe sind aber nicht extrahiert wurden, ii) Peaks sich nicht in der Probe befinden oder iii) der Peak zwar in der Probe ist, aber seine Intensität unterhalb des eingestellten Schwellenwertes für das Rauschen war. Zur Qualitätsverbesserung des Datensatzes wurden deshalb die Mittelwerte aus den 4 Proben berechnet und alle Peaks mit weniger als zwei Werten eliminiert, Mit den restlichen 307 Peaks wurde die Cluster- und Hauptkomponentenanalyse wiederholt (s. Abb. 25 u. 26). Trotz weiterhin fehlende Werte, ergab sich bei der Clusteranalyse nun eine deutliche Trennung nach mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen.

In beiden Gruppen clustern außerdem die Kultivare Baronesse und Golden Promise zusammen. Auffällig ist, daß die mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Glucanase transgene Baronesse in ein Cluster fallen (Korrelation +0.19). Am deutlichsten, mit einer positiven Korrelation von 0,22, clustert die transgene Golden Promise mit ihrer Kontrollpflanze. Auch die mykorrhizierte transgene Golden Promise clustert noch mit Ihrer Kontrolllinie (Korrelation +0.1). Durch die Hauptkomponentenanalyse wird die Trennung nach Mykorrhiza und Kultivar noch deutlicher. Hier betragen die Varianzabdeckungen 46,7% für PC1 und 14,4% für PC2. Wie bereits beim gerichteten Profiling gefunden, ist auch hier, bei der ungerichteten Analyse der schwache PC1-Shift der Glucanase transgenen Baronesse auffällig. Er beträgt nur ca. ein Viertel der Verschiebung, den PC1 bei den übrigen Pflanzenlinien bewirkt.



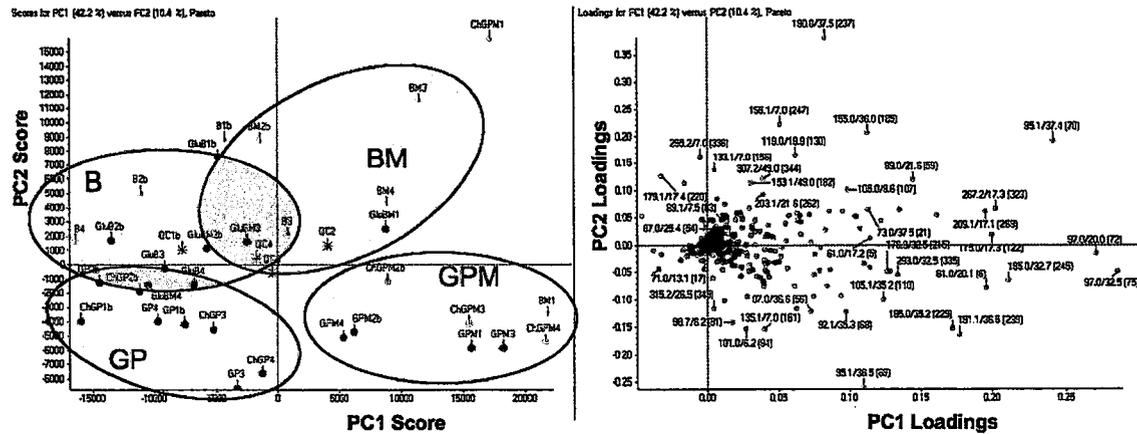
**Abb.25** Clusteranalyse (Heatmap) der Freilandproben 2007, ungerichtetes Profiling

Die normalisierten Intensitätswerte der Massenpeaks wurde mit dem Programm TreeView dargestellt. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an, graue Felder haben den Wert Null, bzw. einen Wert der unter dem Schwellenwert der Peakfindung liegt.

Transgene: Chitinase (Ch) und Glucanase (Glu), Kultivare: Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Linien mit Mykorrhiza (M),

Im linken Plot ist die Heatmap für 14580 Werte von 405 Massen der acht untersuchten Pflanzenlinien mit ihren vier Replikaten und vier Qualitätskontrollproben (QC) dargestellt. Mit den Werten wurde auch eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (Abb.x).

Im rechten Plot ist die Analyse mit 2456 Werten nach Bereinigung auf 307 Massen und Mittelwertbildung dargestellt. Hier wurden nur Massen analysiert bei denen mindestens 2 Werte vorhanden waren.



B

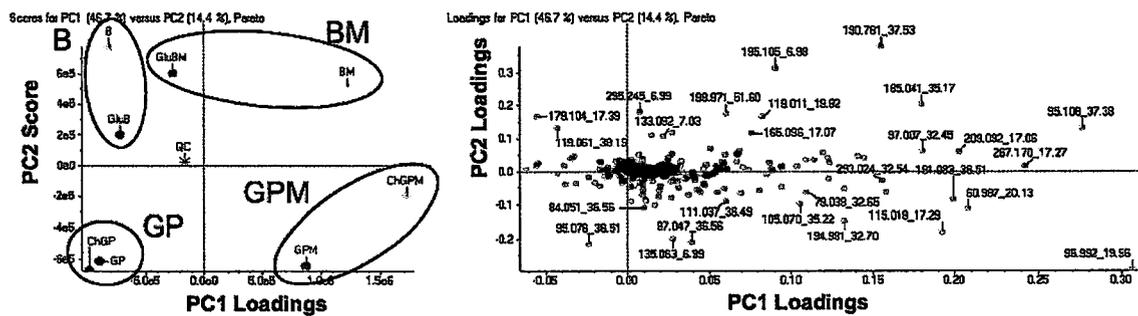


Abb.26 Hauptkomponentenanalyse ungerichtetes profiling

Bei A ist die Analyse für 405 Massen der acht untersuchten Pflanzenlinien mit Ihren vier Replikaten und vier Qualitätskontrollproben (QC) gezeigt. Der Scoringplot trennt die 4 Proben-Replikate ähnlich wie in Abbildung x nach Mykorrhizierung (PC1) und nach Kultivar (PC2). Die durch Kreise markierten Cluster sind trotz der Datenstreuung zu erkennen. Bei B wurden die Mittelwerte von 307 bereinigten Massenpeaks analysiert.

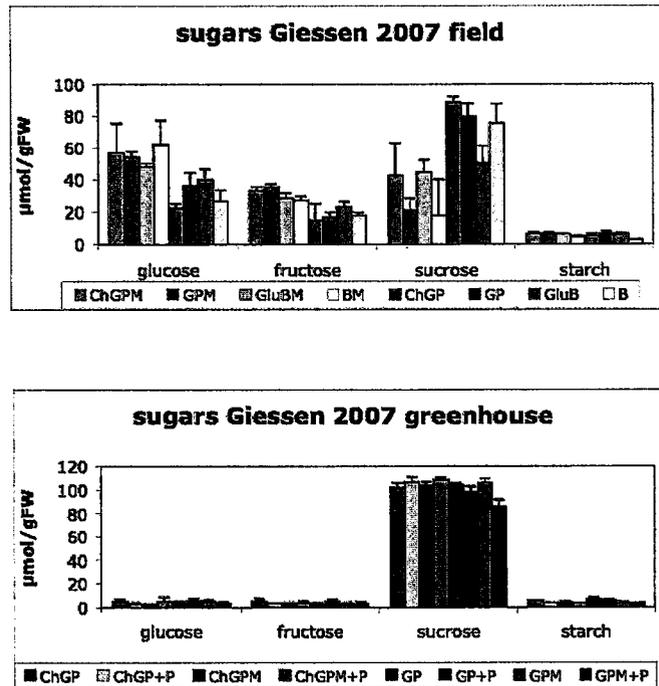
## Ergebnisse der Gewächshausexperimente

Im Gewächshausexperiment des Jahres 2007 wurde nur das Chitinase Transgen getestet. Neben der Mykorrhiza zeigte auch die Phosphatdüngung ihren Einfluß auf den Metabolitgehalt. Transgen-bedingte Metabolitverschiebungen wurden nicht gefunden. Im folgenden werden die Gehalte mit denen des Feldversuchs 2007 verglichen.

### Zuckergehalte

Generell sind die Gehalte von Glukose und Fructose im Vergleich zum Feldexperiment bei allen Linien 3-5 fach niedriger, während die Saccharose und Stärkegehalte vergleichbar hoch sind (s. Abb. 27). Möglicherweise kommt es unter den Gewächshausbedingungen nicht zu einer geringeren Akkumulation von Glucose und Fructose, weil die Pflanzen weniger seneszent bzw. der Stoffwechsel unter kontrollierten Bedingungen (Wassergehalt, Licht, Nährstoffverfügbarkeit etc.) besser geregelt und damit schneller bzw. ungestörter abläuft.

A



B

**Abb. 27** Messung der Gehalte löslicher und unlöslicher Zucker

A Freilandversuch 2007, B Gewächshausexperiment 2007

Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Phosphatdüngung (+P). Frischgewicht (FW)

Im Gewächshausexperiment wurden Mykorrhiza- und Phosphatdüngungseffekte gefunden: Der Glukosegehalt der mit Phosphat gedüngten mykorrhizierten transgenen Linie ist etwa doppelt so hoch wie in der nicht-mykorrhizierten bzw. wie in der nicht Phosphat gedüngten Vergleichslinie. Dem entsprechend wurde auch im Feldexperiment 2007 einer Erhöhung des Glukosegehaltes festgestellt, der auf eine verstärkte Bereitstellung von Zucker für den Pilz zurückgeführt werden könnte.

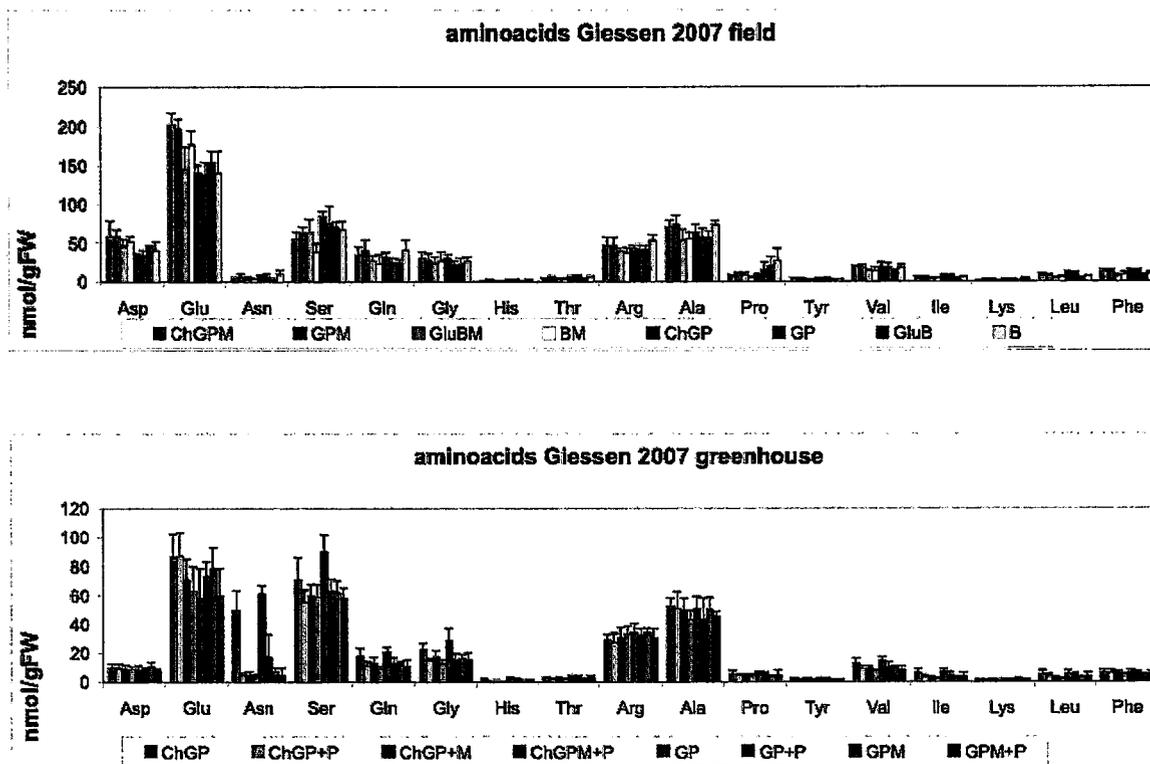
Eventuell wirkt die höhere Phosphatverfügbarkeit in dieser Linie zu einer geringeren Glukoseabgabe in den Zuckerfluss für den Pilz bzw. Akkumulation in den Blättern. Dementsprechend ist in dieser Linie die Saccharose nun auch nicht so reduziert wie im Feldversuch.

Der Saccharosegehalt des mit Phosphat gedüngten mykorrhizierten Wildtyps ist um etwa ein Zehntel kleiner als in der ungedüngten Vergleichslinie. Der geringere Phosphatmangel könnte hier umgekehrt wirken wie in der transgenen Linie und höhere Stoffwechselleistungen ermöglichen, die den Saccharoseabtransport aus den Blättern verbessern.

Änderungen in den transgenen Gersten: Der Saccharosegehalt der mit Phosphat gedüngten mykorrhizierten transgenen Gerste ist um ca. ein Zehntel niedriger als im Wildtyp. Der geringere Phosphatmangel könnte hier umgekehrt wirken wie in der transgenen Linie

**Phosphatgehalte**





**Abb. 29:** Gehaltsanalyse der Aminosäuren Gewächshausversuch 2006-2007. Transgen Chitinase (CH), Kultivar Golden Promise (GP), Mykorrhiza Kultivierung (M). Phosphatdüngung (+P). Frischgewicht (FW)

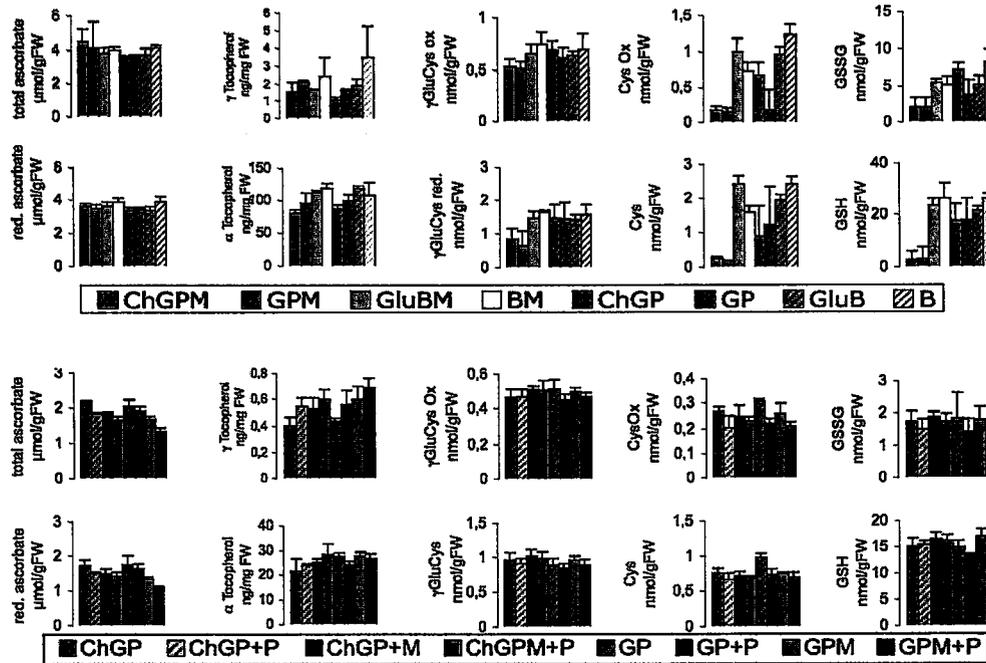
### Oxidationsschutz

Signifikante Verschiebungen in Blättern transgener Gerstenpflanzen wurden bei den Intermediaten des Glutathionstoffwechsels (GHG, GSSG, Glycin, Glutamat, Cystein,  $\square$ -Glu-Cys) sowie den Antioxidantien Ascorbat und Tocopherol nicht beobachtet (Abb. 30). Die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit war allerdings in einigen Fällen dennoch messbar. So ist in der transgenen und untransformierten Golden Promise Linien der Ascorbatgehalt gegenüber der Vergleichsline auf P-Mangelboden um bis ca 10% erhöht, während der  $\square$  Tocopherolgehalt entsprechend erniedrigt ist.

Die Cysteinwerte sind bei Phosphatmangel im Wildtyp gegenüber der Kontrolle mit Phosphat ebenso erhöht.

Auch Mykorrhizzaeffekte wurden vereinzelt gefunden. So ist der Ascorbatgehalt im Wildtyp bei Mykorrhizierung etwa um ein Viertel niedriger als in der Vergleichspflanzen.

Der  $\square$  Tocopherolgehalt ist im tendenziell im Wildtyp und auch in der transgenen Linie erhöht.



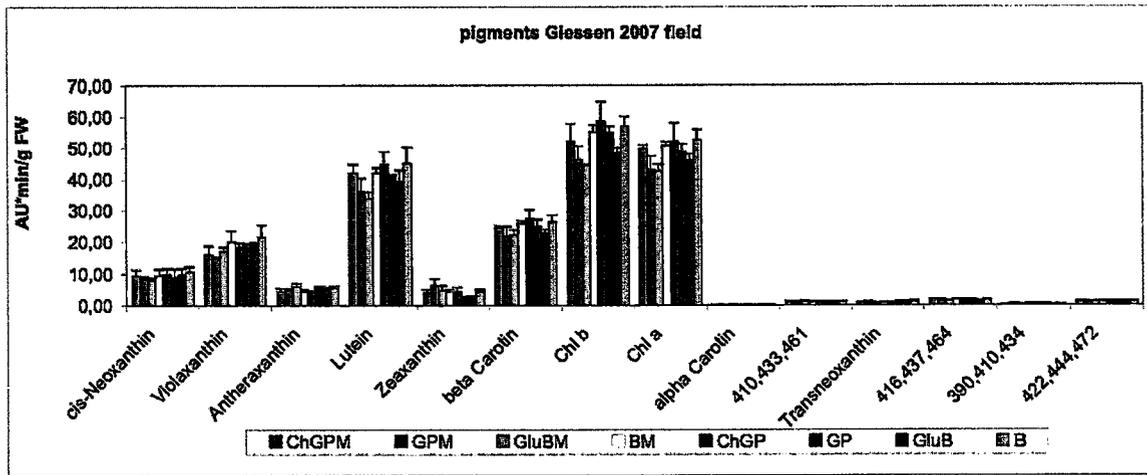
**Abb. 30** Gehalte von Metaboliten des Oxidationsschutzes oben Freilandversuch 2007, unten Gewächshausexperiment 2007 Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Phosphatdüngung (+P). Frischgewicht (FW)

Im Vergleich zum Freiland sind für die getestete Linie Golden Promise die Gehalte von Ascorbat und  $\gamma$ -Tocopherol im Gewächshaus etwa halbiert und der Gehalt von  $\alpha$ -Tocopherol ist etwa ein Drittel. Der Gehalt von reduziertem Cystein ist dagegen im Gewächshaus etwa verdoppelt und der Gehalt von reduziertem Gluthation ist etwa dreimal so hoch wie im Freiland. Das einerseits erhöhte Angebot von Antioxidantien im Freiland bzw. der höhere Gehalt von nicht oxidierten Schutzmolekülen im Gewächshaus deutet auf die verschiedenen Umgebungsbedingungen hin.

### Pigmente

Auch im Gewächshausexperiment wurden keine Transgen bedingten Veränderungen in den Gerstepflanzen gefunden. Der Phosphatmangelboden bewirkte eine tendenzielle Erhöhung der Pigmenten Violaxanthin, Lutein, Transneoxanthin sowie des Pigmentst 416-437-464 (s. Abb 31).

Im Vergleich zum Feldexperiment waren allgemein die Gehalte von  $\beta$ -Carotin etwa um die Hälfte, die von Chlorophyll b, sowie Antheraxanthin und Zeaxanthin etwa ein Drittel niedriger. Die Gehalte von Transneoxanthin bzw. von dem Pigment 416-437-464 waren dagegen um das Dreifache bzw. das Doppelte erhöht.



### Abb. 31: Messung der Pigmentgehalte

oben Freilandversuch 2007, unten Gewächshausexperiment 2007

Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Phosphatdüngung (+P). Frischgewicht (FW)

### Metabolite der Glykolyse und des Citratcyclus im Gewächshaus

Im Gewächshausexperiment wurden lediglich Verschiebungen von Metabolitgehalten gefunden, die auf die Mykorrhizierung oder den Phosphatmangelboden zurückgeführt werden können (s. Abb.32).

Interessanterweise wurde bei der transgenen Linie anders als im Freiland keine Erhöhung des Malatgehaltes durch Mykorrhizierung, sondern sogar eine geringe, noch signifikante Erniedrigung gefunden. Unter Mykorrhizierung sind tendenziell auch die Gehalte weiterer Karbonsäuren wie Isocitrat, Citrat, Succinat, Fumarat und Shikimat reduziert. Möglicherweise ist im Gewächshaus unter den optimierten Laborbedingungen die Turnoverrate der Karbonsäuren höher, so daß sie weniger stark akkumulieren.

Bei den phosphorylierten Metaboliten (3PG, Ru15P2, UDP-Glucose, PEP, ADP, G6P, F6P, F16BP, ADP-Glucose, AMP, E4P, G1P, UDP, S6P, DHAP UDPNAG) wirkt sich die

Mykorrhizierung positiv auf den Gehalt aus. Erwartungsgemäß wurden die Gehalte durch eine zusätzliche Phosphatdüngung noch gesteigert.

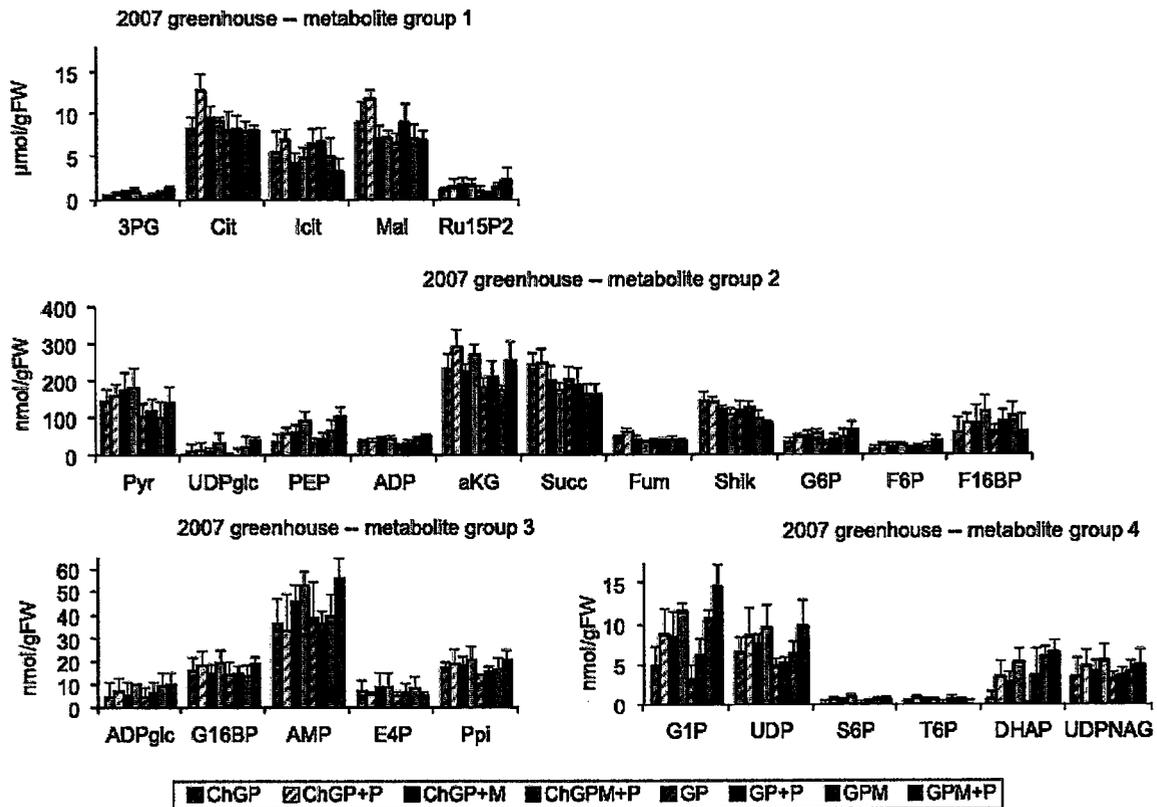


Abb. 32: Messung der Metaboliten der Glykolyse u. des Citratcyclus

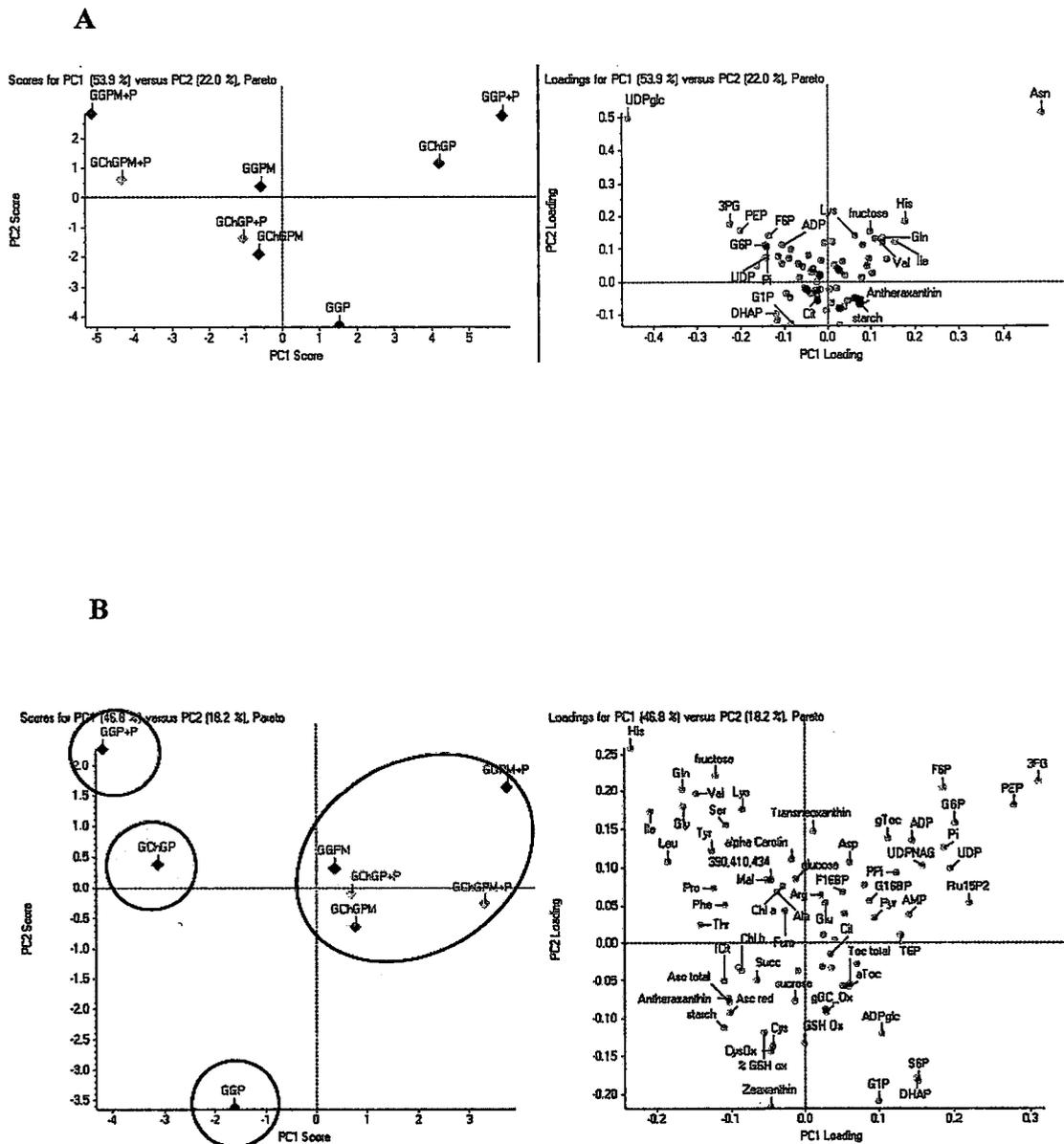
Die Metabolite wurden je nach Gehalt in 4 Gruppen eingeteilt  
Transgene Chitinase (CH) und Glukanase (Glu), Kultivare Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Mykorrhiza Kultivierung (M). Phosphatdüngung (+P). Frischgewicht (FW)

### Cluster- und Hauptkomponentenanalyse Gewächshaus

Wie erwartet wurde in der Clusteranalyse der Feld- und Gewächshausversuch klar in zwei Blöcke getrennt. Die unterschiedlichen Standorte wirken sich demnach deutlich auf die Metabolitgehalte aus (Abb.33-34). Besonders ist dies in der Heatmap von Abbildung 34 zu erkennen, wo nur die Sorte Golden Promise analysiert wurde. So ergeben sich aus dem Dendrogramm über den Metaboliten zwei große Cluster, in denen sich die Metabolitkonzentrationen der Feld- und Gewächshauspflanzen gegensätzlich verhalten. Die Heatmap der Gewächshauspflanzen zeigt Unterschiede in den Metabolitgehalten, die aus der Mykorrhizierung bzw. der Phosphatdüngung resultieren. So fallen die transgenen mykorrhizierten Golden Promise jeweils mit ihren Kontrollen in ein Cluster. Transgenbedingte Metabolitverschiebungen können wiederum nicht festgestellt werden.

Die Clusteranalyse deutet die Trennung der Gewächshauslinien nach Mykorrhizierung und Phosphatverfügbarkeit an. Diese Ansicht wird auch durch die Hauptkomponentenanalyse in

Abb. 32 unterstützt. Nach sukzessiver Eliminierung der Extremwerte, dem Asparagin (Abb. 26) aus der rechten oberen Ecke des Plots und dem Wert für UDP-Glucose (Abb. 32 Gruppe 2) aus der linken oberen Ecke, wird die zu Beginn noch schlecht interpretierbare erste Hauptkomponente deutlicher. PC1 hat eine hohe Varianzabdeckung von 46,8%. Beeindruckend „ziehen“ viele phosphorylierte Metabolite wie 3PG, PEP, Ribulose 1,5-Diphosphat, F6P, G6P, zur positive Richtung von PC1.



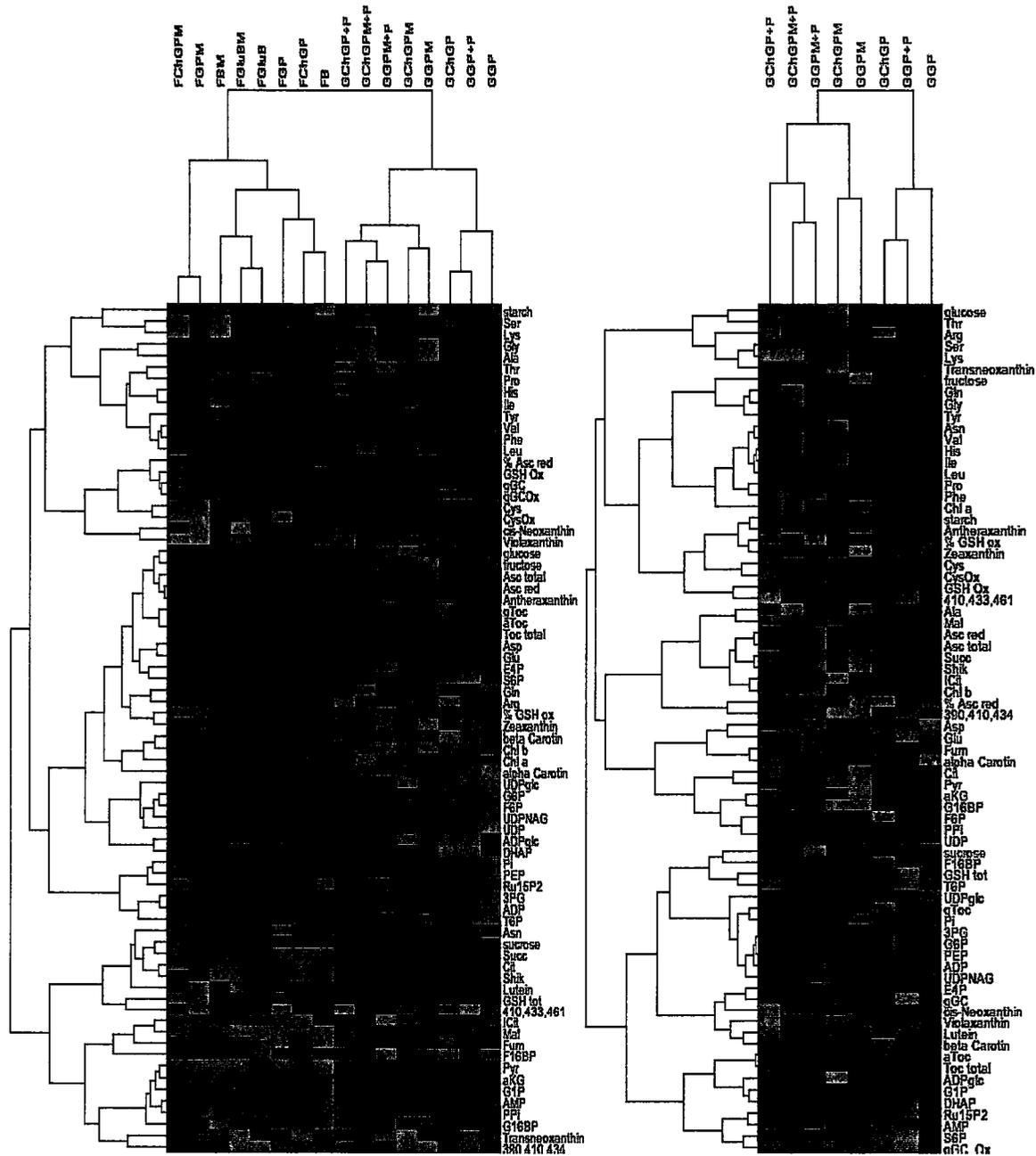
**Abb.35** Hauptkomponentenanalyse zum Gewächshausexperiment,

Transgen Chitinase (Ch), Sorte Golden Promise, (GP), Kultivierung mit Mykorrhiza (M), Phosphatdüngung (+P), alle anderen Linien sind auf Phosphatmangelboden kultiviert, Gewächshaus (G)

A, Die Metabolite UDPglucose und Asparagin im oberen Rand des Ladungsplots wurden sukzessive eliminiert, um zu einer deutlicheren Trennung zu kommen.

B Mykorrhizierte Linien sind, mit einer Ausnahme, rechts im Scoringplot, nicht mykorrhizierte auf der linken Seite





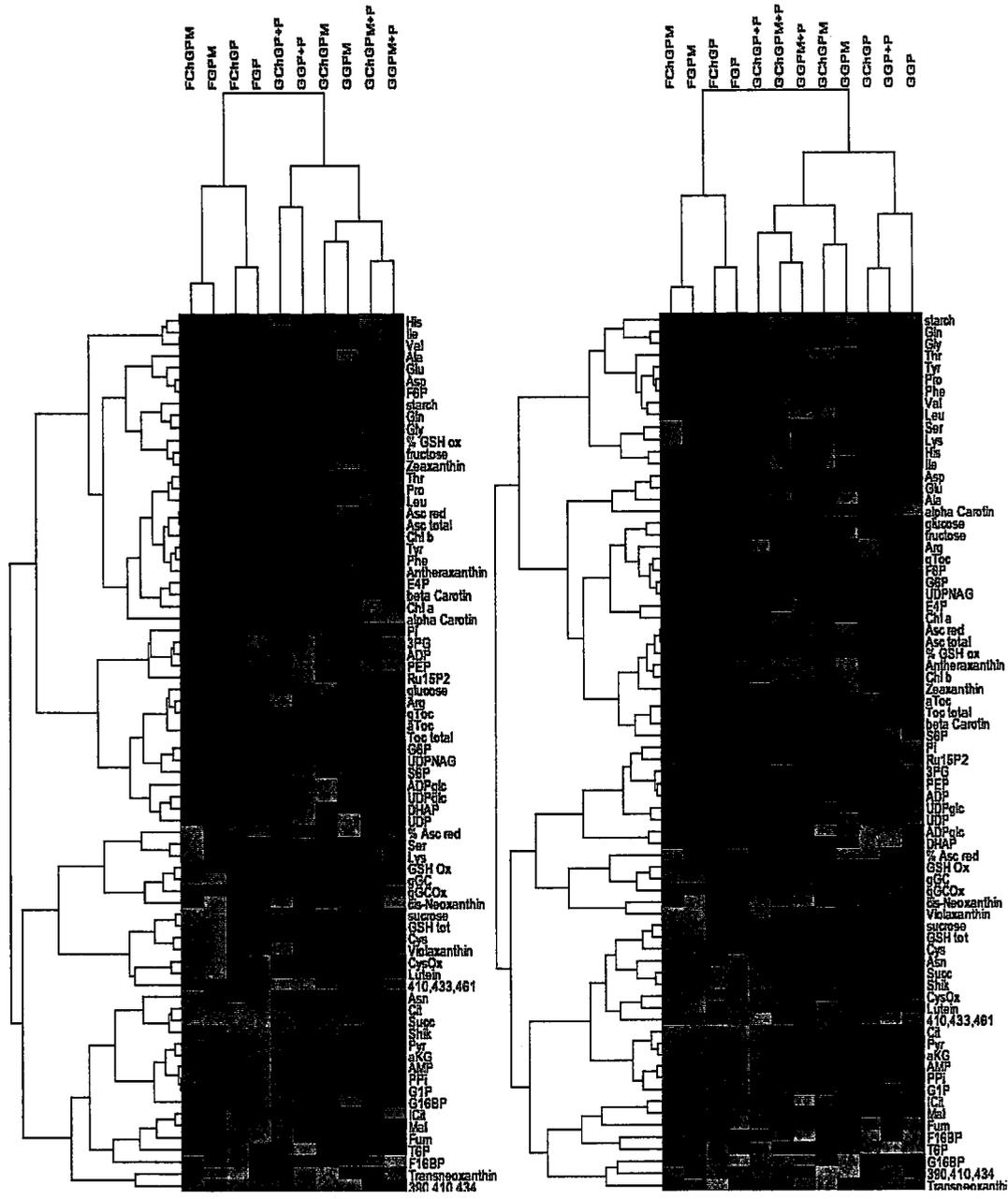
2007Feld I Gewächshaus

2007 Gwhs

Abb.33 Vergleich von Clusteranalysen, Freiland- und Gewächshausexperiment

Links, Analyse mit allen Linien; Rechts, nur Gewächshausexperiment mit Linie Golden Promise. Die Mittelwerte aus vier biologischen Proben wurden mit dem Programm TreeView dargestellt. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an.

Transgene Chitinase (Ch) und Glucanase (Glu), Kultivare: Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Feld- (F) und Gewächshausexperiment (G) Linien mit Mykorrhiza (M), Phosphatdüngung (+P)



2007Feld I Gewächshaus

2007Feld I Gewächshaus

Abb.34 Clusteranalysen von Freiland- und Gewächshausexperiment 2007

Links, Analyse mit allen Golden Promise Linien ohne Phosphatmangel; Rechts, alle Golden Promise Linien; Die Mittelwerte aus vier biologischen Proben wurden mit dem Programm TreeView dargestellt. Rote Felder zeigen erhöhte Werte, grüne Felder erniedrigte Werte an. Transgene Chitinase (Ch) und Glucanase (Glu), Kultivare: Golden Promise (GP) und Baronesse (B), Feld- (F) und Gewächshausexperiment (G) Linien mit Mykorrhiza (M), Phosphatdüngung (+P)

## **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Im Jahr 2007-2008 wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Giessen Metabolomanalysen und Transkriptomanalysen von Blättern transgener Gerstenpflanzen, die unter Feldbedingungen angepflanzt wurden, durchgeführt.

Neben mykorrhiza-bedingten Einflüssen wurden sowohl im Freiland- als auch im Gewächshausexperiment, wie erwartet, sortenspezifische Unterschiede zwischen den Pflanzen gefunden. Phosphatdüngungseffekte an den Gewächshauspflanzen wurden ebenfalls festgestellt. **Transgen-bedingte signifikante Verschiebungen von Transkript- bzw. Metabolitgehalten konnten nicht nachgewiesen werden.**

### **Vergleich des Stands des Vorhabens mit der ursprünglichen Planung:**

Alle Ziele des ursprünglichen Arbeitsplans wurden weitestgehend erreicht. Einschränkend ist anzumerken, dass auf Grund von wiederholten Feldzerstörungen der Einfluss der Transgenexpression auf das Gerstenkorn nicht untersucht und die vorgesehenen unabhängigen Wiederholungen der Messungen nicht durchgeführt werden konnten. Dennoch sind die erhobenen Daten aus den Jahren 2006 und 2007 robust und zeigen, dass Sorten- und Umwelteinflüsse einen signifikanten Einfluss auf die Transkript und Metabolitzusammensetzung der Gerstenblätter haben, wohingegen die Expression einer zusätzlichen Chitinase hier keinen messbaren Einfluss hat. Diese Schlussfolgerung wird auch durch Gewächshausdaten gestützt, die ebenfalls keinen Transgeneffekt auf metabolischer Ebene zeigten.

### **II. 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Vgl. hierzu Bericht vom 26.05.2009 von Frau Kollert, Fridrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg.

### **II. 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Wie dem Arbeitsbericht (II.1.) zu entnehmen ist, wurden im Wesentlichen die geplanten und begutachteten Arbeiten durchgeführt.

### **II.4. Darstellung des voraussehbaren Nutzens und der Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Ziel der Arbeiten war nicht die Produktentwicklung, sondern die Sicherheitsbewertung transgener bzw. herkömmlicher Gerstensorten bezüglich ihrer Interaktion mit Pilzen und ihren Inhaltstoffe. Die erzielten Ergebnisse zeigen dass,

- (1) zwischen unterschiedlichen Gerstensorten sehr erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Zusammensetzung bestehen können
- (2) Ein Einfluss der untersuchten Transgene auf die substantielle Äquivalenz der Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnte
- (3) Belegt, dass sowohl Transkriptom- als auch Metabolomanalysen zur

Risikobetrachtung herangezogen werden können.

Diese Befunde sind für die biologische Sicherheitsforschung von großem Nutzen.

**II.5. während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Nicht zutreffend

**II.6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen**

Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeiten werden derzeit für eine Veröffentlichung mit dem Titel „Global transcriptome and metabolome profiling of field grown transgenic barley plants reveals no transgene induced differences but clear cultivar specific expression patterns“ vorbereitet.

**III. Erfolgskontrollbericht**

**III.1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen**

Gemäß Bekanntmachung der Förderrichtlinien waren die Ziele des Förderschwerpunkts „die Verbesserung der Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen und die Förderung der Sicherheitsforschung zur Begleitung von Freilandversuchen mit gentechnisch veränderten Pflanzen.“ Einer der hierbei verfolgten Schwerpunkte waren: “Untersuchungen zur biologischen Sicherheit von Auswirkungen gentechnischer Veränderungen – insbesondere Pilzresistenz“ bei Getreiden.

Gemäß dieser Ziele sind die Beiträge des vorliegenden Projekts (i) der Nachweis der substantiellen Äquivalenz transgener Gerstenpflanzen und untransformierten Kontrollpflanzen, (ii) der Nachweis, dass Sortenunterschiede den Einfluss der untersuchten Transgene beiweitem übersteigen und (iii) das Metabolom- und Transkriptomanalysen zur Sicherheitsbewertung transgener Pflanzen herangezogen werden können.

**III.2. wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens**

Ziel der Arbeiten in Teilprojekt 2 war es, die substantielle Äquivalenz der transgenen Pflanzen zu untersuchen. Dazu wurden eine begrenzte Metabolomanalyse anhand eines Spektrums von Primär- und Sekundärmetaboliten sowie vergleichende Analysen der Transkriptome der unterschiedlichen Genotypen durchgeführt. So wurden im Jahr 2006 und 2007 mit den etablierten Methoden die Messungen von Zuckermetaboliten, Antioxidantien, Aminosäuren, Citratzyklus Intermediaten und Pigmenten vorgenommen. Im Berichtszeitraum 2008 wurden unsere Analysen durch eine neu entwickelte Methode zur Erstellung metabolischer Fingerprints erweitert. Darüber hinaus wurde mit der Firma Agilent ein Gersten DNA-Chip entwickelt, der ca. 42.000 Gerstengene repräsentiert und damit ca. doppelt so viele Gene adressiert, wie der kommerziell erhältliche Affymetrix Chip.

Nach Optimierung und zum Teil Neuentwicklung unserer Messverfahren liegen nun gesicherte Daten zu 72 bekannten Pflanzenmetaboliten vor. Darüber hinaus wurden >300 Massenpeaks mittels ungerichteter Metabolomanalyse reproduzierbar detektiert und in den Sortenvergleich miteinbezogen.

**Basierend auf den Metabolom und Transkriptomdaten ergaben sich keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen nicht-transgenen und transgenen Gerstenpflanzen.**

Darüber hinaus konnte kein Einfluss der Transgenexpression auf die Besiedelung der Gerstenpflanzen durch *Glomus mosseae* beobachtet werden. Überraschenderweise wurden allerdings massive Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Gerstenlinien, Golden Promise und Baronesse, festgestellt. Hierbei ergab die Transkriptomanalyse, dass mehr als 2000 Gene in beiden Sorten unterschiedlich stark exprimiert werden. Hierbei war auffällig, dass eine große Anzahl Abwehr-assoziiertes Gene in Golden Promise erhöht exprimiert wurden. Dies könnte mit der erhöhten Suszeptibilität dieser Sorte gegenüber Baronesse erklärbar sein. *Glomus mosseae* Besiedelung der Wurzeln führte bei Golden Promise zu klaren transkriptionellen und metabolischen Änderungen im Blatt. Diese Veränderungen konnte im Fall von Baronesse nicht eindeutig festgestellt werden. Dies mag mit einer eventuell niedrigeren Besiedelung durch den Mycorrhiza Pilz erklärt werden.

### **III.3. Fortschreibung des Verwertungsplans**

Nicht zutreffend

### **III.4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben**

Nicht zutreffend

### **III.5. Präsentationsmöglichkeiten für Anwender**

Nicht zutreffend

### **III.6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung**

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde gemäß dem ursprünglichem Antrag beziehungsweise der zusätzlichen Erweiterungen (kostenneutrale Projektverlängerung) eingehalten.

## IV. Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart Abschlußbericht
3a. Titel des Berichts Auswirkung von Pilzresistenzgenen auf Inhaltstoffe und deren Wechselwirkung mit assoziierten Pilzen	
3b. Titel der Publikation Global transcriptome and metabolome profiling of field grown transgenic barley plants reveals no transgene induced differences but clear cultivar specific expression patterns	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Karl-Heinz Kogel, Diter von Wettstein, Uwe Sonnwald	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.09.2008
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Karl-Heinz Kogel, Gregor Langen, Jafargholi Imani, Jörg Hofmann, Alfred Schmiedl, Lars M. Voll, Sophia Sonnwald, Diter von Wettstein, Uwe Sonnwald	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Artikel in Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)  Research Centre for Biosystems, Land Use, and Nutrition (IFZ), Justus Liebig Universität, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany  Lehrstuhl für Biochemie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen, Germany  Department of Crop & Soil Sciences, Washington State University, Pullman, WA 99164-6420, USA	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 0313282C
	11a. Seitenzahl Bericht 51
	11b. Seitenzahl Publikation <6
	12. Literaturangaben in Planung
13. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  53170 Bonn	14. Tabellen in Planung (ca. 4)
	15. Abbildungen in Planung (ca. 8)
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Transgenic barley plants expressing either seed-specific (1,3-1,4)- $\beta$ -glucanase or ubiquitous <i>T. harzimum</i> chitinase were grown under field conditions to study possible adverse effects of transgene expression. To this end leaf samples were harvested and subjected to transcriptome and metabolome profiling. In addition possible adverse effects of chitinase expression on the interaction between transgenic barley and arbuscular mycorrhiza fungi of the genus <i>Glomus</i> were investigated. Based on transcriptome and metabolome analysis no statistically significant differences between transgenic and non-transgenic barley plants could be detected. Furthermore, no influence of transgene expression on colonization of barley roots by <i>Glomus species</i> was found. Surprisingly, however, significant differences between Golden Promise and Baroness could be determined. Based on transcriptome analysis more than 2000 transcripts differed between both varieties. Interestingly, a large number of defence associated genes was strongly up-regulated in Golden Promise. This might be due to the higher susceptibility of Golden Promise to fungal infection as compared to Baroness. In case of Golden Promise a clear distinction between <i>Glomus</i> colonized and non-colonized plants could be achieved on the basis of leaf transcriptome and metabolome analysis. This distinction was impossible in case of Baroness, possibly indicating a lower colonization frequency by <i>Glomus</i> of this genotype.	
19. Schlagwörter barley, chitinase, glucanase, transgene effects, mykorrhiza, transcriptome, metabolome, genetic variability	
20. Verlag	21. Preis