

Metabolische und transkriptionelle Studien zur Trockentoleranz der Gerste

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Christian Franz Schuy

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2021

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. Wolfgang Achtziger

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Prof. Dr. Lars Voll

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Schuy C, Groth J, Ammon A, Eydam J, Baier S, Schweizer G, Hanemann A, Herz M, Voll LM, Sonnewald U (2019) Deciphering the genetic basis for vitamin e accumulation in leaves and grains of different barley accessions. *Scientific Reports* 9, 9470, DOI: 10.1038/s41598-019-45572-7

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Zusammenfassung	III
III.	Summary	V
1.	Einleitung	1
1.1.	Kulturpflanzen im Klimawandel	1
1.2.	Reaktionen auf Trockenheit	1
1.3.	Gerste und Züchtung	3
1.4.	Wegbereitende Arbeiten	4
1.5.	Tocochromanol/Vitamin E	7
1.5.1.	Historisches und Struktur	7
1.5.2.	Antioxidative Wirkung	9
1.5.3.	Biosynthese	11
1.6.	Rollgewächshaus Experimente	14
1.7.	Transkriptomanalysen	18
1.7.1.	Überblick	18
1.7.2.	Probenauswahl	19
1.8.	Zielsetzung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
2.2.	Oligonukleotide	25
2.3.	Pflanzenmaterial und Sortenliste	26
2.4.	Pflanzenanzucht im RGH und Wachstumsparameter	27
2.5.	Probennahme von Blattproben	27
2.6.	Probennahem von unreifen Körnern	28
2.7.	DNA-Extraktion	28
2.8.	RNA-Extraktion	28
2.9.	PCR, Gelelektrophorese und Gelaufreinigung	29
2.10.	cDNA Synthese und qPCR	29
2.11.	Sanger-Sequenzierung und Sequenzverwaltung	30
2.12.	Kartierung von Strukturgenen	30
2.13.	KASP-Marker	31
2.14.	CAPS-Marker	31
2.15.	SNP-Chip	32
2.16.	GWAS	32
2.17.	Analyse der Populationsstruktur	32
2.18.	Bestimmung des Tocochromanolgehalts	35
2.19.	Statistische Analysen und weitere verwendete Programme	35
2.20.	RNAseq Analysen	36
2.21.	GO-Anreicherung und KEGG Kategorien	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Validierung eines Tocopherol QTLs auf Chromosom 7H und weiterführende Analysen zum Tocochromanolgehalt in Gerstenpflanzen	38
3.1.1.	Messung des Tocochromanolgehalts in Blättern	38
3.1.2.	Bestimmung genetischer Marker und Assoziation zum Tocochromanolgehalt in Blättern	39
3.1.3.	GWAS zum Tocochromanolgehalt in Blättern	41
3.1.4.	Verankerung von Strukturgenen im Gerstengenom	43
3.1.5.	Variabilität der <i>HPT-7H</i> und Verbindung zu SNP-Markern	44
3.1.6.	Zusammenhang zwischen Tocochromanolgehalt in Blättern und Variabilität der <i>HPT-7H</i>	48
3.1.7.	Einfluss der Populationsstruktur	50
3.1.8.	Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf den Tocochromanolgehalt in Blättern	52
3.1.9.	Expressionshöhe der <i>HPT-7H</i> in Blättern in Abhängigkeit der Allele und Einfluss auf den Tocochromanolgehalt	53
3.1.10.	Messung des Tocochromanolgehalts in reifen Körner	57
3.1.11.	GWAS zum Tocochromanolgehalt in reifen Körnern	57
3.1.12.	Variabilität der <i>HGGT</i> und Verbindung zur <i>HPT-7H</i>	58
3.1.13.	Zusammenhang zwischen dem Tocochromanolgehalt in reifen Körnern und der Variabilität der <i>HGGT</i> und <i>HPT-7H</i>	60

3.1.14.	Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf den Tocochromanolgehalt in reifen Körnern	62
3.1.15.	Messung des Tocochromanolgehalts und der Expressionshöhe der <i>HPT-7H</i> und <i>HGGT</i> in unreifen Körnern.....	63
3.1.16.	Verlauf des Tocochromanolgehalts in unreifen Körnern.....	65
3.1.17.	Verlauf der Expressionshöhen von <i>HPT-7H</i> und <i>HGGT</i> in unreifen Körnern und Einfluss auf den Tocochromanolgehalt.....	68
3.1.18.	Einfluss des Tocochromanolgehalts auf die Stressresistenz von Gerstenpflanzen.....	71
3.2.	Transkriptomanalysen.....	74
3.2.1.	Überblick über die Transkriptomstruktur.....	74
3.2.2.	Normalisierung der <i>count</i> -Werte und Gene mit der stärksten Expression.....	78
3.2.3.	Durch Trockenstress differentiell exprimierte Gene.....	79
3.2.4.	Gene, deren Aktivität mit Ertragsstabilität korreliert.....	84
3.2.5.	Technische Validierung der Daten über RT-qPCR.....	88
3.2.6.	Biologische Validierung im Jahr 2016	89
3.2.7.	Biologische Validierung im Jahr 2018	91
4.	Diskussion.....	95
4.1.	Analysen zum Tocochromanolgehalt.....	95
4.1.1.	Aufschlüsselung eines Tocopherol-QTLs im Blatt.....	95
4.1.2.	Weitere QTLs zum Tocochromanolgehalt in Gerste.....	97
4.1.3.	Verteilung der Tocochromanolarten	98
4.1.4.	Kein Einfluss auf die Fitness der Pflanzen im RGH.....	101
4.1.5.	Tocochromanolakkumulation im RGH als Reaktion auf Stress	101
4.1.6.	Tocopherolvermittelte Stresstoleranz	103
4.1.7.	Jenseits der Pflanzenfitness.....	104
4.2.	Transkriptomanalysen.....	106
4.2.1.	Nehmen Fahnenblätter -1 Einfluss auf die Kornfüllung?	106
4.2.2.	Im RGH wurde kein Trockenschock appliziert.....	107
4.2.3.	Potenzieller Einfluss der Synthese und Wahrnehmung von Phytohormonen auf intrazelluläre Signalkaskaden	109
4.2.4.	Regulation der Stickstoff- und Kohlenstoff-Verteilung	112
4.2.5.	Einfluss auf die Regulation der Stomata?.....	115
4.2.6.	Spezifisch durch Trockenstress reguliert.....	115
4.2.7.	Aktivität assoziiert mit Ertragsstabilität	117
4.2.8.	Einfluss auf zentrale Energiestoffwechselwege.....	120
4.2.9.	Das augenscheinlich auffälligste Expressionsmuster	123
4.2.10.	Einschätzungen zur Stabilität der gefundenen Assoziationen	127
4.2.11.	Abschließende Anmerkungen, Fazit und Ausblick	129
5.	Verzeichnisse.....	132
5.1.	Literaturverzeichnis.....	132
5.2.	Abbildungsverzeichnis	150
5.3.	Tabellenverzeichnis	151
5.4.	Abkürzungsverzeichnis	152
6.	Anhang.....	154
6.1.	Kartierung der Strukturgene.....	154
6.2.	Auflistung der Anhänge in digitaler Form	154
7.	Danksagung.....	155

II. Zusammenfassung

Der Klimawandel birgt viele gesellschaftliche Herausforderungen. Zweifellos stellen die zunehmenden Wetterextreme auch für Nutzpflanzen eine große Herausforderung dar. Um den Nahrungs- und Futtermittelbedarf der wachsenden Weltbevölkerung zu decken, sollen sie auch in Zukunft hohe Erträge liefern. Ein Faktor, der entscheidend sein wird, dass die Landwirtschaft auch unter den sich abzeichnenden Umweltbedingungen stabile Erträge generieren kann, ist die Entwicklung von neuen Pflanzensorten, die besser mit den widrigen Wachstumsbedingungen umgehen können. Um die Entwicklung von neuen Gerstensorten (*Hordeum vulgare* L.) zu unterstützen, sollten molekulare und physiologische Reaktionen von Gerstenpflanzen untersucht werden, die förderlich für die Vitalität und Ausdauer der Pflanzen unter Trockenstress sein könnten. Zu diesem Zweck wurde ein Set genetisch vielfältiger Gerstengenotypen in einem Rollgewächshaus (RGH) angebaut. Die Pflanzen wuchsen unter feldnahen Bedingungen sowohl unter hoher als auch unter dauerhaft reduzierter Wasserverfügbarkeit.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Pflanzen auf den Gehalt von Tocopherol und Tocotrienol getestet. In Biomembranen können diese, auch als Vitamin E bezeichneten, lipophilen Verbindungen, die Ausbreitung der Lipidperoxidation verhindern, die insbesondere bei oxidativem Stress auftreten kann. Dies wurde bereits als vorteilhaft für das Wachstum von Pflanzen unter diversen abiotischen Stressszenarien beschrieben. Vorangegangene genomweite Assoziationsstudien (GWAS) deuteten darauf hin, dass eine *Homogentisat-Phytyltransferase* (*HPT-7H*) und eine *Homogentisat-Geranylgeranyltransferase* (*HGGT*), zwei Gene der Vitamin E Biosynthese auf Chromosom 7H, signifikant die Akkumulation von Vitamin E in Blättern respektive Körnern beeinflussen können. Die Identifikation von allelischen Variationen beider Gene, die mit hohen oder niedrigen Mengen an Vitamin E in verschiedenen Geweben in Verbindung standen, bestätigten diese Vermutungen. Auch abhängig von den verschiedenen Allelen, wurde in Blättern durch Trockenheit die Akkumulation von *HPT-7H*-Transkripten induziert, und somit proportional die Akkumulation von Tocopherolen. Auf Grundlage der gesammelten Informationen können genetische Marker konstruiert werden, die bei der markerassistierten Züchtung von Gerstensorten eingesetzt werden können, welche einen höheren Vitamin E Gehalt aufweisen und gegenüber oxidativen Schäden toleranter sein können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Blatttranskriptom von acht ausgewählten Gerstensorten analysiert. Vier dieser Genotypen wiesen eine hohe und vier eine niedrige Ertragsstabilität unter Trockenstress auf. Die Ertragsstabilität wurde als repräsentatives Maß für die Fitness der Pflanzen gewählt. Globale Transkriptomanalysen sollten einen Einblick in multiple molekulare und physiologische Reaktionen der Pflanzen ermöglichen, die durch

ungünstige Wachstumsbedingungen hervorgerufen werden. Es gab Anzeichen, dass die Pflanzen im RGH keinen Trockenschock erlitten. Der im RGH graduell und anhaltend applizierte Trockenstress dürfte besonders gut geeignet gewesen sein, die Reaktionen von Pflanzen abzuschätzen, die auch beim Anbau im Feld unter Wassermangel auftreten.

Für jeden Genotyp wurden Gene identifiziert, die differentiell durch Trockenstress exprimiert waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in erster Linie Gene betrachtet, die in mehreren Genotypen auf den Trockenstress reagierten. Eine geteilte Antwort multipler Genotypen deutet auf eine besonders konservierte Funktion hin, die womöglich besonders relevant für die Adaption an den Stress sein könnte. Zunächst wurden die Gene betrachtet, die in allen acht Genotypen differentiell durch den Wassermangel reguliert wurden. Anschließend wurden Gene betrachtet, die nur spezifisch in allen vier ertragsstabilen oder spezifisch in allen vier ertragsinstabilen Genotypen differentiell exprimiert wurden. Es fanden sich nur wenige Gene, die den beiden letzten Kriterien entsprachen. Um weitere Gene zu identifizieren, die einen Unterschied in den trocken sensitiven und toleranten Genotypen vermitteln könnten, wurden Gene identifiziert, deren Aktivität mit der Ertragsstabilität in Verbindung stand. Somit wurden Gene betrachtet, die zwischen den verschiedenen Genotypen differentiell reguliert waren. Im Allgemeinen war keines dieser Gene durch den Trockenstress reguliert. In einigen Fällen konnte die Aktivität dieser Gene mit verschiedenen Allelen in Verbindung gebracht werden. Es wird davon ausgegangen, dass die genotypspezifische Aktivität dieser Gene den physiologischen Zustand der Pflanzen unabhängig von den betrachteten Wachstumsbedingungen beeinflusste. Die ausgelösten metabolischen Veränderungen ermöglichten den ertragsstabilen Pflanzen womöglich besser auf den Wassermangel zu reagieren.

Für einige der identifizierten Gene wurde der mögliche Einfluss auf die Trockenadaption im Kontext der molekularen Funktion diskutiert. Darunter waren eine Reihe von Genen, die intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen könnten und somit auch die Expression weiterer Gene. Dies wurde auch für einige Gene vermutet, die an der Wahrnehmung und Biosynthese von Pflanzenhormonen beteiligt sind. Darüber hinaus gab es Grund zur Annahme, dass die Pflanzen die Aktivität zentraler N- und C-Stoffwechselwege als Reaktion auf Stress veränderten. Dabei wiesen trocken tolerante Genotypen womöglich eine höhere Rate der Zellatmung auf. Eine effektivere Energiegewinnung könnte bei der Bewältigung von Trockenstress von Vorteil sein. Eine dauerhaft erhöhte Rate der Zellatmung könnte jedoch mit generell niedrigeren Ertragsleistungen in Verbindung stehen. Auf Grundlage von technischen und biologischen Validierungen der Expressionswerte wurde bewertet, ob die gefundenen regulatorischen Merkmale eine geeignete Grundlage für künftigen Ansätze darstellen könnten, die Trockenanpassung von Gerste zu studieren.

III. Summary

One of the many consequences of the imminent climate change will undoubtedly be that our crop plants will have to cope with much more extreme climate conditions while maintaining high yield to sustain the food and feed demand for the increasing world population. One aspect to facilitate stable revenues is the development of new crop cultivars that are better suited to embrace the looming changes in their habitats. By improving the understanding of the molecular and physiological responses of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants that promote vigour and endurance under periods of drought stress one can hope to aid the development of future-proven cultivars. To that end a genetically diverse set of barley accessions was grown under near field conditions in a rainout shelter and has been subjected to well provided as well as lasting reduced water supply.

In the first part of this thesis, these plants were analysed for their content of tocopherols and tocotrienols. Commonly referred to as vitamin E these lipophilic compounds can protect biomembranes by preventing the propagation of lipid-peroxidation especially during oxidative stress. Beneficial effects of increased contents of vitamin E on plant growth have been reported before. Preceding genome wide association studies (GWAS) implied that two genes located on the barley chromosome 7H, a *Homogentisate phytyltransferase* (*HPT-7H*) and a *Homogentisate geranylgeranyltransferase* (*HGGT*), influence the vitamin E accumulation of different barley accessions in leaves and grains respectively. The allelic variations of those two genes were unravelled connecting the genetic basis to high and low vitamin E contents in different tissues. The level of *HPT-7H* transcripts was induced by drought in an allele-dependent manner and proportionally induced the accumulation of tocopherols. Based on the gathered information, genetic markers can be constructed that could assist in the smart breeding of high vitamin E barley varieties potentially more tolerant to oxidative damage.

In the second part of this thesis, the leaf transcriptome of eight chosen barley varieties was dissected. Under drought stress four genotypes displayed high yield stability and four genotypes low yield stability. Yield stability was chosen to represent the overall fitness of the plants. Global transcriptome analyses were presumed to give insight into many molecular and physiological responses provoked by disadvantageous growth conditions. Indications at multiple points manifested that the applied water withdrawal had no shock-like characteristics. Rather gradually increasing and lasting water shortage affected the plants in a way that is said to be more relevant when studying the effects of water shortage under field conditions. For each genotype, genes differentially expressed by drought have been identified. However, for this thesis emphasis was primarily put on identifying common responses of genotypes as their conserved reaction might be fundamentally more relevant for the adaption to adverse growth conditions. Therefore, genes were regarded that

displayed differential expression in all eight genotypes or specifically in either all four drought-tolerant genotypes or in all four drought-susceptible genotypes. In a second approach, genes have been identified that showed either higher or lower activity in genotypes with contrasting yield stability. Thus, genes have been identified that primarily displayed activity in a genotype dependent manner that is linked to yield stability. Coincidentally, those genes did not display differential regulation by drought, but in many cases could be linked to different alleles. It is discussed how these genes might fundamentally influence the physiological state of the plants already under well provided growth conditions, priming the plants for the onset of possible adverse circumstances. Among all identified genes several were chosen and discussed thoroughly in the context of drought adaption. A number of genes might influence intracellular signalling mechanisms and therefore regulated the expression of further downstream genes. Some genes were found to participate in the perception and homeostasis of phytohormones possibly enabling systemic drought signalling throughout the plant. Furthermore, several observations indicate that the plants changed the activity of central N- and C-metabolic pathways as a reaction to stress. Additionally, drought tolerant genotypes might be more efficient in generating energy through respiration, which might be beneficial in coping with drought stress. Potential penalties on overall yield performance are hinted at. Based on technical and biological validation an assessment is given whether the discussed regulatory features might be exploitable for future contemplations and approaches in studying the drought adaption of barley plants.

1. Einleitung

1.1. Kulturpflanzen im Klimawandel

Im Zeichen sich drastisch verändernder Klimabedingungen und steigender Bevölkerungszahlen steht die Landwirtschaft vor großen Herausforderungen (Lesk et al. 2016). Trockenheit und Hitze stellen limitierende Faktoren für den Anbau von Nutzpflanzen dar (Fahad et al. 2017). Reduzierte Niederschläge und vor allem veränderte Niederschlagsperioden verursachen weltweit Dürren (Lobell et al. 2011), die das Pflanzenwachstum und damit die Erträge negativ beeinflussen können (Barnabas et al. 2008). So schlussfolgerten beispielsweise Daryanto et al. (2016), dass allein in den Jahren 1980 bis 2015 der Ertrag des weltweiten Weizen- (*Triticum aestivum* L.) und Maisanbaus (*Zea mays* L.) um durchschnittlich 26 % respektive 40 % durch Trockenheit beeinträchtigt war und zukünftig noch stärker betroffen sein wird. Trockenstress beeinflusst multiple Aspekte des Pflanzenwachstums, von reduzierter Aktivität der Photosynthese (Flexas et al. 2004) bis zur unterbrochenen Verteilung von Nährstoffen und Photoassimilaten (Farooq et al. 2009), die letztlich mit reduzierten Erträgen einhergehen können (Praba et al. 2009, Urban et al. 2017). Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten den Einflüssen des Klimawandels auf die Landwirtschaft entgegenzuwirken, von Substitutionsmaßnahmen im Feld wie künstlicher Bewässerung, bis hin zur Züchtung von neuen Pflanzensorten, die besser den widrigen Bedingungen trotzen können. Letztendlich wird die Kombination all dieser und weiterer Möglichkeiten notwendig sein, um zukünftig stabile Erträge zu gewährleisten (George et al. 2017).

1.2. Reaktionen auf Trockenheit

Eine limitierte Wasserzufuhr löst ein komplexes Geflecht aus physiologischen, zellulären und metabolischen Adaptionsmechanismen in Pflanzen aus. Je besser diese verstanden sind, umso besser können die Auswirkungen von abiotischem Stress bekämpft werden. Einige Antworten und Adaptionsmechanismen von Pflanzen auf Trockenstress sind (1) der *Escape*-Phänotyp, bei dem die Pflanzen ihren Lebenszyklus drastisch beschleunigen um dem Wassermangel zu entgehen, (2) die Vermeidung der Dehydrierung (sinkender Turgordruck) durch Eingrenzung des Wasserverlusts durch Regulation der Stomata oder effektivere Aufnahme von Wasser aus dem Boden oder (3) eine gesteigerte Toleranz gegenüber Dehydrierung durch Akkumulation von schützenden Proteinen, Aminosäuren, Zuckern oder Antioxidantien, der Aufrechterhaltung der Membranstabilität oder eine verringerte metabolische Aktivität z.B. durch Dormanz (Turner 1986, Jackson et al. 2000, Chaves et al. 2003, Barnabas et al. 2008, Fleury et al. 2010, Blum 2011, Verslues & Junenger 2011, Hu &

Xiong 2014, Jones 2014, Langridge et al. 2016). Diese adaptiven Mechanismen umfassen kurzzeitige physiologische Regulationen, reversible zelluläre Anpassungen, aber auch strukturell irreversible Veränderungen. Die Relevanz jedes Mechanismus variiert nicht nur von Pflanzenart zu Pflanzenart, sondern auch von Sorte zu Sorte und zusätzlich hängt sie stark vom Entwicklungsstadium der Pflanze und von der Art des Stresses ab (Dauer, Stärke und Frequenz). In der Praxis sind Pflanzen, die all diese Mechanismen am effektivsten kombinieren können, gegenüber Stressszenarien am besten gewappnet (Demirevska et al. 2009, Schulze & Hall 1982, Tardieu & Simonneau 1998). Die Größe der Pflanzen, eine reduzierte Blattfläche, frühe Reife und verlängerte Perioden geschlossener Stomata zählen zu den effektivsten Antworten, um die durch Trockenstress ausgelösten negativen Effekte zu verringern, wobei viele dieser Mechanismen auch den Ertrag der Pflanzen negativ beeinflussen können (Weisz et al. 1994, Mahan et al. 1995, Karamanos & Papatheohari 1999, Farooq et al. 2009, Xu et al. 2009).

Stomata sind Poren in der Epidermis der Pflanzen, die den Gasaustausch mit der Umgebungsluft ermöglichen. Der Schluss der Stomata gehört zu den ersten Reaktionen von Pflanzen, um den Wasserverlust zu limitieren (Sperry et al. 2017). Geschlossene Stomata verringern jedoch nicht nur die Rate der Transpiration, sondern schränken auch die Assimilationsrate von CO₂ ein, wodurch auch die Rate der Photosynthese sinkt und das Wachstum der Pflanzen beeinträchtigt wird (Ludlow 1989). Der Schluss der Stomata kann auf Kosten des aktuellen Wachstums vor allem kurzfristig Perioden geringer Wasserverfügbarkeit überbrücken, um den Pflanzen anschließend wieder Wachstum zu ermöglichen (Spitters & Schapendonk 1990). Bei anhaltendem Lichteinfall kommt es durch den photosynthetischen Elektronentransport zu einer Akkumulation des Elektronenakzeptors NADPH (protoniertes Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat), wenn dieser durch eine sinkende CO₂-Assimilationsrate im Ribulosebisphosphatzyklus nicht regeneriert werden kann (Schapendonk et al. 1989, Cruz de Carvo 2008, Livingston et al. 2009). NADPH kann in ungewollten Nebenreaktionen Sauerstoff (O₂) reduzieren, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Gómez et al. 2019), die oxidative Schäden verursachen können (dazu mehr in Abschnitt 1.5.2). Bei sinkender CO₂-Konzentration steigt auch die Oxygenierungsrate der RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase), was auch zur Akkumulation von ROS beiträgt (Cruz de Carvalho 2008). Einige wenige Pflanzenarten, die zur sogenannten C₄-Photosynthese oder zum Crassulaceen-Säurestoffwechsel befähigt sind, können trotz (teilweise) geschlossener Stomata noch Photosynthese betreiben, da sie das nötige CO₂ entweder räumlich oder zeitlich vorfixieren und somit unter solchen Bedingungen einen Wachstumsvorteil haben (Sage 2017). Die meisten Pflanzenarten, darunter auch Gerste (*Hordeum vulgare* L.), sind dazu jedoch nicht

befähigt, weshalb die Regulation der Stomata intensiv untersucht wird (Frank & Farquhar 2007). Gerste ist beispielsweise sehr schnell und effektiv in der Regulation der Stomata (Schäfer et al. 2018).

1.3. Gerste und Züchtung

Gerste gehört zu den ältesten Kulturpflanzen der Menschheit. Die Kultivierung kann bis ins Natufien zurückverfolgt werden, eine Kultur des Epipaläolithikums (12000 - 9500 v. Chr.) in der Levante, eine Region an der Ostküste des Mittelmeers (siehe z.B. auch Hayden et al. 2012 für weitere kulturarchäologische Aufführungen). Wirtschaftlich relevant ist Gerste heutzutage vor allem als Futtermittel und zum Malzen für die Herstellung alkoholischer Getränke (Newman & Newman 2008, Zhou 2010). Im Vergleich zu anderen Getreiden ist Gerste gut an das Wachstum unter trockenen Bedingungen angepasst, was unter anderem mit der Kultivierung in mediterranen Gegenden in Verbindung gebracht wird (González et al. 1999, Voltas et al. 1999). In ihrer Abhandlung über die Gerstenzucht beschreiben Harlan und Martini (1936) Gerste sogar als „das zuverlässigste Getreide der Menschheit, geeignet für den Anbau in den exponiertesten Gegenden der Welt, von den Oasen der Sahara bis zu den Hängen des Mount Everest“. Dabei stellen sie jedoch nicht klar, ob sie sich auf kultivierte Gerste (*Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare*) oder wilde Gerste (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) beziehen. Wilde Gerste ist der direkte Vorfahre der kultivierten Gerste, der eine noch bessere Toleranz gegenüber extremen klimatischen Bedingungen zugeschrieben wird (Harlan & Zohary 1966, Gunasekera et al. 1994). Trotz einer etwas poetischen Darstellung kamen Harlan und Martini bereits 1936 zu dem Schluss, dass das Wachstum verschiedener Gerstensorten unter extremen Bedingungen in diversen Regionen der Welt mit einem enormen genetischen Potential verknüpft sein muss, dass für die Züchtung von neuen Gerstensorten genutzt werden kann, die besser an unvorteilhafte Wachstumsbedingungen angepasst sind. Dieses Potential wird auch heute noch von Genetikern und Züchtern erkannt, die neue Quellen genetischer Variationen suchen, um diese für die Züchtung von stressresistenten Sorten zu nutzen (Ellis et al. 2000, Nevo 2006, Sharma et al. 2013). Die große Schwierigkeit dabei liegt in der erfolgreichen Identifikation und Selektion der genetischen Determinanten, die für eine gesteigerte Fitness der Pflanzen verantwortlich sind. Eine elegante Methode genetische Determinanten zu identifizieren, die mit einem gewissen Phänotyp verknüpft sind, ist die Identifikation von *quantitative trait loci* (QTLs) in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS). GWAS nutzen statistische Methoden, um Chromosomenregionen im Genom zu lokalisieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit Gene enthalten, die den gewünschten Phänotyp hervorrufen (Mauricio 2001). QTLs können

anschließend in Züchtungsprogrammen verwendet werden, um die Vererbung der genetischen Determinanten über markerassistierte Selektion (MAS) nachzuverfolgen. GWAS zur Trockentoleranz von Gerste finden sich beispielsweise für Kreuzungspopulationen von Kulturgerstengenotypen (Diab et al. 2004), für Kreuzungspopulationen von Wildgerstengenotypen mit Kulturgerstengenotypen (Sayed et al. 2012, Honsdorf et al. 2014) und für große Kollektionen von Kultur- und Wildgerstengenotypen (Varshney et al. 2012). Diese Studien assoziierten genetische Determinanten vor allem direkt mit Ertragsparametern. Wie erwähnt, können Pflanzen mit einem Geflecht verschiedenster Anpassungen auf Stressszenarien reagieren, die in Summe eine gesteigerte Fitness vermitteln (Demirevska et al. 2009). Die Untersuchung von QTLs, die mit solchen Anpassungsstrategien in Verbindung stehen, ist demnach eine valide Strategie den Einfluss von Stress auf das Wachstum von Pflanzen zu betrachten.

1.4. Wegbereitende Arbeiten

Ein Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit aufgeführten Analysen, waren vorangegangene Arbeiten, die sich bereits mit molekularen Adaptionsmechanismen von Gerstenpflanzen gegenüber Trockenheit und Hitze beschäftigten (Templer et al. 2017). Templer et al. (2017) hatten das Wachstum von 81 Sommergerstengenotypen unter gut bewässerten Bedingungen, Trockenstress und kombiniertem Trocken- und Hitzestress in Klimakammern betrachtet. Diverse morphologische und physiologische Wachstumsparameter wurden protokolliert. Zum Zeitpunkt der Blüte wurden Fahnenblätter beprobt und der Gehalt von insgesamt 57 Metaboliten bestimmt.

Der Einfluss von Trockenheit auf das Wachstum von Gerstenpflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien wird schon lange intensiv studiert (z.B. Aspinall et al. 1964, Aspinall 1965, Wells & Dubetz 1966). Es zeigte sich, dass die Pflanzen vor allem während des Ährenschiebens, der Phase der Blüte und der Kornfüllung am sensitivsten gegenüber Trockenheit sind. Die stärksten Ertragseinbußen verursacht Trockenstress während der Kornfüllung (Sánchez-Díaz et al. 2002). Das Fahnenblatt ist das oberste und damit jüngste Blatt einer Pflanze. Der Metabolismus in den obersten Blättern und den Grannen der Gerste beeinflusst die Kornfüllung, da dort die nötigen Photoassimilate für den Transport durch das Phloem bereitgestellt werden (Blum 1985, Bort et al. 1994, Rucker et al. 1995, Sánchez-Díaz et al. 2002).

Von Templer et al. (2017) wurde der Gehalt von Metaboliten des primären Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels, sowie von Metaboliten, die an antioxidativen Mechanismen beteiligt

sind, analysiert. Die Genotypen wurden mit einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Chip genotypisiert, der 7864 über das gesamte Genom verteilte SNP-Marker abdeckte. Anschließend wurden Verbindungen zwischen den makroskopischen, den molekularen und den genetischen Parametern gesucht. Zwischen den makroskopischen und den molekularen Parametern wurden Zusammenhänge gesucht, die nahelegen, dass Genotypen mit veränderten molekularen Eigenschaften ebenso veränderte makroskopische Eigenschaften, wie Ertragsparameter, aufweisen. Anschließend wurden die makroskopischen und molekularen Parameter über GWAS mit den genetischen Markern in Verbindung gebracht. Templer et al. (2017) identifizierten unter anderem für den Gehalt des Metabolits γ -Tocopherol (mehr in Abschnitt 1.5) von Pflanzen, die unter Trockenstress oder kombiniertem Trocken- und Hitzestress aufgewachsen waren, QTLs auf Chromosom 7H bei 118-122 cM (Centimorgan) (Abbildung 1). In dieser Genomregion traten folglich Unterschiede in der Ausprägung der SNP-Marker zwischen den verschiedenen Genotypen auf, die mit Unterschieden im Gehalt von γ -Tocopherol assoziiert waren.

Darüber hinaus wurde ein positiver linearer Zusammenhang zwischen dem Gehalt von γ -Tocopherol und dem Tausendkorngewicht (TKG) von Genotypen beobachtet, die unter Trockenstress aufgewachsen waren (Abbildung 2). Dementsprechend war das TKG in Genotypen größer, die einen erhöhten γ -Tocopherolgehalt in Fahnenblättern zum Zeitpunkt der Blüte aufgewiesen hatten. Templer et al. (2017) diskutierten, dass das Antioxidans γ -Tocopherol eine wichtige Rolle in der Stressadaptation spielen kann. Es könnte das Wachstum der Pflanzen positiv beeinflussen, weshalb Genotypen mit einem erhöhten Metabolitgehalt eine gesteigerte Fitness aufgewiesen haben. Die Validierung dieser Hypothese stand dabei unter anderem im Fokus dieser Arbeit.

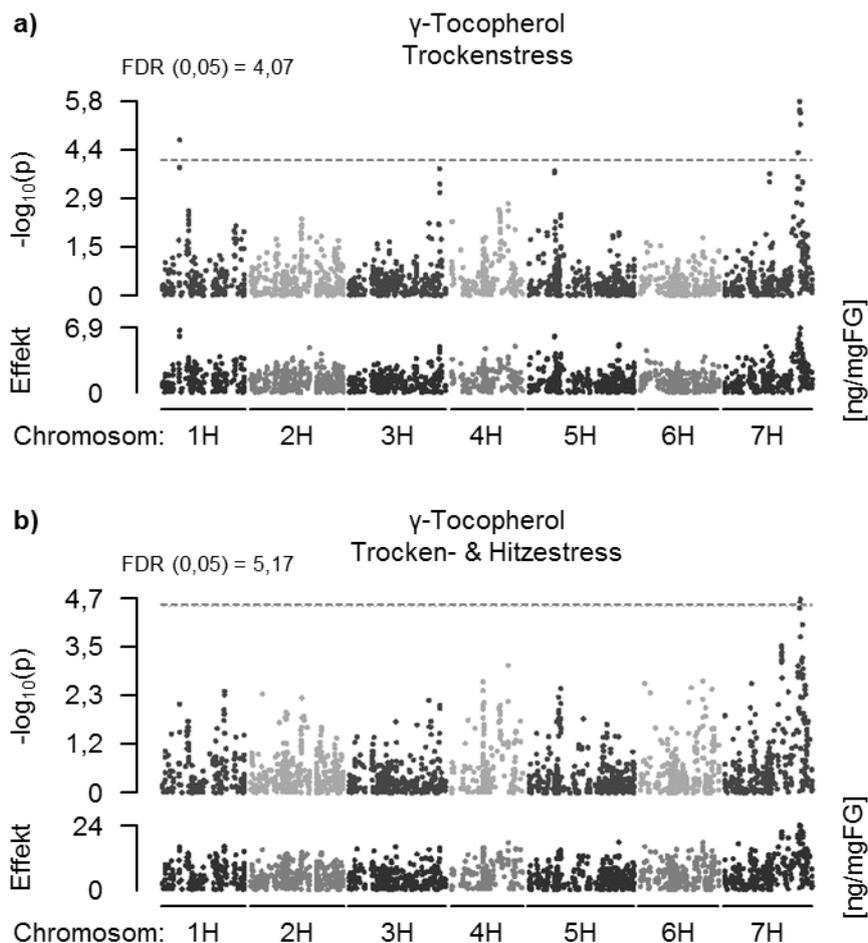


Abbildung 1: GWAS zum γ -Tocopherolgehalt. Adaptiert aus Templer et al. (2017). Die Anzucht der Gerstengenotypen fand in Klimakammern unter **a)** Trockenstress und **b)** kombiniertem Trocken- und Hitzestress statt. Zum Zeitpunkt der Blüte wurde der Gehalt von γ -Tocopherol [ng/mgFG] (Frischgewicht) von Fahnenblättern bestimmt. Die Genotypen wurden über einen Illumina iSelect 9K SNP Chip genotypisiert. Für jeden SNP-Marker ist der Signifikanzwert (p -Wert) der Assoziation aus Markerausprägung und Metabolitgehalt als negativer dekadischer Logarithmus gezeigt, in Relation zur Position der Marker im Gerstengenom. Signifikante Assoziationen (kleiner p -Wert) erscheinen groß. Lagen sie über einem vorgegeben Schwellenwert (*False discovery rate*, FDR, gestrichelte Linie), wurde die Assoziation als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Assoziationen werden als *quantitative trait loci* (QTL) bezeichnet. Auf Chromosom 7H fanden sich QTLs für den Gehalt von γ -Tocopherol. Weitere Details im Text und in Templer et al. (2017).

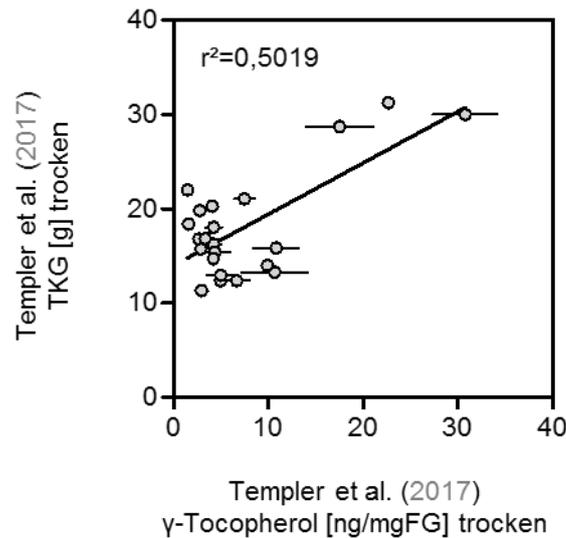


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen dem Gehalt von γ -Tocopherol und dem TKG. Adaptiert aus Templer et al. (2017). Die Anzucht von Gerstengenotypen fand in Klimakammern unter kontrolliertem Trockenstress statt. Zum Zeitpunkt der Blüte wurde in Fahnenblättern der Gehalt von γ -Tocopherol [ng/mgFG] bestimmt. Das Tausendkorngewicht (TKG) [g] wurde nach Reife der Pflanzen bestimmt. Jeder Datenpunkt gibt den Mittelwert (plus Standardabweichung) aller biologischen Replikate eines Genotyps an. Weitere Details siehe Text sowie Templer et al. (2017).

1.5. Tocochromanol/Vitamin E

1.5.1. Historisches und Struktur

Um die Rolle, die γ -Tocopherol in der Stressadaptation spielen kann, besser verstehen und analysieren zu können, lohnt sich ein historischer Rückblick. Vor fast einhundert Jahren berichteten Evans und Bishop (1922) erstmal von einem bis dahin unbekanntem fettlöslichen Nährstoff, der essenziell für die Reproduktion von Mäusen war. Fehlte diese unbekannte, zunächst als Substanz X bezeichnete Komponente in der Nahrung, waren Mäuse unfruchtbar. Diese Substanz wird heute als Vitamin E klassifiziert, da sie auch für den menschlichen Organismus essenziell ist, d.h. nicht von diesem synthetisiert werden kann und über die Nahrung aufgenommen werden muss. Vitamin E bezeichnet dabei hauptsächlich eine Gruppe an acht strukturell ähnlichen lipophilen Molekülen, vier werden als Tocopherole und vier als Tocotrienole bezeichnet (Abbildung 3) (DellaPenna & Pogson 2006).

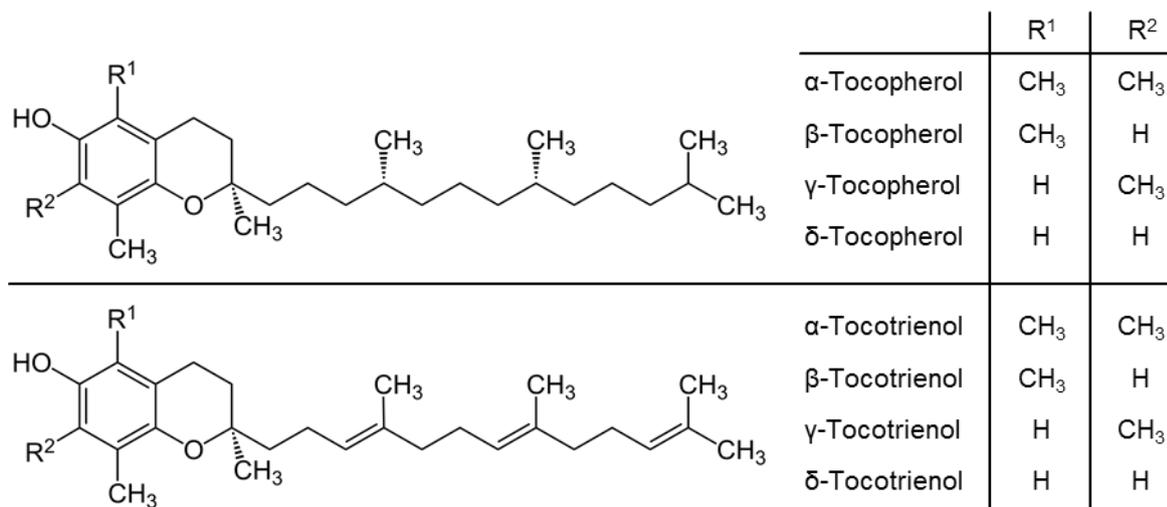


Abbildung 3: Chemische Struktur der Tocopherole und Tocotrienole. Gezeigt ist die chemische Struktur der vier natürlich vorkommenden Tocopherol-Isomere in der (RRR)-Konfiguration und die chemische Struktur der vier natürlich vorkommenden Tocotrienol-Isomere in der (R)-Konfiguration. Tocopherole haben eine gesättigte Seitenkette, Tocotrienole eine dreifach ungesättigte Seitenkette. Die Anzahl der Methylgruppen am Chromanring differenziert die verschiedenen Tocopherol- und Tocotrienolarten. Adaptiert nach Tsochatzis et al. (2012).

Der Begriff Tocopherol wurde dabei als Anspielung auf die physiologische Funktion vorgeschlagen (griechisch: *tókos*: Geburt; und *phérein*: tragen), als erstmals aus Weizenkeimöl ein Alkohol (deshalb Endung „-ol“) isoliert werden konnte, der in Fütterungsexperimenten physiologische Vitamin E Aktivität aufwies (Evans et al. 1936). Die chemische Struktur dieses Alkohols konnte kurze Zeit später aufgeklärt werden, nachdem das künstlich synthetisierte Reaktionsprodukt (heute bekannt als α -Tocopherol) der beiden Verbindungen Phytylbromid und Trimethylhydroquinone in Fütterungsexperimenten ebenso hervorragende Vitamin E Aktivität aufwies (Karrer et al. 1938). Allen Tocochromanolen (übergeordneter Begriff für Tocopherole und Tocotrienole) gleich sind eine hydrophobe Polyprenyl-Seitenkette und ein Chromanring, der während der Biosynthese aus Homogentisinsäure (HGA) gebildet wird. Die hydrophobe Seitenkette verankert die Tocochromanole dabei in Biomembranen, während eine Hydroxygruppe am Chromanring, der im wässrigen Milieu liegt, die molekulare Funktion vermittelt, die in heterotrophen Organismen als physiologische Vitamin E Aktivität bezeichnet wird (Hussain et al. 2013). Auf Grund der phenolischen Natur des Chromanrings kann leicht ein Proton der Hydroxygruppe abgegeben werden und als Radikalfänger agieren, hauptsächlich um Lipidperoxidation der Biomembran zu stoppen (mehr in Abschnitt 1.5.2). Während Tocopherole eine gesättigte Polyprenyl-Seitenkette tragen, wurde die Bezeichnung Tocotrienole für diejenigen

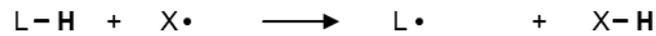
Tocochromanole gewählt, die eine dreifach (tri) ungesättigte aliphatische Seitenkette aufweisen, mit Doppelbindungen an der 3', 7' und 11' Position (Bunyan et al. 1961). Tocochromanole werden ausschließlich in Organismen gebildet, die Photosynthese betreiben können, wie Cyanobakterien, Algen und Pflanzen (Hofius & Sonnewald 2003). Es wird angenommen, dass Tocopherole ubiquitär im Reich der Pflanzen auftreten, während Tocotrienole nur in wenigen Pflanzengruppen, wie einigen Monokotyledonen, auftreten, zu denen auch die in dieser Arbeit betrachtete Gerste zählt (Siles et al. 2013).

1.5.2. Antioxidative Wirkung

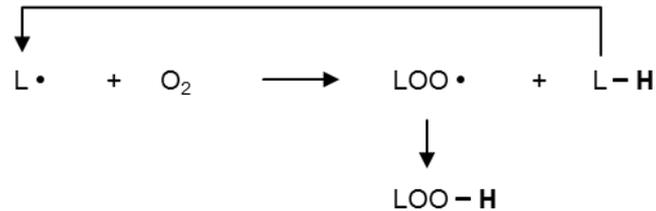
Eine entscheidende molekulare Funktion der Tocochromanole besteht in der Einschränkung der Lipidperoxidation. Dieser Prozess kann als Kettenreaktion ablaufen und oxidative Schäden an Lipiden verursachen, wodurch Biomembranen und damit Zellen geschädigt werden. Die Lipidperoxidation startet, wenn ein Fettsäuremolekül ein Proton an ein freies Radikal abgibt, ein Molekül oder Atom mit mindestens einem ungepaarten Valenzelektron, und dadurch zum Fettsäure-Radikal wird. Nach radikalischer Substitution mit Sauerstoff (O_2) entsteht ein Lipidperoxyl-Radikal, welches einem weiteren Fettsäuremolekül ein Proton entziehen kann, wodurch eine Kettenreaktion ablaufen kann (Abbildung 4).

Betroffen sind vor allem ungesättigte Fettsäuren, da sich zwischen den Doppelbindungen besonders reaktive Methylengruppen befinden, die leicht Protonen abgeben können (Hasanuzzaman et al. 2004). Die Kettenreaktion kann abbrechen, wenn keine Fettsäure mehr vorhanden ist, die ein Radikal bilden kann, zwei Radikale ein stabiles Nicht-Radikal erzeugen oder Antioxidantien die Radikale abfangen. Durch die Inkorporation in die Biomembran sind Tocochromanole besonders befähigt die Lipidperoxidation der Membranfettsäuren zu stoppen. Dabei kann durch die Abgabe eines Protons am Chromanring ein Fettsäure-Peroxyradikal in ein Fettsäure-Hydroxyperoxid überführt werden, welches kein Radikal mehr ist. Das Tocochromanol-Molekül wird dabei selbst zum Tocochromanol-Radikal, ist auf Grund der delokalisierten Elektronen am Chromanring jedoch weniger reaktiv und führt die Kettenreaktion nicht fort (Abbildung 5). Es kann anschließend über das wasserlösliche Antioxidationssystem Ascorbinsäure (Vitamin C) regeneriert werden, das selbst über Glutathion, Thioredoxin und die Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)e (NAD oder NADP) an die Elektronentransportkette in den Mitochondrien oder Chloroplasten gekoppelt ist. Das Tocochromanol-Radikal kann alternativ auch abgebaut werden. Genauere Details zum Mechanismus finden sich in Yamauchi (1997).

1. Initiation



2. Propagation (Autooxidation + Kettenreaktion)



3. Termination

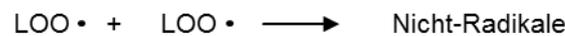


Abbildung 4: Schema Lipidperoxidation. Die Reaktion einer Fettsäure (L-H) mit einem Radikal (X•) erzeugt ein Fettsäureradikal (L•). Durch radikalische Substitution mit Sauerstoff entsteht ein Lipidperoxyl-Radikal (LOO•). Eine Kettenreaktion kann ablaufen, in der subsequent Fettsäure-Hydroperoxide (LOO-H) entstehen. Die Propagation der oxidativen Schädigung kann terminiert werden, wenn Nicht-Radikale entstehen oder Antioxidantien wie Tocochromanole (Toc) die Kettenreaktion abbrechen. Konzept adaptiert aus Hasanuzzaman et al. (2004).

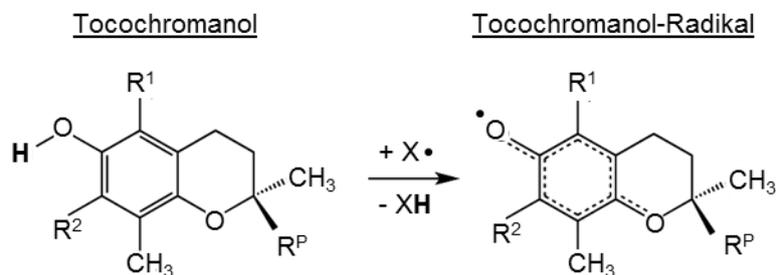


Abbildung 5: Tocochromanol-Radikal. Tocochromanole können als Radikalfänger agieren. Ein Proton einer Hydroxygruppe am aromatischen Ring des Chromanrings kann an ein freies Radikal (z.B. Lipidperoxyl-Radikal) abgegeben werden. Auf Grund der delokalisierten Elektronen am Chromanring ist das entstehende Tocochromanol-Radikal weniger reaktiv. RP: Polyprenylrest, R1 und R2: siehe Abbildung 3. Adaptiert aus Yamauchi (1997).

Initiiert wird die Lipidperoxidation oft durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die am Beispiel des Hydroperoxids (O_2^-) als ungewollte Nebenprodukte in der Elektronentransportkette in den Mitochondrien oder den Chloroplasten entstehen können, oder, wie im Fall des Wasserstoffperoxids (H_2O_2), von Zellen auch vorsätzlich gebildet werden können, da sie wichtige Botenstoffe darstellen, die bei Befall mit Bakterien in Pflanzen ein systemisches Signal zur Pathogenabwehr auslösen können (Torres 2010, Czarnocka & Karpiński 2018). Wird der ROS-Gehalt nicht reguliert, kann dies zum Zelltod führen (Sharma et al. 2012). Dabei schädigen sie nicht nur Lipide, sondern auch Proteine, Kohlenhydrate und Desoxyribonucleinsäuren (DNA) (Choudhury et al. 2013). Als Schutzsysteme gegen oxidative Schäden haben sich deshalb diverse Mechanismen entwickelt. Darunter enzymatische Antioxidationssysteme wie Superoxiddismutasen, Katalasen, Peroxidasen und die Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus, als auch nicht-enzymatische Antioxidationssysteme, wie Ascorbinsäure, Glutathion, Carotenoide und die in dieser Arbeit betrachteten Tocochromanole (Sharma et al. 2012, Choudhury et al. 2013). Der Gehalt von ROS kann durch abiotische und biotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, hohem Gehalt von Salzen und toxischen Metallen im Boden, Ozon, UV-Strahlung und Pathogenbefall steigen (Gill & Tuteja 2010, Gómez et al. 2019). Da Tocochromanole in Plastiden synthetisiert werden (Abschnitt 1.5.3), sind sie in Pflanzen vor allem am Schutz der Komponenten der Photosynthese vor oxidativen Schäden beteiligt. Diverse Studien berichten über positive Einflüsse auf die Fitness von Pflanzen gegenüber abiotischen Stressszenarien (siehe z.B. Zusammenstellungen in Hasanuzzaman et al. 2014). Da auch in Gerste ein positiver Zusammenhang zwischen dem Tocopherolgehalt und morphologischen Parametern beobachtet werden konnte (Abbildung 2) (Templer et al. 2017) bestand Grund zur Annahme, dass bei detaillierterer Betrachtung weitere Zusammenhänge zwischen der Fitness von Gerstenpflanzen und dem Tocochromanolgehalt identifiziert werden können.

1.5.3. Biosynthese

Die vier Arten der Tocopherole und Tocotrienole unterscheiden sich durch die Anzahl der Methylgruppen am Chromanring (Abbildung 3), vermögen jedoch dieselbe molekulare Funktion zu vermitteln (Dörmann 2007). In den meisten Pflanzenarten ist α -Tocopherol die Tocochromanolart, die im grünen Gewebe am stärksten akkumuliert (DellaPenna & Pogson 2006). Auch in Blättern von Gerste detektierten Templer et al. (2017) deutlich mehr α -Tocopherol als andere Vitamin E Formen, demnach auch mehr α - als γ -Tocopherol, für das ein Zusammenhang zu morphologischen Parametern identifiziert wurde (Abbildung 2). Um die Dynamik der verschiedenen Tocochromanol-Isoformen zu verstehen und um die

genetische Komponente identifizieren zu können, die dem beschriebenen QTL zugrunde liegen könnte, lohnt es sich die Unterschiede in der Biosynthese der verschiedenen Vitamin E Formen zu betrachten (Abbildung 6).

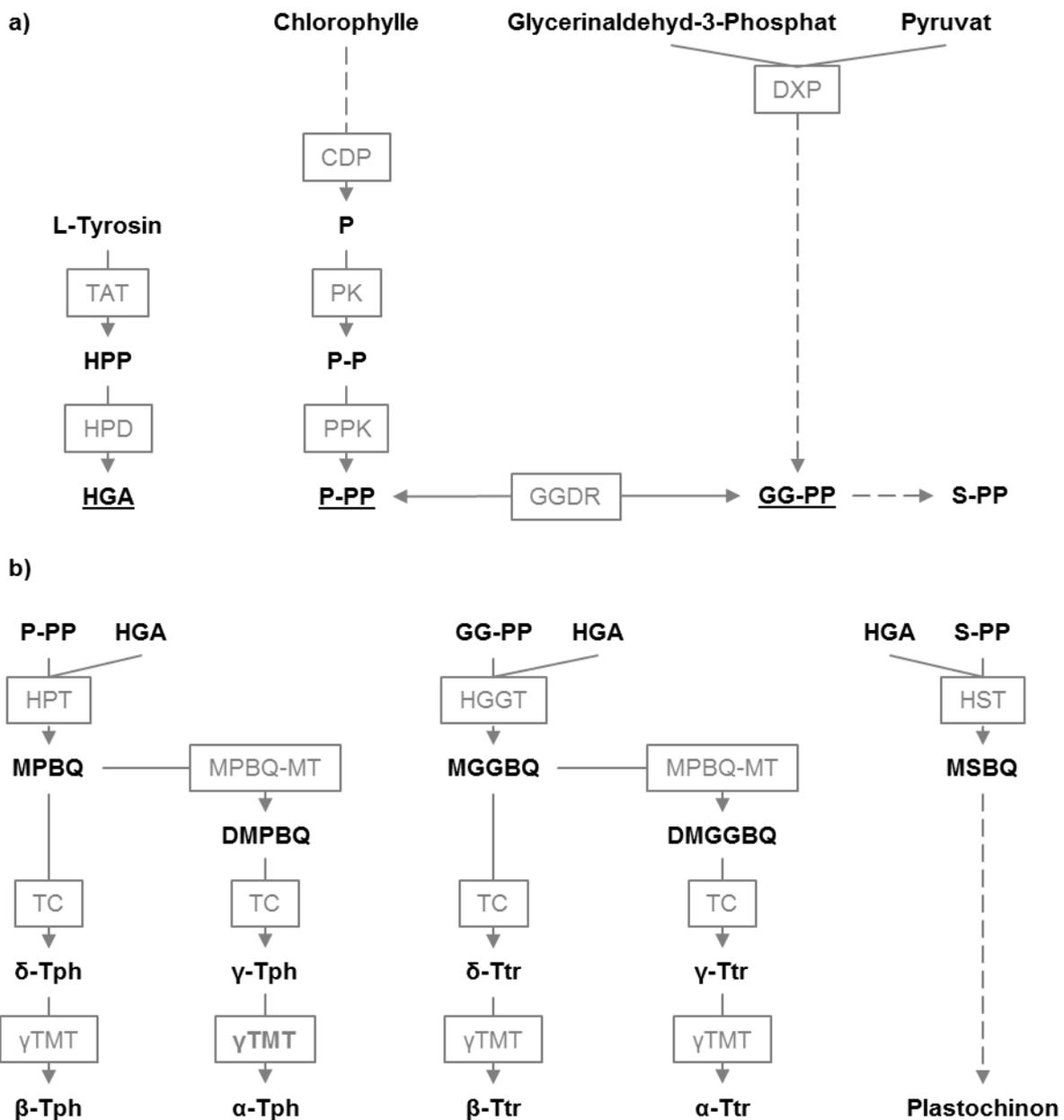


Abbildung 6: Schema der Tocochromanolbiosynthese. Fett gedruckt: Metabolite, Graue Kästchen: Enzyme, gestrichelte Pfeile: weitere enzymatische Zwischenschritte. **a)** Bereitstellung der Edukte (unterstrichen) für die Tocochromanolbiosynthese. Gezeigt sind nur die Schritte, von denen bekannt ist, dass sie Einfluss auf den Tocochromanolgehalt nehmen können (siehe Erläuterungen in Abschnitt 1.5.3). **b)** Enzymatische Schritte spezifisch für die Tocochromanolbiosynthese. Tph: Tocopherol, Ttr: Tocotrienol. **a+b)** Angedeutet ist auch die Biosynthese von Plastochinon, das am Elektronentransport in der Photosynthese beteiligt ist.

Die Biosynthese wird von der Homogentisat-Solanesyl-Transferase (HST) vermittelt, einem zur HPT und HGGT strukturell verwandtem Enzym. S-PP: Solanesyl-Pyrophosphat, MSBQ: 2-Methyl-6-Solanesyl-1,4-Benzoquinol. Weitere Ausführungen im Text in Abschnitt 1.5.3.

Der erste charakteristische Schritt der Tocopherolbiosynthese wird von der Homogentisat-Phytyl-Transferase (HPT; *vte2*; EC: 2.5.1.115) vermittelt, einem Enzym, das in der Hüllmembran der Chloroplasten Homogentisat (HGA) und Phytyl-Pyrophosphat (P-PP) zu 2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzoquinol (MPBQ) kondensiert (Soll et al. 1980). Der erste charakteristische Schritt der Tocotrienolbiosynthese wird von der Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase (HGGT; EC: 2.5.1.116) vermittelt, ein zur HPT strukturell verwandtes Enzym, das HGA und Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GG-PP) kondensiert, da es eine erhöhte Affinität zu dieser dreifach ungesättigten Polyprenyl-Verbindung gegenüber dem gesättigten P-PP aufweist (Cahoon et al. 2003). Das Reaktionsprodukt der HGGT wird analog dem Reaktionsprodukt der HPT als 2-Methyl-6-Geranylgeranyl-1,4-Benzoquinol (MGGBQ) bezeichnet. Im Gegensatz zu den spezifischen Rollen dieser beiden Enzyme in der Tocopherol- beziehungsweise der Tocotrienol-Biosynthese, diskriminieren die übrigen Enzyme der Tocochromanol-Biosynthese nicht zwischen den Intermediaten der beiden Biosynthesewege, was durch die alleinige biotechnologische Expression des Gerste *HGGT*-Gens in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) bewiesen wurde, eine Pflanzenart in der sonst keine Tocotrienole akkumulieren (Cahoon et al. 2003). Bekannt war außerdem schon länger, dass die nachfolgenden Schritte spezifisch in der inneren Hüllmembran der Plastiden katalysiert werden (Soll et al. 1985). Der erste mögliche weitere Schritt wird dabei von der MPBQ-Methyltransferase (MPBQ-MT, *vte3*, EC: 2.1.1.295) vermittelt. Unter Verwendung des Methyl donors S-Adenosylmethionin (SAM) wird dem aromatischen Ring von MPBQ oder MGGBQ eine Methylgruppe hinzugefügt, wodurch 2,3-Dimethyl-6-Phytyl-1,4-Benzoquinol (DMPBQ), beziehungsweise 2,3-Dimethyl-6-Geranylgeranyl-1,4-Benzoquinol (DMGGBQ) entsteht. Die Methylierung am aromatischen Ring ist optional, d.h. alle vier Benzoquinone (MPBQ, MGGBQ, DMPBQ, DMGGBQ) können im nächsten Schritt von der Tocopherol-Cyklase (TC, *vte1*, EC: 5.5.1.24) als Substrat verwendet werden (Sattler et al. 2003). Sie bildet zwischen der aromatischen Kopfgruppe und dem aliphatischen Polyprenylrest eine zweite, sauerstoffhaltige, nicht aromatische Ringstruktur aus, wodurch die charakteristische hydrophile Chromanstruktur entsteht. MPBQ wird dabei zu δ -Tocopherol, MGGBQ zu δ -Tocotrienol, DMPBQ zu γ -Tocopherol und DMGGBQ zu γ -Tocotrienol. Die γ -Tocopherol-Methyltransferase (γ TMT, *vte4*, EC: 2.1.1.95) kann schlussendlich dem aromatischen Ring aller δ - und γ -Formen, unter SAM-Verbrauch, eine weitere Methylgruppe hinzufügen. Dadurch wird δ -Tocopherol zu β -Tocopherol, δ -

Tocotrienol zu β -Tocotrienol, γ -Tocopherol zu α -Tocopherol und γ -Tocotrienol zu α -Tocotrienol, womit der Grad der Methylierung des Chromanrings den Unterschied zwischen den verschiedenen Varianten darstellt (Abbildung 3).

Während der Biosynthese akkumulieren die Benzoquinon-Intermediate nicht in nennenswerten Mengen (Porfirova et al. 2002). Der Substratfluss zwischen den einzelnen Vitamin E Varianten ist jedoch nicht gesättigt, d.h. die unterschiedlichen Tocochromanolvarianten akkumulieren in unterschiedlichen Pflanzenarten, Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in planta* in unterschiedlichen Verhältnissen (Gliszczyńska-Świgło et al. 2007, Lizarazo et al. 2010). Das Verhältnis der verschiedenen Tocochromanolformen wird durch die Aktivität der verschiedenen an der Biosynthese beteiligten Gene beeinflusst und ist auf Grund diverser Deletions-, Repressions- und Überexpressionslinien besonders gut in Arabidopsis studiert (siehe DellaPenna 2005). Auch die Bereitstellung der Substrate für die Tocochromanolbiosynthese kann Einfluss auf den Tocochromanolgehalt nehmen. Die aromatische HGA leitet sich von der proteinogenen Aminosäure L-Tyrosin ab. Dieses wird durch Tyrosin-Aminotransferasen (TAT, EC: 2.6.1.5) in 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) überführt, welches wiederum von HPP-Dioxygenasen (HPD, EC: 1.13.11.27) in HGA umgesetzt wird. Norris et al. (1998) berichteten, dass der Gehalt von Tocopherol in Arabidopsis durch die HPD-Aktivität beeinflusst werden kann. Sowohl P-PP als auch GG-PP sind mögliche Produkte des Methylerythritolphosphatwegs (auch DOXP-Weg) und können durch eine Geranylgeranyl-Diphosphate-Reduktase (GGDR, EC: 1.3.1.83) direkt ineinander überführt werden (Keller et al. 1998). Die Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXP, EC: 2.2.1.7) katalysiert den ersten Schritt des DOXP-Wegs und jüngst wurde vermutet, dass sie in Mais (*Zea mays* L.) Einfluss auf den Tocochromanolgehalt nehmen kann (Diepenbrock et al. 2017). Darüber hinaus wurde spekuliert, dass P-PP und GG-PP auch nach dem Abbau von Chlorophyllen durch Chlorophyll-Dephitylasen (CDP, EC: 3.40.50.1820) in die Tocochromanol-Biosynthese fließen können, da dabei Phytol (P) freigesetzt wird (Rise et al. 1989). Diese Vermutung bestätigte sich als in Arabidopsis eine Phytol-Kinase (PK, *vte5*, EC: 2.7.1.182) und eine Phytol-Phosphat-Kinase (PPK, *vte6*, EC: 2.7.4.-) identifiziert wurden, die sukzessive P in P-P und P-PP umwandeln und Einfluss auf den Tocochromanolgehalt nehmen können (Valentin et al. 2006, vom Dorp et al. 2015).

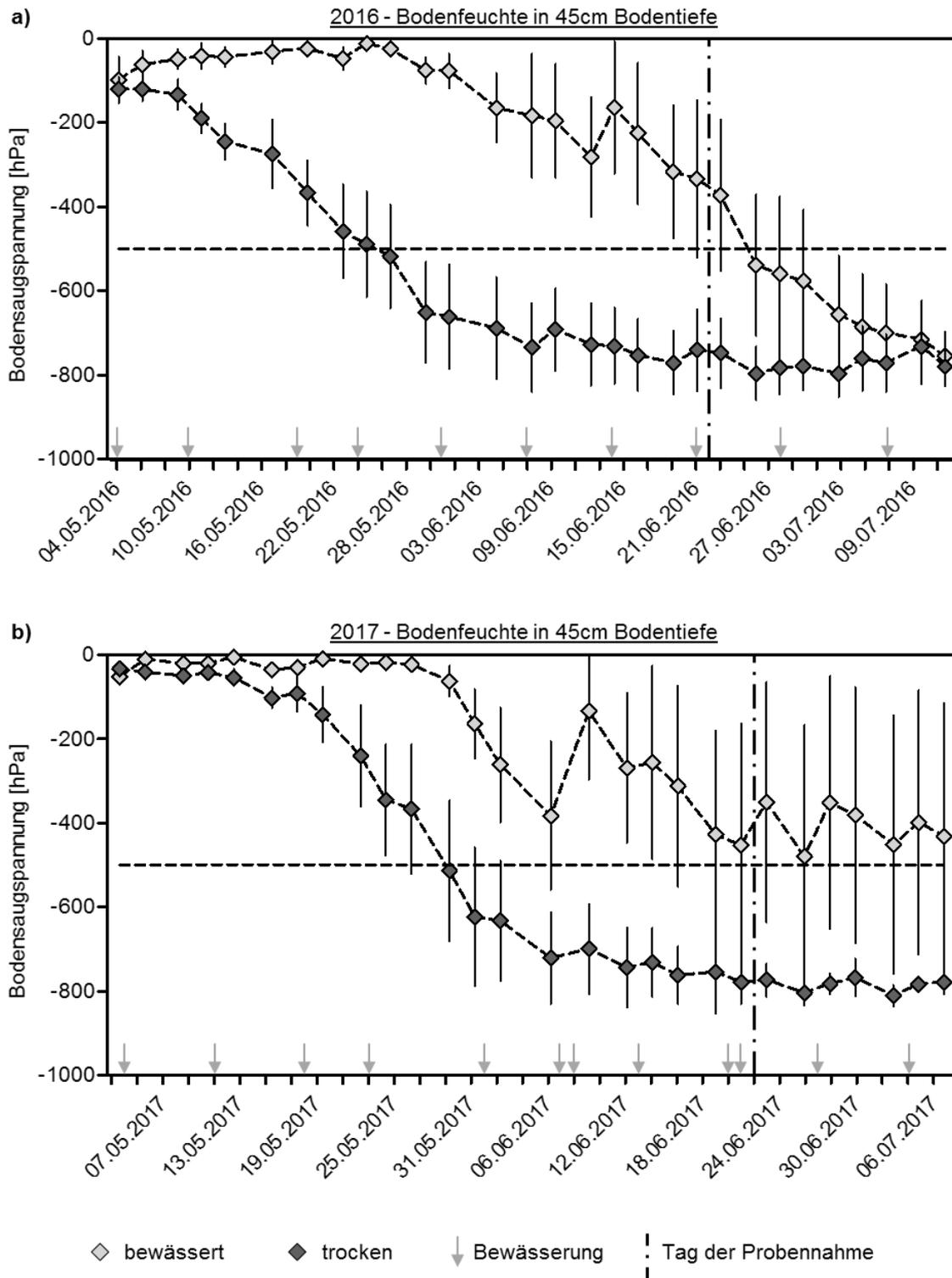
1.6. Rollgewächshaus Experimente

Um die von Templer et al. (2017) beobachteten Zusammenhänge validieren und erweitern zu können, sollten genetische Parameter, Wachstumsparameter und der Tocochromanolgehalt von unabhängigen Genotypen in unabhängigen Experimenten

betrachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Pflanzen analysiert werden, die in einem Rollgewächshaus (RGH) gewachsen waren. Ein RGH ist ein Glasdach, das, basierend auf einem Niederschlagssensor, automatisiert auf Schienen über eine Versuchsfläche im Feld rollen kann. Alle Pflanzen innerhalb der Versuchsfläche wuchsen direkt im Erdreich, wurden vor natürlichem Niederschlag abgeschirmt und waren sonst allen ortsüblichen Wetter- und Witterungsbedingungen wie Wind, Sonneneinstrahlung und Temperaturschwankungen ausgesetzt. Das Wachstum fand demnach nahezu unter Feldbedingungen statt. Es gab keine künstliche Beleuchtung, jedoch konnten Teile der Versuchsfläche gezielt künstlich beregnet werden. Dadurch konnten auf engstem Raum zwei unterschiedliche Wachstumsbedingungen erzeugt werden, Trockenstress und gut bewässerte Bedingungen. Es konnte kein Hitzestress appliziert werden. Die Analyse von Pflanzen, die unter nahezu Feldbedingungen wuchsen, wurde gegenüber der erneuten Analyse von Klimakammerexperimenten bevorzugt. Die Validierung von QTLs unter Feldbedingungen wird als notwendig angesehen, um diese während der markerassistierten Selektion (MAS) in Züchtungsbemühungen einzusetzen (Cattivelli et al. 2008).

Die Betreuung der RGH-Experimente erfolgte durch Kooperationspartner der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising. Im Rahmen eines Projektverbundes (www.bayklimafit.de) durften die drei RGH-Experimente der Jahre 2016, 2017 und 2018 begleitet werden, d.h. die dort wachsenden Pflanzen analysiert werden. Der Anbau fand in einer für Sommergerste üblichen Vegetationsperiode von circa Ende März bis Juli statt. In den Jahren 2016 und 2017 wurde die Bodenfeuchte im RGH über Tensiometer gemessen. In den Teilen der Versuchsfläche, die nicht künstlich bewässert wurden, nahm die Bodenfeuchtigkeit schneller ab (Abbildung 7).

Abbildung 7 (nächste Seite): Bodenfeuchte im Rollgewächshaus. Die Bodenfeuchte wurde in drei verschiedenen Bodentiefen (15 cm, 45 cm, 75 cm) mit Tensiometern gemessen. Für jede Wachstumsbedingung und jede Bodentiefe wurden acht Tensiometer eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte (plus Standardabweichung) der Messungen aus 45 cm Tiefe. In 75 cm Tiefe nahm die Bodenfeuchte zeitlich verzögert ab, in 15 cm Tiefe früher (siehe Abschnitt 6.2). Gezeigt sind auch die Tage an denen Teile der Versuchsfläche künstlich bewässert wurden. Es wird vermutet (Beobachtungen der LfL), dass im RGH ab -500 hPa keine effektive Wasseraufnahme aus dem Boden möglich ist (Welkepunkt). In beiden Jahren erfolgte die Probenahme am 22. Juni. Für 2018 wurde die Bodenfeuchte nicht analysiert, das Bewässerungsregime war jedoch vergleichbar. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).



Vergleichbar mit den Analysen von Templer et al. (2017) wurden ab dem Zeitpunkt des Ährenschiebens (BBCH-Skala für Getreide: ab Stadium 59 (Lancashire et al. 1991), basierend auf der Zodaks-Skala (Zodaks et al. 1974)) Blattproben für molekulare Analysen genommen. In den Jahren 2016 und 2017 herrschte in den Teilen der Versuchsfläche, die nicht bewässert wurden, zum Zeitpunkt der Probenname bereits für mehrere Tage eine

Bodenfeuchtigkeit unter dem Welkepunkt (-500 hPa) (Abbildung 7), weshalb angenommen wurde, dass die Pflanzen Trockenstress erfahren hatten. Das Bewässerungsregime in 2018 war mit dem der Jahre 2016 und 2017 vergleichbar. Trockenstress kann auch hier vermutet werden.

Pro Genotyp und Wachstumsbedingung wurden vier (2016, 2017) bzw. fünf (2018) Blattprobenpools erstellt und fortan als biologische Replikate gehandhabt. Es wurde das Fahnenblatt-Minus-Eins (Fahnenblatt -1) beprobt, also das Blatt, das sich vor dem Fahnenblatt entwickelte und demnach älter war. Bei vorangegangenen Analysen stellte sich heraus, dass das Fahnenblatt in einigen Genotypen sehr klein ist und für die verschiedensten Analysen nicht genug Biomasse liefern konnte. Das Fahnenblatt -1 war stets größer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 68 Genotypen analysiert. Im Jahr 2016 wurden 57 Genotypen analysiert, im Jahr 2017 59 Genotypen und im Jahr 2018 15 Genotypen. Zwischen den Kollektionen der Jahre 2016 und 2017 bestand eine Überschneidung von 48 Genotypen. Der Austausch einiger Genotypen basierte auf der Inkorporation weiterer Genotypen von projektassoziierten Zuchtbetrieben, die parallel zum RGH-Experiment 2016 erst in Klimakammern auf ihre Tocochromanolakkumulation getestet wurden (Analysen nicht gezeigt). Zwischen den Jahren 2016 und 2018 bestand eine Überschneidung von 13 Genotypen, zwischen den Jahren 2017 und 2018 eine von 15 Genotypen (Tabelle 2). Für die Überprüfung der Assoziationen von Tocochromanol- und Wachstumsparametern wurden nur die Proben der Jahre 2016 und 2017 analysiert. Die Proben der Jahre 2018 wurden nur für die Validierung von Transkriptomanalysen verwendet (näheres in Abschnitt 3.2.7).

Die Auswahl der Genotypen wurde in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern getroffen. Sie umfasste aktuelle Zuchtlinien der assoziierten Zuchtbetriebe, bestehende Elitelinien, die für den Anbau in Europa und Nordamerika vorgesehen sind und Genotypen, die an das Wachstum in heißen und ariden Regionen angepasst sind (Tabelle 2). Elitelinien sind oft auf eine hohe Ertragsleistung gezüchtet und nicht unbedingt auf erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen widrige Wachstumsbedingungen (Templer et al. 2017). Im Gegensatz dazu weisen Genotypen, die an das Wachstum unter heißen und ariden Bedingungen angepasst sind, oft geringere Erträge auf, da Adaptionsmechanismen pleiotrope destruktive Effekte hervorrufen können (Chaves et al. 2002, Jones 2014, oder Beispiel zur Stomataregulierung in Abschnitt 1.2). Es gibt Hinweise darauf, dass die Kombination genetischer Ressourcen durch Züchtungsbemühungen in ertragreichen und resistenten Sorten resultieren kann (Mikołajczak et al. 2016).

1.7. Transkriptomanalysen

1.7.1. Überblick

Pflanzen reagieren mit einer komplexen Abfolge von Adaptionsmechanismen auf limitierte Wasserverfügbarkeit (Chaves et al. 2002, Jones 2014). Die physiologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen basieren selbst auf Veränderungen in der Transkription und Expression von Genen (Mane et al. 2008, Vasquez-Robinet et al. 2008). Das Transkriptom ist die Gesamtheit aller transkribierten Gene einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Globale Transkriptomanalysen ermöglichen einen tiefen und breiten Einblick in die komplexe Antwort von Pflanzen auf Trockenstress (Janiak et al. 2018) und somit auch auf die Interaktion verschiedener Adaptionsmechanismen (Evers et al. 2010). Trockenstress löst durch die Regulation der Stomata und die nachfolgenden molekularen Veränderungen, wie eine Limitierung der Photosyntheserate, vor allem in Blättern eine starke Veränderung in der Regulation des Transkriptoms aus (Zingaretti et al. 2013, Urban et al. 2017, Romero et al. 2017). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das Transkriptom von Blättern betrachtet. Transkriptomanalysen in Gerstenpflanzen, die Trockenstress erfuhren, finden sich in einer Vielzahl von Studien. In den meisten Fällen wurde auch das Transkriptom von Blättern betrachtet (Talame et al. 2007, Guo et al. 2009, Bedada et al. 2014, Wehner et al. 2016, Zeng et al. 2016). Weniger häufig werden andere oberirdische Gewebe wie Körner, Ähren oder Grannen betrachtet (Abebe et al. 2010, Hubner et al. 2015). Am seltensten werden Wurzeln (Kwasniewski et al. 2016, Janiak et al. 2018) oder andere unterirdische Gewebe analysiert (Svoboda et al. 2016). In den meisten dieser Studien wurden Pflanzen untersucht, die nur wenige Tage alt waren (z.B. Atienza et al. 2004). Meistens wurde nur ein oder maximal zwei Genotypen betrachtet (z.B. Diab et al. 2004) und so gut wie immer wurden Pflanzen analysiert, die in Klimakammern, Gewächshäusern oder auf Filterpapier gewachsen und gekeimt waren (z.B. Ozturk et al. 2002, Michalek et al. 2002, Tommasini et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Pflanzen betrachtet werden, die im RGH unter nahezu Feldbedingungen gewachsen waren. Die Analyse sollte in einem Stadium stattfinden, dass für die Kornfüllung relevant ist (siehe Abschnitt 1.4). Es sollten Genotypen analysiert werden die gut und Genotypen die schlecht mit dem Trockenstress umgehen können. Da das Wachstum der Pflanzen umfangreich protokolliert wurde, konnte die Auswahl der Genotypen direkt auf den durch Trockenstress ausgelösten Reaktion im RGH basieren. Damit musste nicht auf eine externe Klassifizierung der Genotypen bezüglich der Trockentoleranz zurückgegriffen werden. Außerdem sollten mehr als nur zwei Genotypen analysiert werden, um genotypspezifische transkriptionelle Regulationen von Regulationen zu unterscheiden, die allen Genotypen innewohnen.

1.7.2. Probenauswahl

Es wurden Pflanzen analysiert, die im Jahr 2016 wuchsen. Im Jahr 2017 herrschten in den Tagen vor und an der Probennahme deutlich gesteigerte Temperaturen (Abbildung 8). Gezielte Untersuchungen an Modellpflanzen hatten gezeigt, dass das Transkriptom von simultan Trocken- und Hitzestress ausgesetzten Pflanzen, entweder dem Transkriptom von Pflanzen ähnelte, die nur Hitzestress ausgesetzt waren, aber nicht dem Transkriptom von Pflanzen, die nur Trockenstress ausgesetzt waren (Prasch et al. 2015), oder grundsätzlich wenig Ähnlichkeit gegenüber dem Transkriptom von Pflanzen zeigte, die nur einen Stress erfahren hatten (Rizhsky et al. 2004). Der Einfluss von zwei Stressszenarien auf diese Analysen sollte vermieden werden.

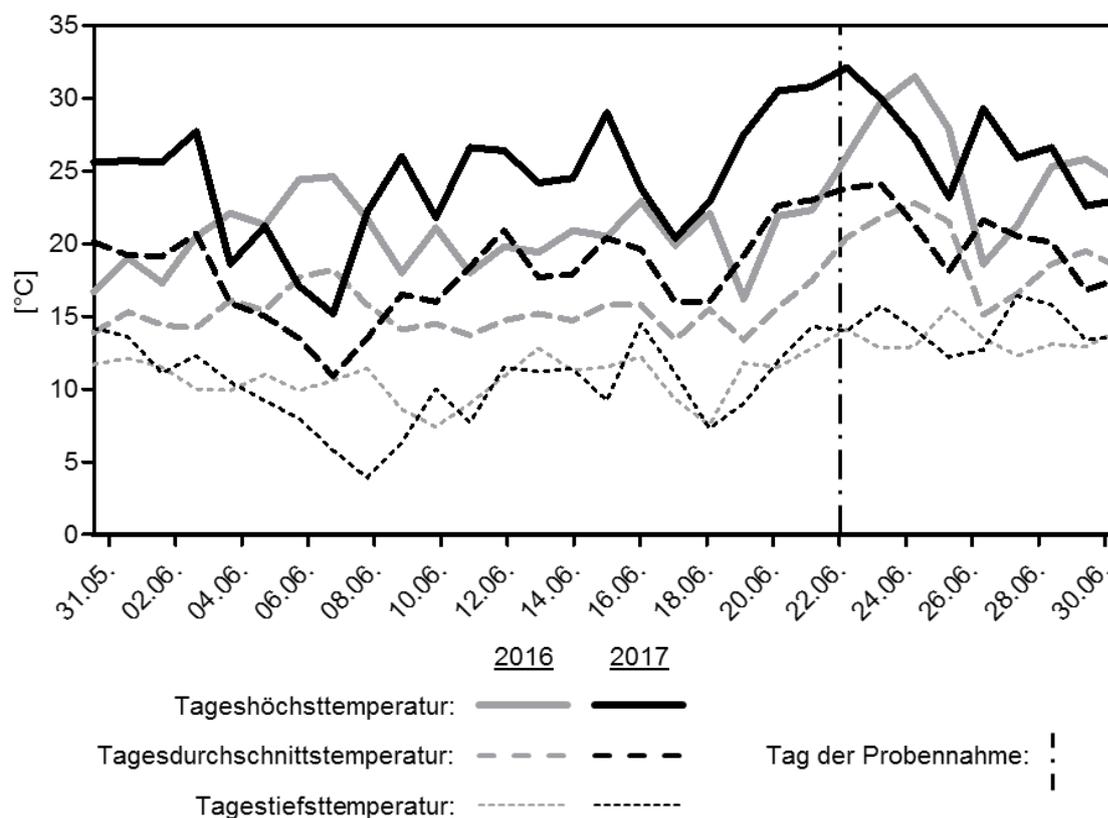


Abbildung 8: Temperaturverlauf am RGH im Jahr 2016 und 2017. Die Temperatur wurde an einer nahegelegenen (300 m) Wetterstation aufgezeichnet. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

In Getreiden wie Gerste ist der Ertrag das Produkt aus der Anzahl der Körner und dem Gewicht jedes Kornes, das oft als das Gewicht von tausend Körnern angegeben wird (TKG). Die Anzahl der Körner wiederum ist das Produkt aus der Anzahl der Körner pro Halm, der Anzahl der Halme pro Pflanze und der Anzahl der Pflanzen pro Anbaufläche. In Gerste kann, abgesehen von der Anzahl der Pflanzen pro Anbaufläche, die bei der Ackerbestellung festgelegt wird, jeder dieser Parameter negativ durch Trockenstress beeinflusst werden (Samarah 2005). González et al. (1999) berichteten beispielweise, dass Trockenstress während der Kornfüllung die Anzahl der Körner pro Halm minimierte und Stress, der noch später appliziert wurde, das individuelle Korngewicht beeinflusste. Im RGH war der Ertrag der Pflanzen in beiden Jahren stark durch den Trockenstress beeinflusst (Abbildung 9a). Dabei war der Ertrag im Jahr 2017 unter gut bewässerten Bedingungen vergleichbar mit dem Ertrag im Jahr 2016 unter Trockenstress. Das Korngewicht war nur im Jahr 2017 unter Trockenstress geringfügig verringert, ansonsten aber nicht durch Stress beeinflusst (Abbildung 9b). Die Anzahl der Körner pro Halm war ebenso nur geringfügig verändert (Abbildung 9c). Die Anzahl der Halme pro Pflanze war vergleichbar stark durch den Trockenstress beeinträchtigt worden wie der Ertrag (Abbildung 9c). Der direkte Vergleich der Wachstumsparameter zeigt, dass der Kornertrag in beiden Jahren im RGH nicht linear mit dem individuellen Korngewicht in Verbindung stand, am stärksten durch die Anzahl der Körner pro Halm und nur im Jahr 2017 auch durch die Anzahl der Halme pro Pflanze beeinflusst wurde (Abbildung 10).

Abbildung 9 (nächste Seite): Ertragsparameter im RGH durch Trockenstress beeinflusst. Jeder Datenpunkt zeigt einen Genotyp. Für den jahresinternen Vergleich wurden die Werte aller Genotypen mit einem zweiseitig gepaarten t-Test verglichen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Asterisk (*) markiert. Für den jahresübergreifenden Vergleich wurden nur die 48 Genotypen verglichen, die in beiden Versuchsjahren wuchsen. Die Varianzanalyse erfolgte mittels Bonferronis multiplen Vergleichstest, mit dem die Werte der vier verschiedenen Wachstumsbedingungen paarweise miteinander verglichen wurden und Alphafehlerakkumulierung berücksichtigt werden konnte. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch ungleiche Buchstaben dargestellt. **a)** Durchschnittlicher Ertrag pro Pflanze (=Gewicht aller Körner pro Pflanze) nach Sortierung (nur Körner größer als 2,2 mm am Ort des kleinsten Durchmessers). **b)** Durchschnittliches Gewicht eines einzelnen Kornes. **c)** Durchschnittliche Anzahl der Körner pro Halm bzw. Ähre. **d)** Durchschnittliche Anzahl der Halme bzw. Ähren pro Pflanze. Abbildungen **a)**, **b)** und **d)** adaptiert aus Schuy et al. (2019).

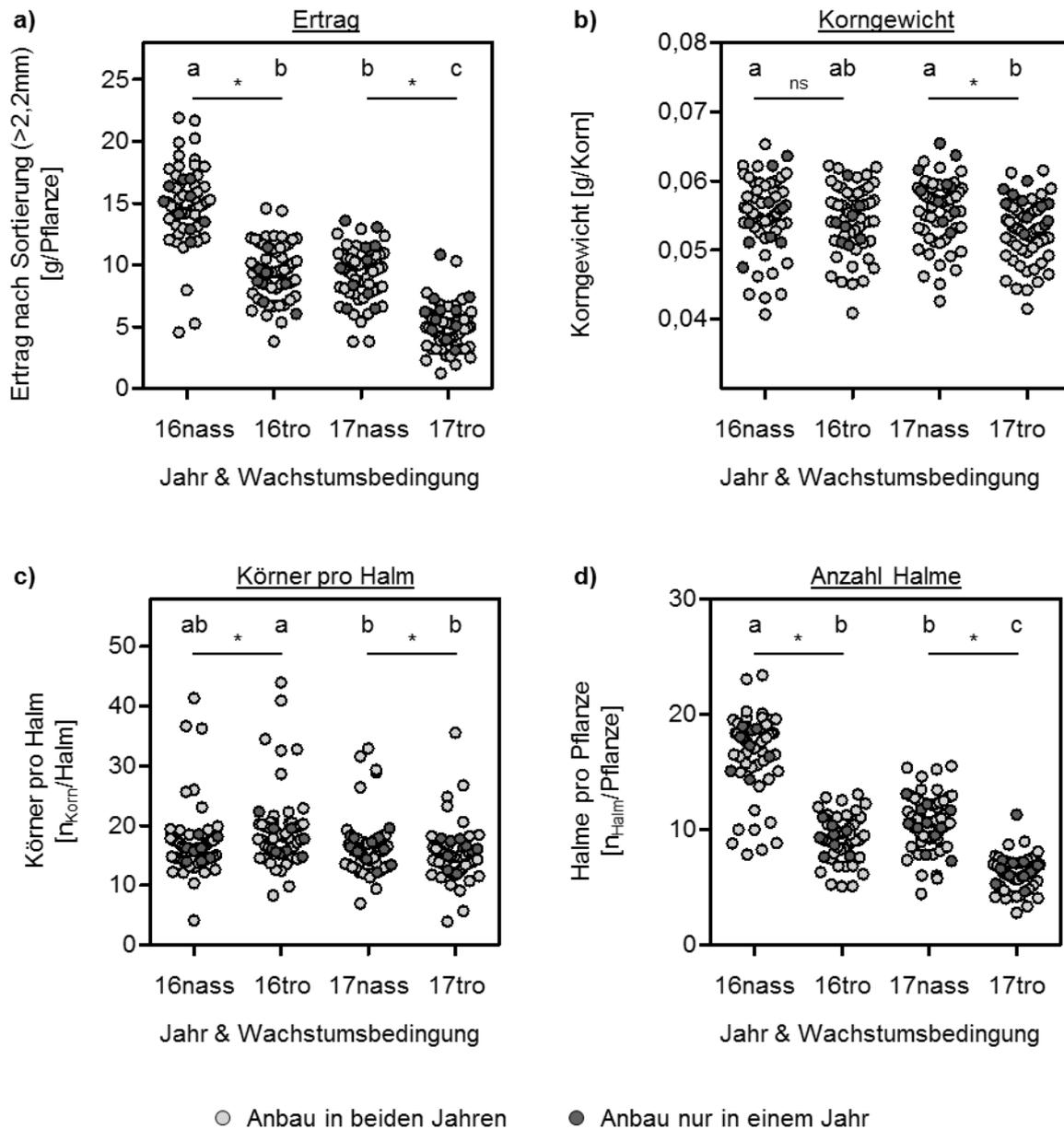
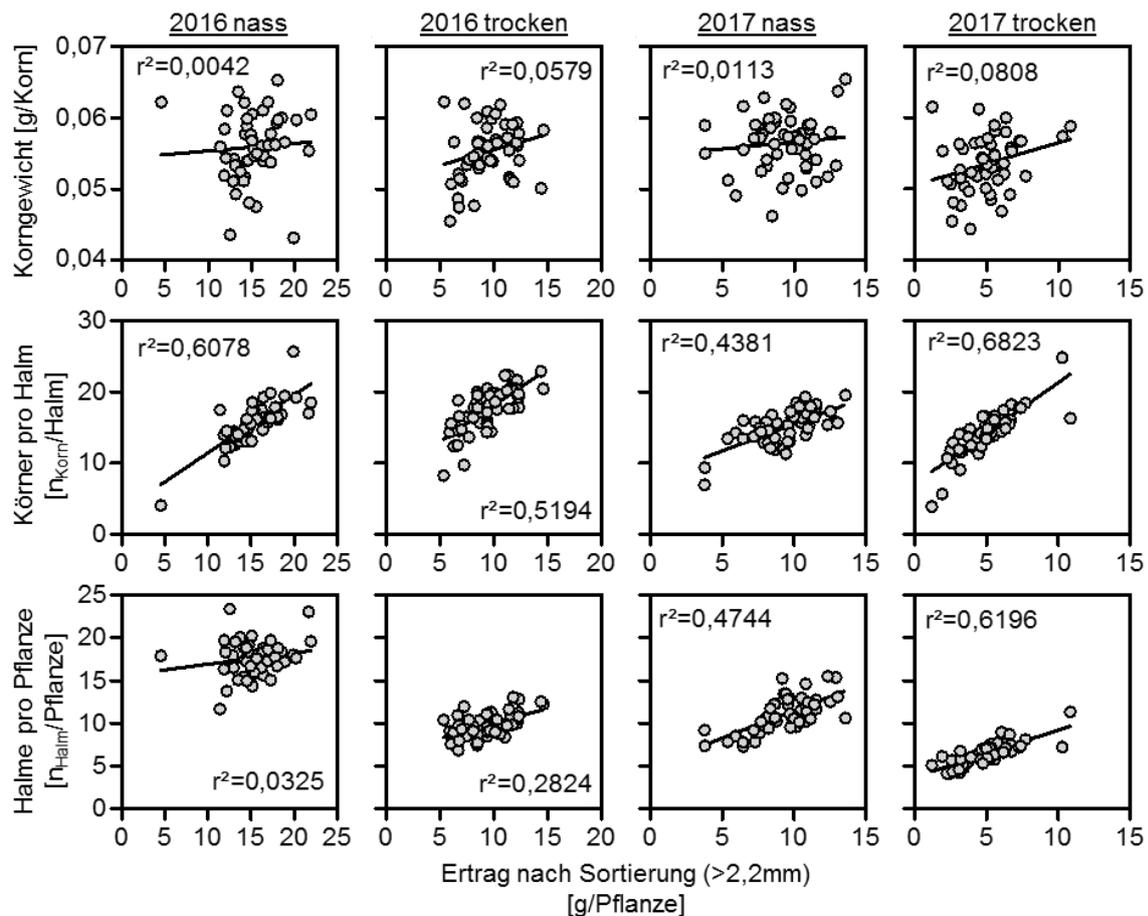


Abbildung 10 (nächste Seite): Ertragsparameter im RGH im Vergleich. Jeder Datenpunkt zeigt einen Genotyp. Auf Grund der Unterschiede in der Ährenarchitektur sind die linearen Zusammenhänge nur für die zweizeiligen Genotypen gezeigt. Gezeigt sind die linearen Zusammenhänge von Korngewicht, Anzahl der Körner pro Halm und Anzahl der Halme pro Pflanze jeweils zum Ertrag pro Pflanze.



Der Ertrag ist immer eine komplexe Integration multipler Parameter (Flexas et al. 2004). Dies wurde auch im RGH beobachtet (Abbildung 10). Für die Auswahl der Genotypen für Transkriptomanalysen wurde nicht jeder dieser Parameter einzeln bedacht, sondern nur die Dynamik des Ertrags, d.h. das Verhältnis des Ertrags unter gut bewässerten Wachstumsbedingungen und des Ertrags unter Trockenstress als repräsentativer Parameter für die Fitness der Pflanzen. Die durchschnittliche Ertragsstabilität aller Genotypen im Jahr 2016 betrug 65,1 % und reichte von 29,8 % bis 117,9 % (Abbildung 11a). Die Analyse des Transkriptoms konnte nur in einer Auswahl der Genotypen erfolgen. Es wurden acht Genotypen gewählt. Die durchschnittliche Ertragsstabilität der vier gewählten ertragsstabilen Genotypen (Aischa, Romilda, Barke, B0004) betrug 80,53 %, die der vier gewählten ertragsinstabilen Genotypen (Scarlett, Marnie, Umbrella, Eunova) betrug 49,30 %. Dabei wurde auch auf das Entwicklungsstadium geachtet. Im RGH wurde eine negative lineare Korrelation aus der Ertragsstabilität und dem Zeitpunkt des Ährenschiebens beobachtet (Abbildung 11b). Genotypen, die eine frühe Reife aufzeigten, wiesen eine höhere Ertragsstabilität auf als Genotypen, die eine späte Reife aufzeigten (vergleiche *Escape-Phänotyp* Abschnitt 1.2). Dazu zählten vor allem die sechszeiligen Genotypen. Um Einflüsse

unterschiedlicher Entwicklungsstadien auf das Transkriptom zu vermeiden, wurden nur Genotypen in Betracht gezogen, die sich in einem engen Zeitfenster in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium befanden und trotzdem unterschiedliche Ertragsstabilität aufgewiesen hatten (Abbildung 11b). Eine hohe Ertragsstabilität ist auf Grund pleiotroper Effekte oft mit niedrigen Erträgen verbunden (Abschnitt 1.6). Dies traf auch auf die für Transkriptomanalysen ausgewählten Genotypen zu, denn die ertragsstabilen Genotypen wiesen unter gut bewässerten Bedingungen niedrigere Erträge auf als die ertragsinstabilen Genotypen (Abbildung 11c). Ein extremes Beispiel war der Genotyp PamellaBlue, der die höchste Ertragsstabilität, aber mit die niedrigsten Erträge unter allen Genotypen aufgewiesen hatte, auch, da er eine sehr frühe Reife aufzeigte (Abbildung 11 mit (*) markiert). Für die Auswahl der acht Genotypen wurden auch genetische Determinanten berücksichtigt (näheres in Abschnitt 3.2ff).

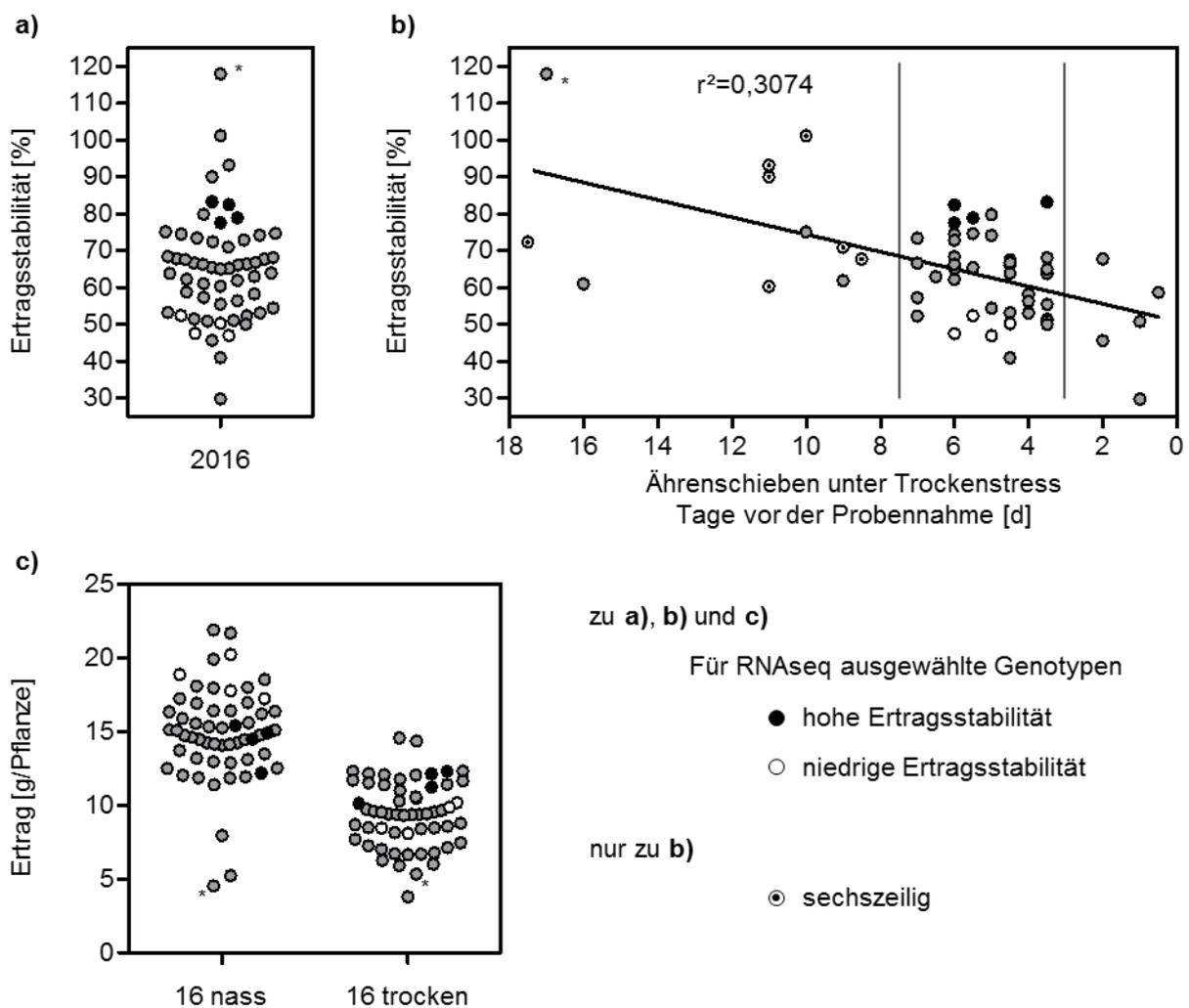


Abbildung 11 (vorherige Seite): Ertragsstabilität im Jahr 2016. Die Ertragsstabilität ist das Verhältnis aus dem Ertrag unter gut bewässerten Bedingungen und dem Ertrag unter Trockenstress. Jeder Datenpunkt zeigt einen Genotyp. **b)** Ertragsstabilität der Genotypen (aus **a)**) im Vergleich zum Zeitpunkt des Ährenschiebens in Relation zum Tag der Probenahme (Tag 0). Gezeigt sind alle 57 Genotypen, markiert sind die für RNAseq Analysen ausgewählten Genotypen. **b)** markiert sind zusätzlich die sechszeiligen Genotypen der Kollektion. Als Beispiel für einen Genotyp, der den *Escape*-Phänotyp aufzeigte, ist PamellaBlue mit einem Asterisk (*) markiert.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des Tocochromanolgehalts auf die Fitness von Gerstenpflanzen unter Trockenstress beobachtet werden. Es sollten genetische und molekulare Determinanten aufgeschlüsselt werden, die den Tocochromanolgehalt beeinflussen. Letztlich sollte abgeschätzt werden, ob züchterische Bemühungen, den Tocochromanolgehalt zu beeinflussen, relevant dafür sein können, die Fitness der Pflanzen zu verbessern. Zusätzlich sollten Transkriptomanalysen tiefere und breitere Einblicke in die Adaptionsmechanismen der Pflanzen gegenüber Trockenstress liefern. Dabei sollte vor allem auf Unterschiede zwischen ertragsstabilen und ertragsinstabilen Genotypen eingegangen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Standardisierte Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (München), VWR International GmbH (Darmstadt) oder der Eppendorf AG (Hamburg) bezogen.

2.2. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen) bezogen.

Name	#	Sequenz 5' > 3'	[°C]	Verwendung
HPT-7H F1 FP	oSY 063	GATCTTCAAGGGCGTAAGCTC	60	HPT-7H Genomfragment #1
HPT-7H F1 RP	oSY 062	CAATGACTGTTTGTATGACTGAG	60	
HPT-7H F2 FP	oSY 027	TCTCGTGCGAATCTTGTCTGC	60	HPT-7H Genomfragment #2
HPT-7H F2 RP	oSY 028	CACTGCTAGAAGATGGGAAGC	60	
HPT-7H F3 FP	oSY 029	CGTGAATTCATCTCTGTGGC	60	HPT-7H Genomfragment #3
HPT-7H F3 RP	oSY 030	CAACATTAGCTCCCACAGAAG	60	
HPT-7H F4 FP	oSY 031	TGGATTGAATCAGTTGTTTCGACA	60	HPT-7H Genomfragment #4
HPT-7H F4 RP	oSY 032	CTCATTTCAACTGTATGTAGTCCA	60	
HPT-7H F5 FP	oSY 033	TGTGTTACCTACTCCCTCCG	60	HPT-7H Genomfragment #5
HPT-7H F5 RP	oSY 034	GAATGTCATGAAGGCAGTTGC	60	
HPT-7H F6 FP	oSY 035	GTTTTTCAGAAGGCCAGCAGTC	60	HPT-7H Genomfragment #6
HPT-7H F6 RP	oSY 036	ATTGCATGGCCCACGACCTGC	60	
HPT-7H F7 FP	oSY 037	CCATTTAAGTTTGGCCGAAGC	60	HPT-7H Genomfragment #7
HPT-7H F7 RP	oSY 038	GCAGGACAAGCTTTGCATTGC	60	
HGGT F1 FP	oSY 041	GAGGTGAGACGAAAAACTGG	60	HGGT Genomfragment
HGGT F1 RP	oSY 042	ATATAACCTCCCTCAGTTCG	60	
HPT-7H qPCR FP	oSY 011	TGGAGCAAATCTATAACCGTCGTG	66	qPCR HPT-7H
HPT-7H qPCR RP	oSY 012	CATCTCACCAGAGGGATGAGCAAG	66	
HGGT qPCR FP	oSY 102	TGGTATCCAATCCTTGAGTGTGAG	66	qPCR HGGT
HGGT qPCR RP	oSY 103	ACCTCAAAGTGCTGCGCTCTCTGC	66	
4H003290 PK qFP 02	oSY 133	CTACGCGCTGCTAGTGAGAGGATG	68	qPCR HORVU4Hr1G003290
4H003290 PK qRP 02	oSY 136	ATGCTTTGTGTAGACGAAGATGGC	68	
3H113090 VS qFP 01	oSY 152	TTTGGCGACGGATCCACACGGTTC	68	qPCR HORVU3Hr1G113090
3H113090 VS qRP 02	oSY 155	CTGTGGAAGCACAGCACCGTGCAC	68	
4H086050 OPR qFP 02	oSY 157	ACATGATCGAGCCGCGGATGTGC	68	qPCR HORVU4Hr1G086050
4H086050 OPR qRP 02	oSY 159	TTGGCCAAGAAGATCCGCCCGTAC	68	
2H118410 CO qFP 01	oSY 160	TCCGTTTTCTAGCTTCTCAAGTGG	64	qPCR HORVU2Hr1G118410
2H118410 CO qRP 02	oSY 163	GTATTGGTGCCTTGCTGCCTGGAC	64	
3H072900 CB qFP 02	oSY 169	AGGATCCAATGTCGGGAATCATGG	68	qPCR HORVU3Hr1G072900
3H072900 CB qRP 02	oSY 171	CAGCAGCTCTCGAAACCAAACCG	68	
4H003420 ERD qFP 01	oSY 176	GGCAGAATGGAAGAGATTCACGAG	68	qPCR HORVU4Hr1G003420
4H003420 ERD qRP 01	oSY 178	CGTCCGAATGTAGCTCCTGGTTG	68	
6H083570 GR qFP 02	oSY 189	CCGCTGAGCGTGTACATCAGCTC	66	qPCR HORVU6Hr1G083570
6H083570 GR qRP 01	oSY 190	GATTACTATCTGAGAGGTCGTTGG	66	
5H063510 GR qFP 02	oSY 193	TGGCAGAGGCCCTTAAACCTTGGC	68	qPCR HORVU5Hr1G063510
5H063510 GR qRP 02	oSY 195	TTGCTCGCTACAGTGTACACGAG	68	
Actin3 qPCR FP	oAA 019	GTTATCATCTAGTCTTCGGTTATG	56	qPCR Actin3 Referenzgen
Actin3 qPCR RP	oAA 020	ACACACTGACAATGCACAAACATA	56	

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide (Primer). Der Name und die Nummer dienen primär als interne Referenz. Gezeigt ist auch die gewählte Hybridisierungstemperatur (°C).

2.3. Pflanzenmaterial und Sortenliste

In dieser Arbeit wurden Proben von Pflanzen analysiert, die in einem Rollgewächshaus (RGH) gewachsen sind. Das RGH befindet sich am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in D-85354 Freising. Die Aufzucht der Pflanzen fand unter Aufsicht von Dr. Markus Herz und Dr. Jennifer Groth statt. Im Rahmen eines Projektverbunds (www.bayklimafit.de), der vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz gefördert wurde, durften die Pflanzen probiert und analysiert werden.

#	Name	Z	K	2016	2017	2018	#	Name	Z	K	2016	2017	2018
BF 001	IPZ 24727	2	ZL	x	x	x	BF 035	B3162	2	ZL	x	x	
BF 002	Barke	2	EU	x	x	x	BF 036	B3194	2	ZL	x		
BF 003	Grace	2	EU	x	x	x	BF 037	B3254	2	ZL	x	x	
BF 004	RGT Planet	2	EU	x	x	x	BF 038	B3482	2	ZL	x	x	
BF 005	Arg. DH 168	2	MD	x	x	x	BF 039	B3274	2	ZL	x		
BF 006	Abessinische (ETH)	6	MD	x	x		BF 040	B3457	2	ZL	x		
BF 007	Alava KANN	6	MD	x	x		BF 041	B3914	2	ZL	x	x	
BF 008	BRS 195 (Bra)	2	MD	x	x		BF 042	Scarlett	2	EU	x	x	x
BF 009	Caminant	2	EU	x			BF 043	Alexis	2	EU	x		
BF 010	CDC McGwire (Kann)	2	US	x	x		BF 044	Arg. DH 22	2	MD	x	x	
BF 011	Emperor (Kann)	2	US	x	x		BF 045	Lotos	2	EU	x	x	
BF 012	Jerusalem (IL)	2	MD	x	x		BF 046	Baronesse	2	EU	x	x	
BF 013	Lenka	2	EU	x	x		BF 047	Eunova	2	EU	x	x	x
BF 014	Marnie	2	EU	x	x	x	BF 048	SHAKIRA	2	EU	x	x	
BF 015	Union	2	EU	x			BF 049	Arg. DH 16	2	MD	x		
BF 016	Engledow India	6	US	x	x		BF 050	Endora	2	EU	x	x	
BF 017	Iron	2	EU	x	x		BF 051	Ventina	2	EU	x	x	
BF 018	Pamella Blue	2	MD	x	x		BF 052	B0001	2	ZL	x	x	
BF 019	Quench	2	EU	x	x	x	BF 053	B0004	2	ZL	x	x	x
BF 020	Marthe	2	EU	x	x		BF 054	Romilda	2	EU	x	x	x
BF 021	Propino	2	EU	x	x		BF 055	Umbrella	2	EU	x	x	x
BF 022	Streif	2	EU	x	x		BF 056	Aischa	2	EU	x	x	x
BF 023	Tesla	2	EU	x			BF 076	12/667/25	2	ZL		x	
BF 024	Foster	6	US	x	x		BF 077	13/594/74	2	ZL		x	x
BF 025	Ven	6	US	x	x		BF 082	13/554/34	2	ZL		x	
BF 026	B3163	2	ZL	x	x		BF 083	13/568/39	2	ZL		x	
BF 027	B3250	2	ZL	x	x		BF 089	13/542/6	2	ZL		x	
BF 028	B3484	2	ZL	x			BF 092	STRG 690/16	2	ZL		x	
BF 029	B4032	2	ZL	x	x		BF 094	STRG 695/16	2	ZL		x	
BF 030	B4403	2	ZL	x	x		BF 101	STRG 706/16	2	ZL		x	x
BF 031	Flagship	2	MD	x	x		BF 103	Sydney	2	EU	x	x	
BF 032	Morex (M78)	6	US	x	x		BF 107	STRG 654/14	2	ZL		x	
BF 033	Steptoe	6	US	x	x		BF 108	STRG 606/12 DILIGENCE	2	ZL		x	
BF 034	Auriga	2	EU	x	x		BF 109	STRG 689/12 A	2	ZL		x	

Tabelle 2: Liste der analysierten Gerstengenotypen. In drei Versuchsjahren wurden insgesamt 68 Gerstengenotypen im RGH angebaut. Die Nummer dient primär der internen Referenz. Am Projektverbund waren die drei kommerziellen Züchtungsbetriebe Saatucht Josef Breun GmbH & Co. KG (Herzogenaurach), Ackermann Saatucht GmbH & Co. KG (Irlbach) und Saatucht Streng-Engelen GmbH & Co. KG (Uffenheim) involviert. Einige der Sorten stammten aus den aktuellen Zuchtprogrammen dieser Betriebe und wurden dem Projekt nur kodiert zur Verfügung gestellt. Die Analyse dieser Sorten erfolgte blind, weshalb keine Klassifikation stattfinden konnte. K: Klassifikation; ZL: Zuchtlinie; EU: Elitelinien für den Anbau

in Europa, US: Eliteline für den Anbau in Nordamerika, MD: Genotyp, der als trocken/hitzeadaptiert eingestuft wurde. Z: Ährenarchitektur: 2: zweizeilig, 6: sechszeilig. Markiert sind die Genotypen, die im entsprechenden Jahr im RGH angebaut wurden.

2.4. Pflanzenanzucht im RGH und Wachstumsparameter

Die Aussaat der Pflanzen erfolgte am 05.04.2016, 30.03.2017 sowie am 26.03.2018. Das RGH (circa 450 m² Nutzfläche) wurde darauf programmiert im Verlauf des Experiments bei Regen über die Versuchsfläche zu rollen und die Pflanzen somit vor Niederschlag abzuschirmen. Sonst wurden die Pflanzen nicht abgeschirmt. Die Pflanzen, die Trockenstress erfahren sollten, wurden nicht bewässert. Kontrollbedingungen wurden mit 20 mm/m² Sprühbewässerung von oben, ein bis zweimal pro Woche erzeugt. In den Jahren 2016 und 2017 wuchsen die Genotypen in Doppelreihen (je 40 Pflanzen), im Jahr 2018 wuchsen sie in 3,5 m² großen Parzellen. Die Versuchsfläche war in Quadranten aufgeteilt. Je Quadrant wuchs jeder Genotyp einmal. Die Position innerhalb der Quadranten war randomisiert. Die diagonal gegenüberliegenden Quadranten wurden bewässert. Um Randeffekte zu vermeiden wurde zwischen den Quadranten und am Rand der Versuchsfläche Randbepflanzung eingesetzt. In den Jahren 2016 und 2017 wurde die Bodenfeuchte in 15 cm, 45 cm und 75 cm Tiefe in regelmäßigen Abständen gemessen. Die Ortstemperatur wurde an einer nahegelegenen Wetterstation (ca. 300 m vom RGH entfernt) gemessen. Die Bestimmung der morphologischen und physiologischen Parameter erfolgte unter Aufsicht von Dr. Markus Herz und Dr. Jennifer Groth. Zugang zu den Daten in Anhang 6.2.

2.5. Probennahme von Blattproben

Der Tag der Probennahme wurde auf Basis der Entwicklungsgeschwindigkeiten der Pflanzen festgelegt. Die Probennahme erfolgte zu einem Zeitpunkt, ab dem alle Sorten Ährenschieben aufgewiesen hatten (BBCH-Skala für Getreide: ab Stadium 59 (Lancashire et al. 1991), basierend auf der Zodaks-Skala (Zodaks et al. 1974)). Die Probennahme erfolgte am 22.06.2016, 22.06.2017 sowie am 06.06.2018. Je Genotyp und je Wachstumsbedingungen wurden vier (2016, 2017) bzw. fünf (2018) Blattprobenpools erstellt, die fortan als biologische Replikate angesehen wurden. Je Blattprobenpool wurden vier bis sechs Fahnenblätter -1 vereint. Die Blätter wurden circa 2 cm vom Halm entfernt abgeschnitten. Auch circa 5 cm der Blattspitze wurde entfernt. Die Probenpools wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Auf Grund der hohen Anzahl der Proben (2016: 456; 2017: 472;

2018: 150) wurde sukzessiv immer ein Replikat von allen Genotypen erstellt, bevor das nächste Replikat für alle Genotypen erstellt wurde. Auch wurden die Replikate der Wachstumsbedingungen im Wechsel erstellt. Somit verteilte sich der Effekt verschiedener Tageszeiten möglichst gleichmäßig auf alle Genotypen und Wachstumsbedingungen. Zeitraum Probennahme: 13:15-19:15 Uhr (2016), 12:30-19:30 Uhr (2017), 09:30-12:00 Uhr (2018).

2.6. Probennahem von unreifen Körnern

Parallel zur Probennahme an Blättern wurden am 22.06.2017 auch Proben von unreifen Körnern gesammelt. Von zehn ausgewählten Genotypen wurde dafür pro Wachstumsbedingung eine repräsentative Ähre beprobt, die sich im Stadium zwischen der frühen bis späten Milchreife (BBCH-Skala für Getreide: Stadium 73-77) befand. Beginnend beim untersten Korn wurde jedes Korn einzeln aus der Ähre gelöst, von allen Spelzen befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Körner gewogen, um anhand des Frischgewichts das Alter abzuschätzen.

2.7. DNA-Extraktion

Genomische Desoxyribonucleinsäuren (gDNA) wurden aus Blattproben extrahiert. Die Extraktion basierte auf einem von Faris et al. (2000) entwickeltem Protokoll, adaptiert für die Verwendung von 2 ml Reaktionsgefäßen. Details können Schuy et al. (2019) entnommen werden.

2.8. RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-Ribonucleinsäuren (RNA) aus Blattgewebe oder unreifen Körnern basierte auf einem von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickeltem Protokoll. Das Protokoll wurde adaptiert und erweitert. Details können Schuy et al. (2019) entnommen werden. Der Gehalt, die Reinheit und die Integrität der extrahierten RNA wurde mit einem NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland), einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland) und über Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.9. PCR, Gelelektrophorese und Gelaufreinigung

Die Amplifikation von genomischen Fragmenten für die Sequenzierung oder den Verdau in CAPS-Markern erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), entsprechend den Angaben des Herstellers. Die verwendeten Oligonukleotide sowie die Hybridisierungstemperaturen sind aufgelistet (Tabelle 1). DNA und RNA Proben (gDNA, cDNA, RNA, PCR, CAPS-Verdau (Abschnitt 2.14)) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Laufpuffer: TBE-Puffer (Tris-HCl 10,8 g/l, Borsäure 5,5 g/l, EDTA 2 mM), Gelmatrix: 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer. DNA-Fragmente nach Agarose-Gelelektrophorese wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Zugang zu den ermittelten Daten in Anhang 6.2.

2.10. cDNA Synthese und qPCR

Für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) wurde 1000 ng Gesamt-RNA aus Blattproben oder 100 ng Gesamt-RNA aus Kornproben eingesetzt. Die Synthese erfolgte mittels RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die cDNA Synthese wurden Oligo(dT)³⁰ Nukleotide verwendet. Die relativen Transkriptmengen wurden unter Verwendung des Promega GoTaq® qPCR Master Mix 2x (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) in technischen Triplikaten in einer Agilent Technologies G8830A AriaMx Real-Time PCR Maschine (Agilent Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland) entsprechend dem unten folgenden Protokoll bestimmt. Die relativen Transkriptmengen (Qrel) wurden mittels der $\Delta\Delta Ct$ Methode (Livak & Schmittgen 2001) anhand des *HvActin3*-Transkripts normalisiert. Zugang zu den ermittelten Daten in Anhang 6.2.

qPCR Reaktionsansatz	
10,0 µl	Promega GoTaq® qPCR Master Mix 2x
0,4 µl	Primer 1 (10 µM)
0,4 µl	Primer 2 (10 µM)
1,0 µl	cDNA
8,2 µl	H ₂ O _{bidest}

Tabelle 3: qPCR Reaktionsansatz. Verwendete Primer siehe Tabelle 1.

Programmverlauf		Zeit	Temperatur
Hot Start		3 min	95 °C
Amplifikation	40 Zyklen	15 sek	95 °C
		30 sek	spezifisch nach Primerpaar
		20 sek	72 °C
		30 sek	95 °C
Schmelzkurve		30 sek	spezifisch (s.o.)
		Anstieg 0,5 °C / 5 sek bis 95 °C	
		30 sek	95 °C

Tabelle 4: qPCR Programm.

2.11. Sanger-Sequenzierung und Sequenzverwaltung

Für die Sequenzierung der Genvarianten wurde genomische DNA als Template für die PCR verwendet. Die Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (Abschnitt 2.9). Die verwendeten Oligonukleotide sind aufgelistet (Tabelle 1). Für die *Pyruvat-Kinase* wurden die qPCR-Primer verwendet. Die Sequenzierung wurde vom kommerziellen Sequenzierungsanbieter Eurofins GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierungen wurden über die Sequenzdatenbank *Geneious* Version 5.6 (Drummond et al. 2012) verwaltet. Zugang zu den ermittelten Daten in Anhang 6.2.

2.12. Kartierung von Strukturgenen

Die Verankerung erfolgte auf dem aktuellen Referenz-Assembly des Gerstengenoms, das auf dem Genotyp Morex basiert (MRA, Mascher et al. 2017, Beier et al. 2017). Zusätzlich wurden *whole genome shotgun sequencing contigs* (WGS_contigs) der drei Genotypen Barke, Bowman und Morex betrachtet (IBGSC 2012). Ausgangspunkt waren die Primärsequenzen von bekannten und gut annotierten Strukturgenen, primär aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Verglichen wurden auch Sequenzhomologe aus weiteren Getreidearten (Mais (*Zea mays* L.), Reis (*Oryza sativa* L.)). Eine Auflistung aller identifizierten Gene und weitere Details finden sich in Anhang 6.1.

2.13. KASP-Marker

Die Bestimmung der SNP-Marker *i_SCRI_RS_225155*, *i_SCRI_RS_237466* und *i_SCRI_RS_184488* über die KASP-Technologie (Kompetitive Allelspezifische PCR) wurde von der Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG (Herzogenaurach) durchgeführt. Details können Schuy et al. (2019) entnommen werden. Zugang zu den Daten in Anhang 6.2.

2.14. CAPS-Marker

Zur Bestimmung der CAPS-Marker wurden genomische Fragmente durch PCR amplifiziert, aufgereinigt und anschließend mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des Herstellers verdaut. Anschließend wurde das Bandenmuster über Gelelektrophorese mit den erwarteten Bandengrößen verglichen. Zugang zu den ermittelten Daten in Anhang 6.2.

		<i>HPT-7H</i> CAPS1				<i>HPT-7H</i> CAPS2	
		PCR		Verdau		PCR	Verdau
		HPT-7H_F4_FP HPT-7H_F5_RP	EcoRI	DraI	AatII	HPT-7H_F7_FP HPT-7H_F7_RP	NcoI
<i>HPT-7H</i> - Allel	Morex	1869	940 929	1869	1869	1065	926 139
	Barke	1869	1869	944 925	1869	1053	507 416 130
	Bowman	1869	1869	944 925	1869	1043	916 127
	Umbrella	1869	1869	944 925	1042 827	1047	507 413 127
		<i>HGGT</i> CAPS					
		PCR		Verdau			
		HGGT_F1_FP HGGT_F1_RP	PciI				
<i>HGGT</i> - Allel	Morex	1025	659 366				
	Barke	1021	655 321 45				
	Bowman	1013	692 321				

Tabelle 5: CAPS-Marker Design. Für die eindeutige Bestimmung der vier *HPT-7H*-Allele mussten zwei PCR-Fragmente amplifiziert werden. Für die eindeutige Bestimmung der drei *HGGT*-Allele musste ein PCR-Fragment amplifiziert werden. Gezeigt sind die beiden Oligonukleotide (siehe Tabelle 1) und die erwarteten Bandengrößen [bp] nach PCR und nach Verdau mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen.

2.15. SNP-Chip

Die Genotypisierung aller Genotypen erfolgte mit dem *Illumina* iSelect 9K SNP Chip unter Aufsicht von Dr. Günther Schweizer (LfL, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Freising). Details können Schuy et al. (2019) entnommen werden. Der Genotyp Tesla wurde aus organisatorischen Versäumnissen nicht genotypisiert. Zugang zu den verwendeten Markern in Anhang 6.2.

2.16. GWAS

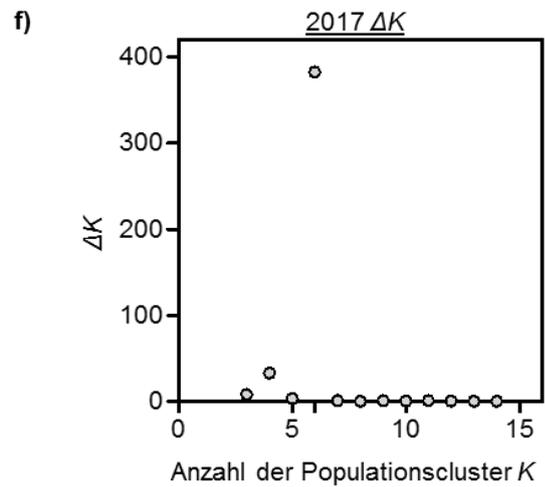
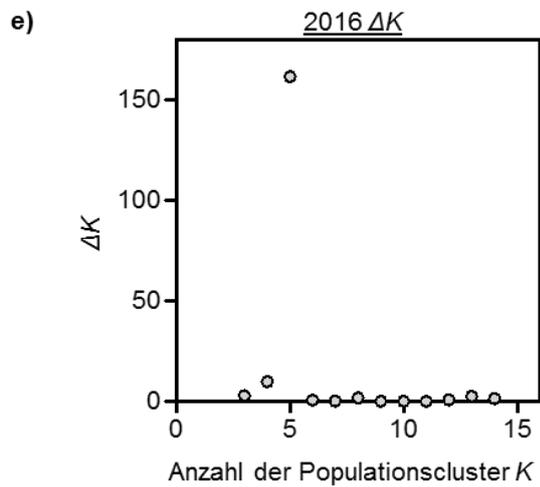
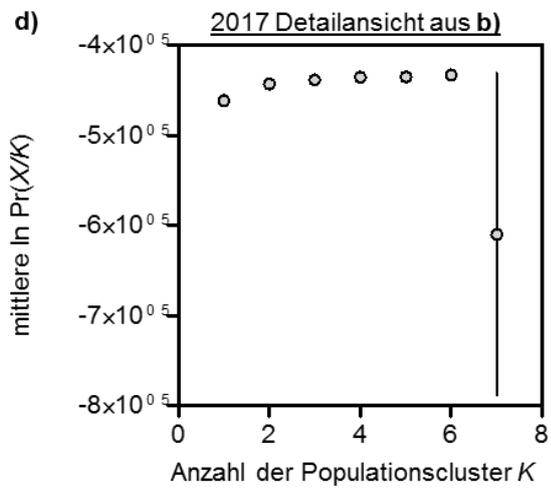
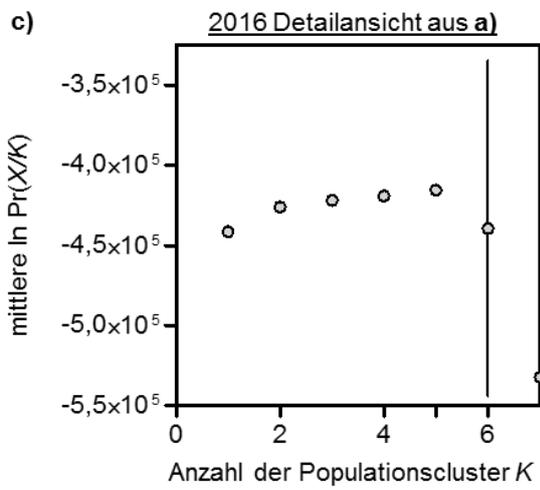
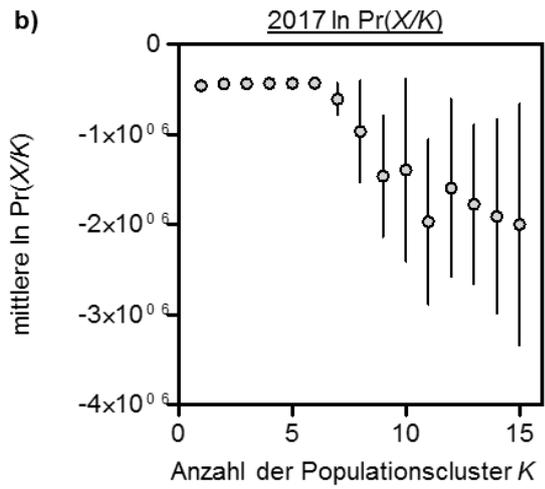
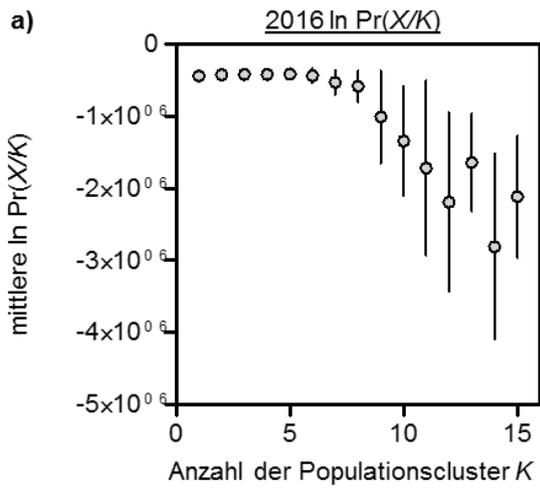
Für die Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurde die Analyseplattform *easyGWAS* (Grimm et al. 2017) eingesetzt, ein web-basiertes Programm (<https://easygwas.ethz.ch/>) des *Machine Learning and Computational Biology Research Labs* der ETH Zürich. Die notwendige Datenhäufigkeit für die Verwendung eines SNP-Markers (Abschnitt 2.15) in einer GWAS in der Analyseplattform *easyGWAS* betrug 100 %, d.h. lediglich 2260 Marker (28,74 % aller Marker), die für alle Genotypen erfolgreich bestimmt werden konnten, konnten für die GWAS verwendet werden. Die Analyse erfolgte anhand der standardmäßig vorgegebenen Einstellungen (keine Datentransformation, keine Kovarianten, kein Allelhäufigkeitsfilter, additive SNP Encodierung, EMMAX Algorithmus). Lediglich die multiple Testkorrektur gegen die Alphafehler-Kumulierung (Fehler 1. Art) wurde nach Benjamini & Hochberg (*False discovery rate* FDR) berechnet. Assoziationen mit $p_{adj} < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Zugang zu den verwendeten Markern in Anhang 6.2.

2.17. Analyse der Populationsstruktur

Die Populationsstruktur wurde getrennt für die Genotypen bestimmt, die im Jahr 2016 und 2017 wuchsen. Die Analyse erfolgte auf Basis von 4320 SNP-Markern (Abschnitt 2.15). Diese Marker wiesen in beiden Genotypensets (2016, 2017) jeweils mindestens eine Datenhäufigkeit von 90 % (*data frequency*), und mindestens eine Häufigkeit von 10 % für die seltenere SNP-Variante auf (*minor allele frequency*). Die Analyse erfolgte mit einem modellbasierten Ansatz, basierend auf den Arbeiten der Pritchard-Gruppe (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003, Falush et al. 2007, Hubisz et al. 2009), die in der Anwendung STRUCTURE v2.3.4 (<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>) implementiert sind. Um Heterozygotie zu berücksichtigen wurden die Daten mit einem Ploidiegrad von zwei formatiert. Es wurde das *admixture model* gewählt und keine *prior* Populationsinformation, jedoch korrelierte Allelhäufigkeit angenommen. Wie in der

Dokumentation des Programms empfohlen, wurde die Allelhäufigkeitsverteilung (λ) zunächst bei einer Populationsgröße (K) von 1 bestimmt und anschließend für alle folgenden Analysen auf den ermittelten Wert festgelegt. Nach fünf Programmläufen bei $K=1$ mit jeweils 100'000 *burn-in* und 500'000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) Iterationen wurde λ für 2016 auf den Mittelwert von 3,13606 (σ : 0,01373) und für 2017 auf 2,86704 (σ : 0,02380) festgelegt. Für jedes K von 1 bis 15 wurde die Populationsstruktur anschließend zwanzigmal abgeleitet. Anhand der *A-posteriori*-Wahrscheinlichkeit von K ($\ln \Pr(X|K)$), die Anhand des Parameters *estimated ln prob. of data* vom Programm nach jedem Lauf angegeben wird, wurde für 2016 $K=5$ und für 2017 $K=6$ gewählt, da, wie in der Dokumentation des Programms vorgeschlagen, hier $\ln \Pr(X|K)$ ein stabiles Plateau erreichte und der von Evanno et al. (2005) postulierte Wert ΔK maximal ist (Abbildung 12). Für die Darstellung wurde die abgeleitete Abstammung jedes Genotyps (der etablierte Zugehörigkeitskoeffizient jeder Sorte zu jedem Populationscluster) aller zwanzig Programmläufe gemittelt. Die mittlere Standardabweichung aller Populationsclusterzugehörigkeiten aller Genotypen betrug 0,004. Damit hätte jeder Lauf auch repräsentativ für alle Läufe verwendet werden können. Zugang zu den verwendeten Markern und den ermittelten Werten in Anhang 6.2.

Abbildung 12 (nächste Seite): Bestimmung der Anzahl der Populationscluster. Für die Jahre 2016 (links) und 2017 (rechts) wurde die *A-posteriori*-Wahrscheinlichkeit von K ($\ln \Pr(X|K)$) für jedes K von 1 bis 15 zwanzigmal bestimmt. **a-d)** Gezeigt sind die Mittelwerte (plus Standardabweichung) von $\ln \Pr(X|K)$. **e,f)** Gezeigt ist ΔK nach Evanno et al. (2005). Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).



2.18. Bestimmung des Tocochromanolgehalts

Der Gehalt von fünf Tocochromanolarten (α -, γ - und δ -Tocopherol, sowie α - und γ -Tocotrienol) in Blatt- und Korngewebe erfolgte nach einer von Panfili et al. (2003) und Abbasi et al. (2007) adaptierten Methode. Aus Blattgewebe (40-80 mg (FG)) wurde in drei Schritten mit 1 ml und zweimal 500 μ l Methanol (MeOH) für je 30 min bei 30 °C extrahiert. Die Extrakte wurden vereint, in einem Vakuumkonzentrator eingeeengt, in 250 μ l MeOH aufgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Für die Extraktion aus reifen Körnern wurden diese zunächst mit einer haushaltsüblichen elektrischen MC 23200 Kaffeemühle (Siemens, München) gemahlen. Es wurden immer zehn Körner gleichzeitig gemahlen und 80-100 mg für die Extraktion aliquotiert. Extrahiert wurde viermal mit 1 ml MeOH für 1 h bei 4 °C und 1500 rpm horizontalem Schütteln. Ein beigefügtes Stahlkugeln verhindert die Sedimentation des Pulvers. Die Extrakte wurden vereint, mittels Vakuumkonzentrator eingeeengt, in 250 μ l MeOH aufgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die unreifen Körner wurden einzeln in flüssigem Stickstoff gemörsert und dreimal mit 1 ml MeOH entsprechend der Methode extrahiert, die bei reifen Körnern verwendet wurde. Der Gehalt der Tocochromanolarten in den finalen Extrakten wurde mit Hilfe eines Dionex Ultimate 3000 HPLC Systems (ThermoFisher Scientific, Schwerte) bestimmt. Die Auftrennung erfolgte nach einer Phenomenex Luna Security Guard C18 Vorsäule (4,0 x 3,0 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg) in einer Phenomenex 5 μ m Luna C18 *reverse phase* Hauptsäule (250 x 4,6 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min in einer isokratischen Acetonitril:Methanol (50:50, v/v) mobilen Phase für 30 min bei 30 °C. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm und einer Emissionswellenlänge von 325 nm. Die Quantifikation erfolgte anhand von externen Standards definierter Molarität. Zugang zu den Daten in Anhang 6.2.

2.19. Statistische Analysen und weitere verwendete Programme

Der exakte Test nach Fisher wurde in der statistischen Umgebung R v3.5.1 berechnet (R Core Team 2018). Ein- und Zweistichproben-t-Tests wurden in Microsoft Excel (2016) berechnet. Varianzanalysen mit multipler Testkorrektur wurden innerhalb der GraphPad Prism v5 Software berechnet. Abbildungen wurden mit allen genannten Programmen und Microsoft Powerpoint (2016) erstellt.

2.20. RNAseq Analysen

Für die Analyse des Transkriptoms wurde Gesamt-RNA extrahiert (Abschnitt 2.8) und an den kommerziellen Sequenzierungsdienstleister Eurofins GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) geschickt. Nach Qualitätscheck wurde die mRNA über Polyadenylierung am 3'-Ende angereichert (*PolyA-enrichment*), fragmentiert und strangspezifisch randomisiert-geprint in cDNA umgeschrieben. Für die Sequenzierung über Illumina® *paired-end* Sequenzierung wurden probenspezifische Bibliotheksadapter ligiert. Die Länge der Sequenzierungen betrug 150 bp, wobei je Probe mindestens 30 Millionen Sequenzpaare sequenziert werden sollten. Die Lieferung der Sequenzen erfolgte in FastQ-Dateien, welche Qualitätsparameter für jede sequenzierte Base enthielten. Die anschließende Aufarbeitung dieser Rohdaten, von den individuellen Sequenzen (*reads*) zu Expressionshöhen von individuellen Genen (*counts*) erfolgte ausschließlich durch Herrn Dr. José María Corral García (jose.m.corral (at) fau.de, ORCID ID: 0000-0001-7110-5756). Die bioinformatische Aufarbeitung war nicht Teil dieser Arbeit, die vollzogenen Bearbeitungsschritte basierten ausschließlich auf seiner Expertise. Eine Übersicht der Schritte wurde zusammengefasst (Tabelle 6). Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit folgenden Analysen zur differentiellen Genexpression waren die bereitgestellten *counts*, jeder Probe jedes Gens des MRA. Zugang zu den Daten in Anhang 6.2.

Die Analyse der differentiellen Genexpression erfolgte mit dem DESeq2-Paket (Love et al. 2014) in der statistischen Umgebung R v3.5.1 (R Core Team 2018). Beim Vergleich verschiedener Wachstumsbedingungen wurde $p_{\text{adj}}=0,05$ als Schwellenwert für statistische Signifikanz gewählt. Zugang zu den ermittelten Genen in Anhang 6.2. Die Auflistung spezifischer Schnitt- und Ausschlussmengen dieser Gene findet sich in den Tabellen Tabelle 21 bis Tabelle 26. Bei der Assoziation mit der Ertragsstabilität und beim Vergleich der beiden Genotypen Barke und B0004 mit den übrigen Genotypen wurde $p_{\text{adj}}=0,001$ als Schwellenwert für statistische Signifikanz gewählt. Zugang zu den ermittelten Genen in Anhang 6.2. Die Auflistung spezifischer Schnitt- und Ausschlussmengen dieser Gene findet sich in Tabelle 27 und Tabelle 28. Ein weniger stringenter Schwellenwert inkludierte Gene, die bei manueller Durchsicht, heuristisch betrachtet, nicht den gewünschten Kriterien entsprachen.

Tabelle 6 (nächste Seite): Übersicht über die RNAseq Rohdaten Aufarbeitung. Ausgewählte Programme und Parameter auf Basis der Expertise von Herrn Dr. José María Corral García (Vergleiche Text Abschnitt 2.20). Die unterstrichenen Arbeitsschritte waren nicht Teil dieser Arbeit.

Arbeitsschritt	Programm + Beschreibung
RNA-Extraktion	Siehe Abschnitt 2.8
<u>Rohdaten</u>	FastQ-Daten (geliefert von GATC/Eurofins GmbH)
<u>Qualitäts-Check</u>	FastQC (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Erkennt aufgrund der <i>tile</i> und <i>lane</i> Zuordnung der <i>reads</i> auf Basis der Qualitätsscores der einzelnen Nukleotide, ob systematische Probleme bei der Sequenzierung auftraten, welche die Qualität minderten (z.B. Kratzer oder Unreinheiten auf dem Illumina Chip)
<u>Adapter- und Qualitäts-trimming</u>	Bduk (auf MS-DOS Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Entfernt bibliotheksspezifische Adapter- und Indexsequenzen von den <i>reads</i> (Parameter: ref=adapters, ktrim=rl, k=23, mink=11, hdist=1, tpe, tbo, qtrim=rl, trimq=20, minlen=35) - Entfernt <i>reads</i> mit niedriger Qualität (Q<20, FastQ und FastQC Qualität)
<u>Qualitäts-Check</u>	FastQC (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Validierung des Trimmings
<u>Mapping</u>	STAR (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Mapping der einzelnen <i>reads</i> auf das aktuelle Morex-Referenzgenom (runThreadN 12, alignIntronMax 15000, alignMatesGapMax 15000)
<u>Counting</u>	featureCounts of Subread (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Für jeden vorhergesagten Genlokus des aktuellen Morex-Referenzgenoms werden die dort gemappten <i>reads</i> gezählt (<i>counts</i>)
<u>Mapping zur Visualisierung und count-Verifizierung</u>	IGV (auf Java Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Visualisierung des Mappings aller <i>reads</i> - Verifizierung des <i>Countings</i> - Schneller visueller Zugang zu den SNP-Mustern der verschiedenen Genotypen (für Allelidentifizierung)
<u>Expressions-Analyse</u>	DESeq2 (auf Linux Basis) <ul style="list-style-type: none"> - Normalisiert die <i>counts</i> auf Basis der <i>count</i>-Verteilung und Menge aller Gene, und berechnet signifikante statistische Zusammenhänge zwischen den normalisierten <i>counts</i> und den zu analysierenden Parametern, die als Input gesetzt werden

2.21. GO-Anreicherung und KEGG Kategorien

Die Analyse der Anreicherung von Genontology (GO) erfolgte mit der web-basierten Analyseplattform *AgriGOv2* (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) (Tian et al. 2017), auf Basis der Gen IDs des MRA.

Auf Basis der translatierten primären Transkripte (MRA) wurden mit dem web-basierten BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) der *Kanehisa Laboratories* (<https://www.kanehisa.jp/>) (Kanehisa & Sato 2020) den Genen KEGG-Kategorien zugeteilt. Diese wurden anschließend mit dem KEGG-Mapper (https://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway1.html) in den KEGG-Karten für Arabidopsis (*ath*) visualisiert (Kanehisa & Sato 2020).

3. Ergebnisse

3.1. Validierung eines Tocopherol QTLs auf Chromosom 7H und weiterführende Analysen zum Tocochromanolgehalt in Gerstenpflanzen

3.1.1. Messung des Tocochromanolgehalts in Blättern

Der Gehalt von fünf Tocochromanolarten (γ - und α -Tocotrienol, sowie δ -, γ - und α -Tocopherol) sämtlicher Blattproben der RGH-Experimente der Jahre 2016 und 2017 wurde mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) bestimmt (Tabelle 7).

	γ -Tocotrienol	α -Tocotrienol	δ -Tocopherol	γ -Tocopherol	α -Tocopherol
Mittelwert:	0,15	4,28	0,07	2,39	65,92
σ :	0,29	1,81	0,21	3,61	24,70

Tabelle 7: Tocochromanolgehalt in Blättern in RGH-Experimenten. Von Pflanzen, die in einem Rollgewächshaus (RGH) wuchsen, wurde der Tocochromanolgehalt [ng/mgFG] (Frischgewicht) in Fahnenblättern -1 zum Zeitpunkt des Ährenschiebens (BBCH-Skala für Getreide, ab Stadium 59) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Die Daten wurden für die verschiedenen Genotypen, Wachstumsbedingungen und Versuchsjahre getrennt ausgewertet und anschließend als Mittelwerte (plus Standardabweichung (σ)) für diese Tabelle zusammengefasst. Zugang zur vollständigen Aufschlüsselung nach Genotyp, Wachstumsbedingung und Jahr in Anhang 6.2.

Die durchschnittlichen Werte sind mit den aus der Literatur bekannten Werten für ausgewachsene Gerstenblätter (z.B. Templer et al. 2017) vergleichbar. Dabei stellte α -Tocopherol charakteristischerweise mit 90,84 % (σ : 3,19 %) in diesem Gewebe den größten Anteil am Gesamt-Tocochromanol-Gehalt dar. Es wurden signifikante Unterschiede in der Gesamtmenge der einzelnen Arten, der Komposition (Verteilung der verschiedenen Arten) und der Akkumulation (Reaktion auf verschiedene Wachstumsbedingungen) der Tocochromanole in den verschiedenen Gerstengenotypen gefunden, die in den folgenden Absätzen nach und nach aufgeschlüsselt werden. Zugang zu den für jeden Genotyp individuell gemessenen Werten, sortiert nach Jahr und Wachstumsbedingung, in Anhang 6.2.

3.1.2. Bestimmung genetischer Marker und Assoziation zum Tocochromanolgehalt in Blättern

Um Zusammenhänge zwischen dem Tocochromanolgehalt der verschiedenen Genotypen und den fünf SNP-Markern herzustellen, die in den Analysen von Templer et al. (2017) mit dem γ -Tocopherol in Verbindung standen (Abbildung 1), sollten die Marker gezielt über KASP-Analysen (Kompetitive Allelspezifische PCR) bestimmt werden. Dadurch sollte zunächst die umfangreichere, aber kostenintensivere Genotypisierung mittels eines SNP-Chips umgangen werden. Die Analyse gelang nur für die drei Marker *i_SCRI_RS_184488*, *i_SCRI_RS_225155* und *i_SCRI_RS_23746*. Später wurden auf Grund erweiterter Fragestellungen alle Genotypen doch mittels eines SNP-Chips genotypisiert, weshalb auch die Ausprägungen der beiden übrigen Marker (*i_SCRI_RS_4520* und *i_SCRI_RS_154069*) bestimmt werden konnten. Da die Genotypisierung mit dem SNP-Chip nicht in allen Genotypen für alle Marker erfolgreich war, konnten die KASP-Analysen die fehlenden Daten des SNP-Chips ergänzen.

In Einklang mit den von Templer et al. (2017) beschriebenen Beobachtungen, konnte auch für die Genotypen, die im RGH unter Trockenstress wuchsen, ein Zusammenhang zwischen dem γ -Tocopherolgehalt und der Ausprägung der fünf beschriebenen SNP-Marker identifiziert werden (Tabelle 8). Demnach konnte für jeden der fünf SNP-Marker eine SNP-Variation validiert werden, die überwiegend mit einem hohen und eine SNP-Variante, die überwiegend mit einem niedrigen Gehalt von γ -Tocopherol assoziiert war. Zusätzlich dazu wurden auch signifikante Assoziation zwischen den Ausprägungen der Marker und dem γ -Tocopherolgehalt von Pflanzen gefunden, die unter gut bewässerten Bedingungen gewachsen waren, sowie Assoziationen zum α -Tocopherolgehalt unter beiden Wachstumsbedingungen (Tabelle 8). Dies wurde in den genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) von Templer et al. (2017) nicht beobachtet und festigt die Hypothese, dass die Ausprägung dieser Genomregion fest mit dem Tocopherolgehalt in Verbindung steht.

		2016				2017			
		bewässert		trocken		bewässert		trocken	
		γ-Tph	α-Tph	γ-Tph	α-Tph	γ-Tph	α-Tph	γ-Tph	α-Tph
i_SCRI_RS _4520 (n: 49)	G (n: 22)	0,61	43,20	0,80	57,13	0,87	57,32	2,81	75,80
	p-Wert t-Test	0,0875	0,1894	0,0014	0,0890	0,0008	0,0032	0,0011	0,0017
	T (n: 27)	0,76	47,70	1,32	65,14	1,58	69,33	7,55	100,21
i_SCRI_RS _154069 (n: 67)	T (n: 39)	0,62	42,94	0,82	56,46	1,13	59,07	4,49	79,46
	p-Wert t-Test	0,0421	0,1047	0,0030	0,0130	0,0027	0,0002	0,0069	0,0002
	C (n: 28)	0,80	48,66	1,51	68,78	1,77	73,18	8,65	106,41
i_SCRI_RS _184488 (n: 68)	G (n: 49)	0,63	41,13	0,90	55,75	1,03	57,63	5,11	79,96
	p-Wert t-Test	0,0231	< 0,0001	0,0128	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0111	< 0,0001
	T (n: 19)	0,91	58,38	1,76	79,26	2,18	80,68	8,65	113,86
i_SCRI_RS _225155 (n: 67)	T (n: 38)	0,61	42,96	0,82	56,23	1,04	58,29	4,42	78,31
	p-Wert t-Test	0,0254	0,0783	0,0027	0,0054	0,0002	< 0,0001	0,0057	< 0,0001
	C (n: 29)	0,81	49,22	1,49	69,53	1,81	74,18	8,69	108,55
i_SCRI_RS _237466 (n: 68)	C (n: 48)	0,63	41,85	0,93	56,80	1,14	58,89	5,76	82,50
	p-Wert t-Test	0,0411	0,0009	0,0380	0,0068	0,0005	< 0,0001	0,3156	0,0002
	T (n: 20)	0,87	54,39	1,58	73,65	1,96	78,01	7,29	108,52

Tabelle 8: Assoziationen zwischen Tocopherolgehalt in Blättern und Ausprägung von SNP-

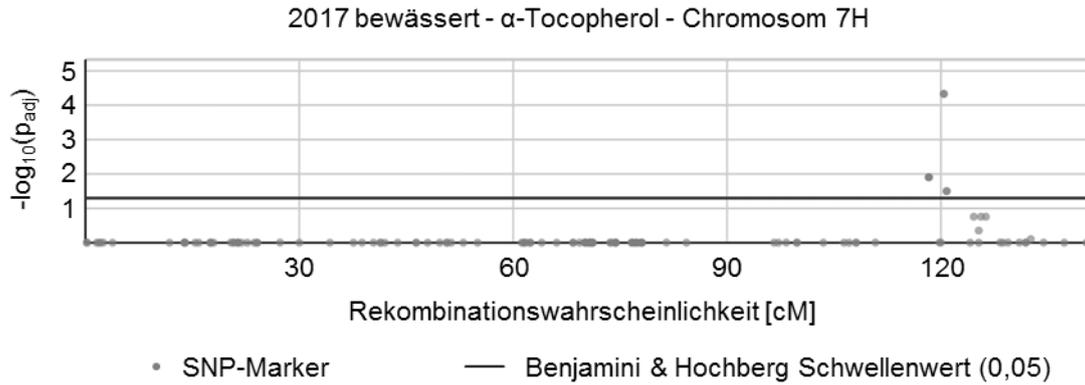
Markern. Die Ausprägungen der fünf gezeigten SNP-Marker (i_SCRI_RS) wurden mit einem SNP-Chip bestimmt und teilweise mit KASP-Analysen ergänzt (vergleiche Text). Nicht für alle Genotypen konnte die Ausprägung aller Marker bestimmt werden (n: Anzahl). Gezeigt sind die Mittelwerte des Tocopherolgehalts [ng/mgFG] der Genotypen, nachdem diese entsprechend der SNP-Varianten gruppiert wurden, sowie der p-Wert eines zweiseitigen heteroskedastischen t-Tests, der die Werte beider Gruppen verglich. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Werten der Gruppen sind fett markiert. γ/α -Tph: γ/α -Tocopherol. Nicht jeder Marker konnte für alle Genotypen bestimmt werden (n). Tabelle adaptiert und erweitert aus Schuy et al. (2019).

Für den Gehalt von α -Tocotrienol wurden keine signifikanten Assoziationen zu den Ausprägungen dieser Marker gefunden. Sowohl für den Gehalt von γ -Tocotrienol als auch für den Gehalt von δ -Tocopherol wurden signifikante Assoziationen identifiziert (nicht gezeigt). Diese waren für γ -Tocotrienol, in Relation zu den in Tabelle 8 gezeigten Assoziationen, stets negativ, d.h. die SNP-Varianten, die in Tabelle 8 mit einem hohen Tocopherolgehalt assoziiert waren, standen mit einem niedrigen γ -Tocotrienolgehalt in Verbindung. Für δ -Tocopherol wurden positive und negative Assoziationen identifiziert. Beide Arten akkumulierten in den analysierten Blättern in sehr geringem Maße (Tabelle 7). Im HPLC-System fand die Detektion sogar nahe des unteren Detektionslimits statt, weshalb entschieden wurde weitere Analysen zu diesen beiden Tocochromanolarten auszusetzen. Obwohl in allen Genotypen durchschnittlich Mengen bestimmt werden konnten, die der Literatur entsprachen (siehe Abschnitt 3.1.1), wäre eine Interpretation der Unterschiede zwischen den Genotypen möglicherweise zu stark durch das Signalrauschen beeinflusst.

3.1.3. GWAS zum Tocochromanolgehalt in Blättern

Da alle Genotypen mittels eines SNP-Chips genotypisiert wurden, konnten neben den gezielten Analysen zu Marker-Assoziationen (Abschnitt 3.1.2) auch GWAS durchgeführt werden. Es wurden GWAS für die drei Tocochromanolarten α -Tocotrienol, γ - und α -Tocopherol, sowie für die Summe der beiden Tocopherole, die Summe aller drei Tocochromanole, die prozentualen Anteile von γ -Tocopherol an der Summe der Tocopherole und die prozentualen Anteile der Summe der Tocopherole an der Summe der Tocochromanole durchgeführt. Die GWAS erfolgte auf Basis von 2260 SNP-Markern, da die übrigen Marker des SNP-Chips nicht ausnahmslos in allen Genotypen bestimmt werden konnten. Insgesamt 54 signifikante Assoziationen wurden zwischen den Tocochromanoleigenschaften und den Ausprägungen von 19 SNP-Markern identifiziert (Tabelle 9). Für α -Tocopherol ist ein Manhattan-Plot repräsentativ in Abbildung 13 dargestellt. Für α -Tocotrienol und die Anteile am Gesamt-Tocochromanolgehalt konnten keine signifikanten Assoziationen identifiziert werden. Die meisten SNP-Marker waren in den Pflanzen assoziiert, die im Jahr 2017 unter gut bewässerten Bedingungen aufwuchsen. Die größte Ansammlung von assoziierten Markern fand sich auf Chromosom 7H bei 118-120 cM und umfasste drei der fünf Marker, die bereits von Templer et al. (2017) identifiziert wurden (Tabelle 8). Die zwei fehlenden, zuvor betrachteten Marker waren nicht Teil der GWAS, da sie nicht in allen Genotypen erfolgreich bestimmt werden konnten. Dafür fanden sich in dieser Genomregion insgesamt vier weitere Marker, die mit den Tocochromanolgehalt assoziiert waren.

Abbildung 13 (nächste Seite): Manhattan-Plot von Chromosom 7H der GWAS zum α -Tocopherolgehalt in Blättern von Pflanzen die im Jahr 2017 unter gut bewässerten Bedingungen wuchsen. Für jeden analysierten SNP-Marker ist der angepasste Signifikanzwert (p_{adj} , korrigiert nach Benjamini & Hochberg) der Assoziation zwischen der Ausprägung und dem Gehalt von α -Tocopherol als negativ dekadischer Logarithmus in Abhängigkeit von der Position in Centimorgan (cM) auf dem Chromosom dargestellt. Die Ausprägung von sieben SNP-Markern (siehe Tabelle 8) war signifikant ($p_{adj} < 0,05$) assoziiert. Die Positionen der Marker überlagerten sich teilweise.



	Chr.	[cM]	α -Ttr		γ -Tph		α -Tph		Ges-Tph		Ges-Tcr		γ -Tph / Ges-Tph		Ges-Tph / Ges-Tcr			
			16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17
			n	t	n	t	n	t	n	t	n	t	n	t	n	t	n	t
i 11 10996	2H	53,7																
i SCRI RS 125325	2H	54,2																
i SCRI RS 169913	2H	58,1																
i SCRI RS 161041	3H	17,5																
i 11 10914	4H	51,4																
i SCRI RS 135365	4H	57,5																
i SCRI RS 166159	4H	59,7																
i SCRI RS 197405	4H	63,4																
i SCRI RS 126397	7H	118,3																
i SCRI RS 237466	7H	118,3																
i SCRI RS 161703	7H	118,5																
i 11 21209	7H	119,8																
i SCRI RS 196031	7H	119,8																
i SCRI RS 154069	7H	120,0																
i SCRI RS 225155	7H	120,0																
i SCRI RS 126437	7H	126,3																
i SCRI RS 178933	7H	126,6																
i 11 20170	7H	140,9																
i_12_11044	7H	NaN																

Tabelle 9: Zusammenstellung aller assoziierten SNP-Marker der durchgeführten GWAS für den Tocochromanolgehalt in Blättern. Basierend auf 2260 SNP-Markern wurden GWAS für verschiedene Tocochromanoleigenschaften (α -Ttr: α -Tocotrienol; γ/α /Ges.-Tph: γ/α /Gesamt-Tocopherol, Ges-Tcr: Gesamt-Tocochromanol) durchgeführt. Die Analyse fand für beide Versuchsjahre (2016, 2017) und beide Wachstumsbedingungen (n: bewässert, t: trocken) getrennt statt. Gezeigt sind die SNP-Marker, die in mindestens einer GWAS signifikant mit einer Tocochromanoleigenschaft assoziiert waren, sortiert anhand der Position auf den Chromosomen (Chr.) in cM. Fett markierte Marker: vergleiche Tabelle 8. Markierte Zellen: signifikante Assoziation gefunden.

3.1.4. Verankerung von Strukturgenen im Gerstengenom

Sowohl für Pflanzen aus Klimakammern (Templer et al. 2017) als auch für Pflanzen, die unter nahezu Feldbedingungen im RGH wuchsen (Tabelle 9), wurde auf Chromosom 7H in der Region zwischen 118-120 cM ein QTL für den Gehalt verschiedener Tocopherolarten identifiziert. Die identifizierten Marker eignen sich demnach prinzipiell für die Verwendung in der MAS. In dieser Arbeit sollte jedoch möglichst exakt die genetische Komponente identifiziert werden, die in dieser Region den Tocochochromanolgehalt beeinflusste. Templer et al. (2017) stellten bereits die Hypothese auf, dass eine *Homogentisat-Phytyl-Transferase* (*HPT*), die in dieser Region kodiert ist, diese genetische Determinante ist.

Bevor dies genauer überprüft wurde, wurden weitere Strukturgene im Gerstengenom verankert, die direkt an der Biosynthese der Tocochochromanole beteiligt sind, oder von denen bekannt ist, dass sie substanziiell an der Bereitstellung der Edukte mitwirken (siehe Abschnitt 1.5.3). Damit sollte ausgeschlossen werden, dass weitere Gene in dieser Region einen Einfluss auf den Tocochochromanolgehalt nehmen können. Ausgangspunkt waren die Primärsequenzen von bekannten und gut annotierten Strukturgenen, primär aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Verglichen wurden auch Sequenzhomologe aus weiteren Getreidearten (Mais (*Zea mays* L.), Reis (*Oryza sativa* L.)). Die Verankerung erfolgte auf dem aktuellen Referenz-Assembly des Gerstengenoms, das auf dem Genotyp Morex basiert (MRA, Mascher et al. 2017, Beier et al. 2017), sowie auf den *whole genome shotgun sequencing contigs* (WGS_contigs) der drei Genotypen Barke, Bowman und Morex (IBGSC 2012). Frühere Kartierungsansätze waren weniger ausführlich (Graebner et al. 2015) und nutzten abweichende Rekombinationskarten (Muñoz-Amatriaín et al. 2014), die einen Positionsvergleich zu den identifizierten QTLs erschwert hätten. Insgesamt wurden 25 Gene kartiert (Abbildung 14). Auf Chromosom 7H konnte neben der *HPT* (*HPT-7H*) kein weiteres Gen gefunden werden, das einen Einfluss auf den QTL bei 118-120 cM vermuten lässt.

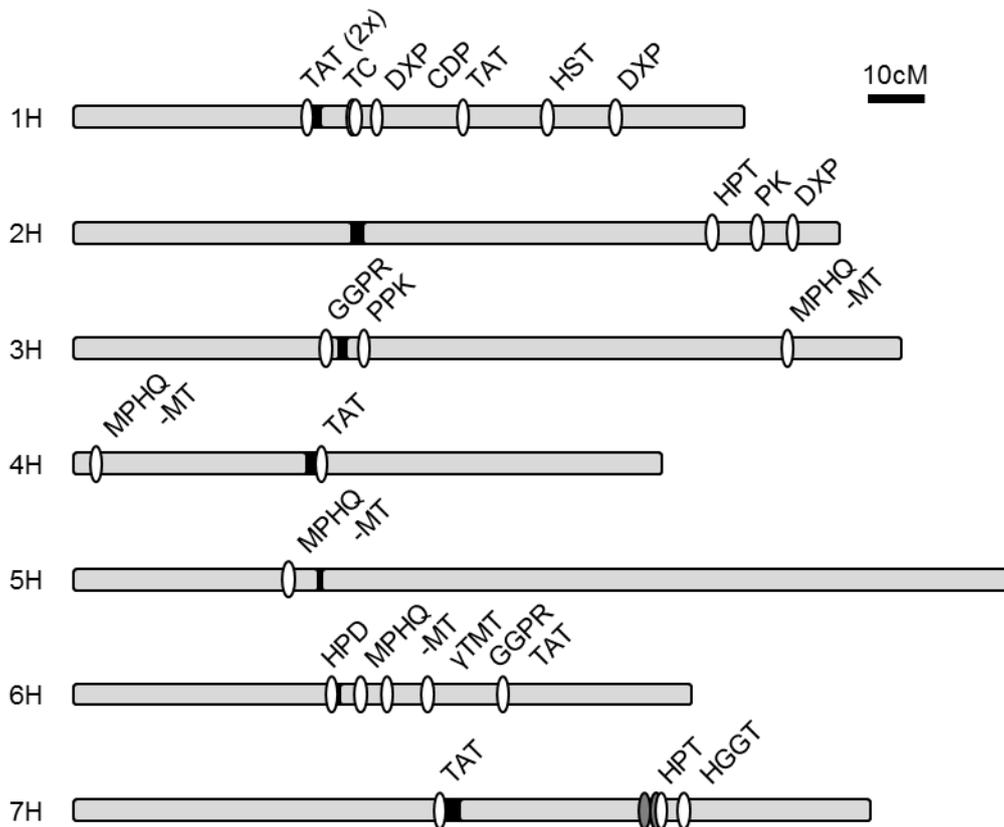


Abbildung 14: Die Gene der Tocochromanolbiosynthese auf den Gerste Chromosomen. Gezeigt sind die sieben Chromosomen des Gerstengenoms. Die Länge repräsentiert die maximale Rekombinationshäufigkeit in cM. Gezeigt sind die Positionen von 25 Genen der Tocochromanolbiosynthese (weiße Markierungen) und die der SNP-Marker die auf Chromosom 7H bei 118-120 cM einen QTL erzeugt hatten (dunkelgraue Markierungen, vergleiche Tabelle 8, Tabelle 9). γ TMT: γ -Tocopherol-Methyltransferase (*vte4*); CDP: Chlorophyll-Dephytylase; DXP: Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase; GGPR: Geranylgeranyldiphosphat-Reduktase; HGGT: Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase; HPD: 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase; HPT: Homogentisat-Phytyl-Transferase (*vte2*); HST: Homogentisat-Solanesyl-Transferase; MPHQ-MT: 2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Hydroquinon-Methyltransferase (*vte3*); PK: Phytyl-Kinase (*vte5*); PPK: Phytyl-Phosphat-Kinase (*vte6*); TAT: Tyrosin-Aminotransferase, TC: Tocopherol-Cyclase (*vte1*). Der biologische Kontext der Gene wird in Abschnitt 1.5.3 beschrieben. Weitere Details zur Kartierung in Abschnitt 2.12. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

3.1.5. Variabilität der *HPT-7H* und Verbindung zu SNP-Markern

Die Analyse der genetischen Variabilität der *HPT-7H* begann mit der Verifizierung der vorhandenen Sequenzvariationen der drei Genotypen Barke, Bowman und Morex. Basierend

auf allen vorhandenen Sequenzcontigs (WGS_contigs, MRA) die für den *HPT-7H*-Genort gefunden wurden, wurde eine Konsensussequenz erstellt, anhand derer circa 1000 bp große überlappende Fragmente abgeleitet, mittels genomischer PCR amplifiziert und anschließend über Sanger-Sequenzierung sequenziert wurden. Dadurch konnten für alle drei Genotypen erstmals lückenlose, 6500 bp lange Sequenzcontigs erstellt werden, die von circa 1200 bp *upstream* des Startcodons bis circa 600 bp *downstream* des Stoppcodons reichten. Diese Sanger_contigs bestätigten alle bekannten Sequenzvariationen der drei Genotypen. Zusätzlich erweiterten sie die Sequenzinformationen der Genotypen in den Bereichen, in denen zuvor nur für die beiden anderen Genotypen Sequenzinformationen vorlagen. Damit bestätigten sie auch die Orientierung der MRA_contigs innerhalb des MRA_Pseudomoleküls des Chromosoms 7H und bestimmten deren Abstände zueinander. Eine repräsentative Illustration dafür findet sich in Abbildung 15. Zugang zu den ermittelten Sanger_contigs findet sich in Anhang 6.2.

Basierend auf dem Tocopherolgehalt sowie der Tocopherolakkumulation unter Trockenstress wurden zwölf weitere Genotypen der Sortenkollektion ausgewählt und deren *HPT-7H*-Lokus sequenziert. In zwei Sorten (Umbrella, Eunova) die eine besonders niedrige Tocopherolakkumulation aufwiesen, wurde ein weiteres *HPT-7H*-Allel identifiziert und fortan als Umbrella-Allel bezeichnet. Die übrigen zehn Genotypen trugen die bereits bekannten Allele ohne jegliche Sequenzvariationen. Für das Umbrella-Allel konnte *upstream* des erstens Exons selbst mittels *Genome Walking* keine Sequenzinformation bestimmt werden. Das Sanger_contig dieses Allels ist dadurch nur etwa 5500 bp lang (Abbildung 15 sowie Anhang 6.2). Neben 59 SNPs oder Einzelnukleotid-Insertionen/Deletionen (Indels) im transkribierten Bereich und 55 im Promotorbereich, stellten eine 95 bp Insertion zwischen Exon 1 und 2 im Umbrella-Allel und eine 392 bp Deletion im Promotorbereich des Bowman-Allels die größten Unterschiede zwischen den vier Allelen dar (Abbildung 15). Für jedes Allel konnten mindestens zehn Nukleotide identifiziert werden, die spezifisch waren, d.h. für die in den anderen Allelen Sequenzkonsens bestand. Diese eignen sich für die Entwicklung von allelspezifischen SNP-Markern. Zur kostengünstigen Durchmusterung der übrigen Genotypen der Kollektion wurden CAPS-Marker (*cleaved amplified polymorphic sequence*) entwickelt. Die einzigartige Kombination von drei SNPs im transkribierten Bereich der vier Allele erzeugte nach Restriktionsverdau von PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen ein spezifisches Bandenmuster (Abbildung 15). Die Bandenmuster deuteten darauf hin, dass 20 Genotypen der Kollektion das Morex-Allel aufwiesen, 43 Genotypen das Barke-, vier Genotypen das Umbrella- und ein Genotyp das Bowman-Allel.

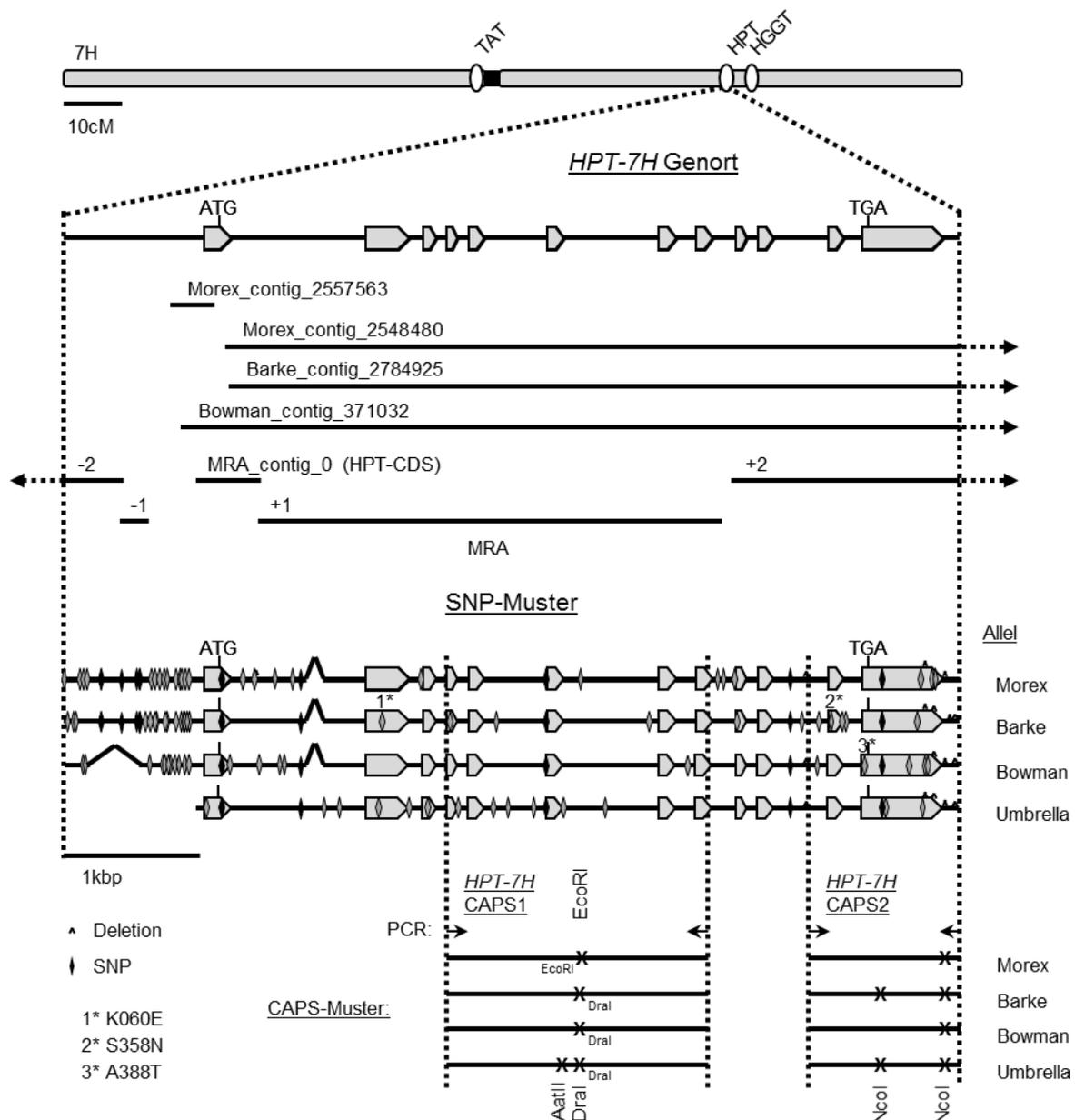


Abbildung 15: Illustration des *HPT-7H*-Genorts. Das Chromosom 7H ist wie in Abbildung 14 dargestellt. Gezeigt ist der *HPT-7H*-Genort, wie er über Sanger-Sequenzierung bestimmt wurde. Graue Balken stellen Exon-Bereiche dar. Dargestellt sind auch die Bereiche, in denen die *WGS_contigs* und die *MRA_contigs* anlagern. Für die verschiedenen Allele sind SNPs (inkl. Indels) durch Rauten (grau: allelspezifisch, schwarz: nicht allelspezifisch) und Deletionen (>1 bp) durch Zirkumflexe (^) markiert. Drei SNPs (*) verändern die vorhergesagte Primärsequenz des kodierten Proteins. Der Verdau von zwei PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen erzeugte allelspezifische Bandenmuster zur Durchmusterung weiterer Genotypen (siehe Abschnitt 2.14). Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

Anschließend wurde die Verteilung der *HPT-7H*-Allele mit den Ausprägungen der neun SNP-Marker verglichen, die die QTLs auf Chromosom 7H bei 118-120 cM erzeugt hatten (Tabelle 8 und Tabelle 9). Es zeigte sich, dass in Genotypen, die das Morex-Allel trugen, für jeden Marker vermehrt die SNP-Variation auftrat, die mit hohen Tocochromanolwerten in Verbindung stand (Tabelle 10). Das Barke-Allel fand sich vermehrt in Genotypen, die die SNP-Variante trugen, die vermehrt mit niedrigen Tocochromanolwerten in Verbindung stand. Für die beiden übrigen Allele konnte auf Grund der niedrigen Stichprobenanzahl keine Aussage getroffen werden. Exakte Tests nach Fisher bestätigten, dass die Verteilungen nicht zufällig waren (Tabelle 10).

	Fisher-Test	SNP	Σ : 68	HPT-7H Allel			
				Morex	Barke	Umbrella	Bowman
i_SCRI_RS_126397	< 0,0001	A ↑	18	13	4	1	0
	NaN=1; het=1	G ↓	48	7	37	3	1
i_SCRI_RS_237466	< 0,0001	T ↑	18	13	4	1	0
	NaN=1; het= 1	C ↓	48	7	37	3	1
i_SCRI_RS_161703	< 0,0001	C ↑	18	13	4	1	0
	NaN=1; het=2	T ↓	47	7	36	3	1
i_11_21209	< 0,0001	A ↑	18	16	2	0	0
	NaN=1; het=1	G ↓	48	4	39	4	1
i_SCRI_RS_196031	< 0,0001	G ↑	18	16	2	0	0
	NaN=1; het=1	A ↓	48	4	39	4	1
i_SCRI_RS_154069	0,0001	C ↑	28	16	11	1	0
	NaN=1; het: 0	T ↓	39	4	31	3	1
i_SCRI_RS_225155	0,0001	C ↑	28	16	11	1	0
	NaN=1; het=0	T ↓	39	4	31	3	1
I_SCRI_RS_184488	< 0,0001	T ↑	19	19	0	0	0
	NaN=1; het=0	G ↓	48	1	42	4	1
i_SCRI_RS_4520	< 0,0001	T ↑	27	13	12	1	1
	NaN=19; het=0	G ↓	22	0	19	3	0

Tabelle 10: Verteilung zwischen Ausprägungen von SNP-Markern und *HPT-7H*-Allelen. Die Verteilung der SNP-Marker aus den Tocochromanol-QTLs auf Chromosom 7H bei 118-120 cM (Tabelle 8 und Tabelle 9) wurde mit der Verteilung der *HPT-7H*-Allele verglichen, die über CAPS-Analysen bestimmt wurden (Abbildung 15). Die Verteilungen wurden mit dem exakten Test nach Fisher auf Unabhängigkeit getestet. Für jeden Marker ist die Summe der Randwahrscheinlichkeiten des Tests so gering ($p < 0,05$), dass davon ausgegangen werden kann, dass die SNP-Marker mit dem *HPT-7H*-Genort verknüpft sind. ↑/↓: SNP-Variante ist mit hohen/niedrigen Tocochromanolwerten verknüpft. NaN/het: Anzahl der Genotypen in denen der Marker nicht/heterozygot bestimmt wurde und deshalb nicht zugeordnet werden kann. Tabelle adaptiert und erweitert aus Schuy et al. (2019).

3.1.6. Zusammenhang zwischen Tocochromanolgehalt in Blättern und Variabilität der *HPT-7H*

Die Verteilung der *HPT-7H*-Allele ist mit dem Tocochromanolgehalt assoziiert. Der Gehalt von α -, γ - und Gesamt-Tocopherol sowie von Gesamt-Tocochromanol war fast unter jeder Wachstumsbedingung in den Genotypen erhöht, die das Morex-Allel trugen (Tabelle 11). Für α -Tocotrienol traf dies nicht zu. Für α -Tocopherol ist dieser Zusammenhang in Abbildung 16 dargestellt. Zwischen den Genotypen mit den anderen Allelen konnten keine Unterschiede identifiziert werden. Damit ist die *HPT-7H* wahrscheinlich, wie bereits von Templer et al. (2017) postuliert, die genetische Determinante, deren Ausprägung den Tocopherolgehalt beeinflusst.

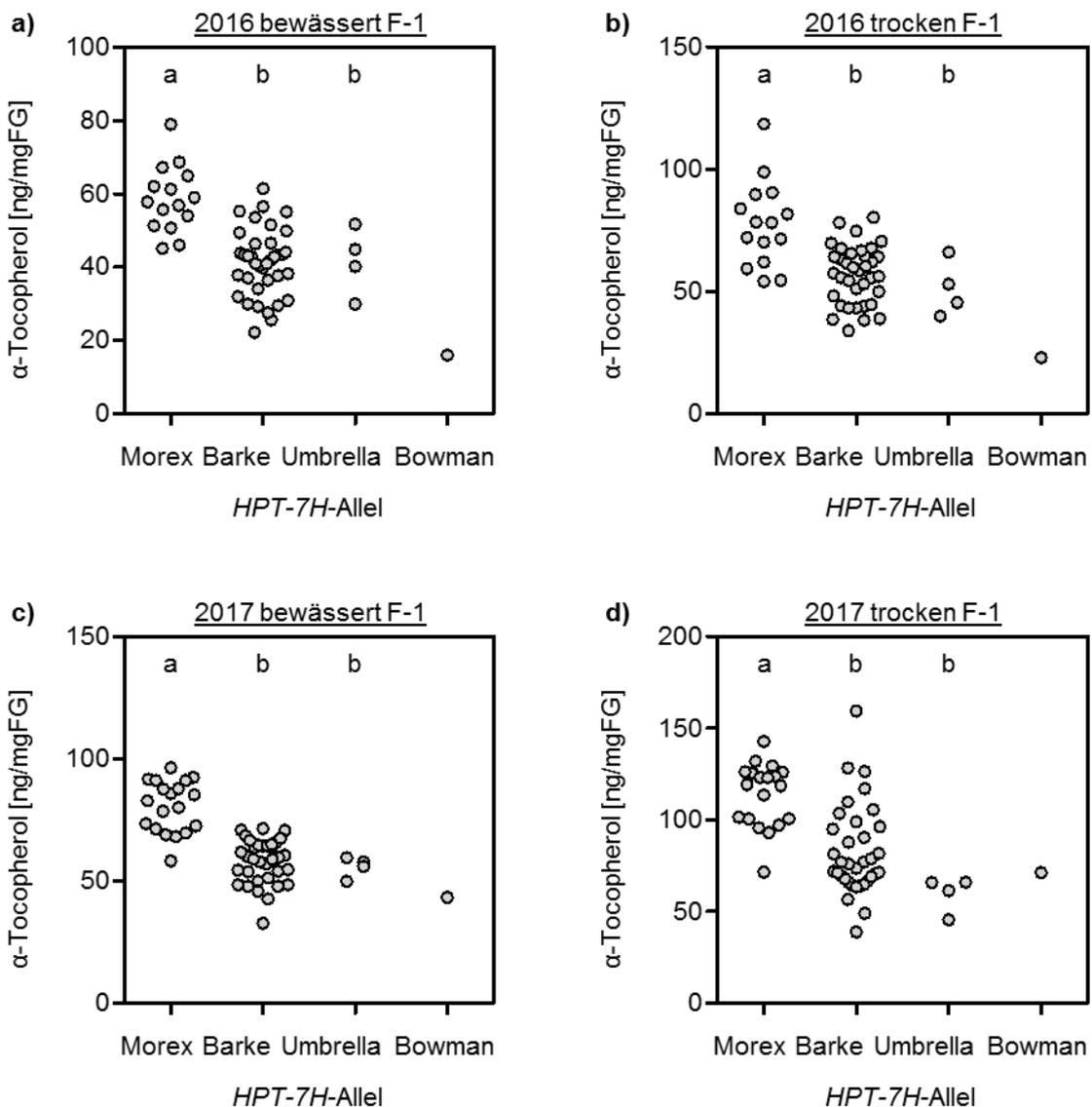


Abbildung 16 (vorherige Seite): Der α -Tocopherolgehalt von Blättern in Genotypen gruppiert nach *HPT-7H*-Allelen. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert [ng/mgFG] von vier biologischen Replikaten eines Genotyps in den verschiedenen Jahren und Wachstumsbedingungen. Die Varianzanalyse erfolgte mittels Bonferronis multiplen Vergleichstest, mit dem die Werte der verschiedenen Gruppen paarweise miteinander verglichen wurden und Alphafehlerakkumulierung berücksichtigt wurde. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Das Bowman-Allel fand sich nur in einem Genotyp, weshalb keine Varianzanalyse möglich war. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

		2016 bewässert		2016 trocken		2017 bewässert		2017 trocken	
		MW	VA	MW	VA	MW	VA	MW	VA
α -Ttr	Morex	2,89	a	4,60	a	4,49	a	6,20	a
	Barke	2,41	a	4,02	a	4,33	a	5,57	a
	Umbrella	3,19	a	5,46	a	4,94	a	6,14	a
	Bowman	2,44	NaN	1,07	NaN	4,41	NaN	5,15	NaN
γ -Tph	Morex	0,90	a	1,76	a	2,18	a	8,65	a
	Barke	0,65	b	0,91	b	1,09	b	5,43	ab
	Umbrella	0,54	ab	0,55	b	0,65	b	1,03	b
	Bowman	0,18	NaN	1,13	NaN	0,64	NaN	10,25	NaN
α -Tph	Morex	58,62	a	77,59	a	80,68	a	113,9	a
	Barke	41,19	b	57,18	b	58,24	b	82,53	b
	Umbrella	41,65	b	51,17	b	55,78	b	59,72	b
	Bowman	16,00	NaN	22,88	NaN	43,29	NaN	71,17	NaN
Ges-Tph	Morex	59,52	a	79,34	a	82,86	a	122,5	a
	Barke	41,84	b	58,09	b	59,34	b	87,96	b
	Umbrella	42,19	b	51,72	b	56,43	b	60,75	b
	Bowman	16,17	NaN	24,01	NaN	43,93	NaN	81,43	NaN
Ges-Tcr	Morex	62,42	a	83,94	a	87,35	a	128,7	a
	Barke	44,25	b	62,11	b	63,67	b	93,53	b
	Umbrella	45,38	b	57,18	b	61,37	b	66,89	b
	Bowman	18,61	NaN	25,08	NaN	48,35	NaN	86,58	NaN

Tabelle 11: Der Tocochromanolgehalt in Blättern von Genotypen gruppiert nach *HPT-7H*-Allelen. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) der Tocochromanolgehalte [ng/mgFG] der Genotypen, nachdem diese entsprechend der *HPT-7H*-Allele gruppiert wurden. Die Varianzanalyse (VA) erfolgte mittels Bonferronis multiplen Vergleichstest, mit dem die Werte aller Gruppen paarweise miteinander verglichen wurden. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Das Bowman-Allel fand sich nur in einem Genotyp, weshalb keine Varianzanalyse möglich war (NaN).

3.1.7. Einfluss der Populationsstruktur

Um auszuschließen, dass die beobachtete Verteilung der Tocochromanole nicht auf einer tiefergehenden genetischen Struktur basierte, sondern tatsächlich auf die verschiedenen Genvarianten zurückgeführt werden kann, wurde die Populationsstruktur der Genotypen bestimmt. Basierend auf SNP-Markern stellte die Populationsstrukturanalyse die Verwandtschaftsverhältnisse der Genotypen durch einen modelbasierten Ansatz dar (siehe Abschnitt 2.17). Die Zuteilungen der Populationscluster wurde für die Genotypen der beiden Versuchsjahre 2016 und 2017 getrennt abgeleitet und anschließend mit der Verteilung der Ährenarchitektur und der Verteilung der *HPT-7H*-Allele verglichen (Abbildung 17). Wie in anderen Studien bereits beobachtet (z.B. Pasam et al. 2012), wurden den sechszeiligen Genotypen große Anteile der abgeleiteten Abstammungen an einem exklusiven Populationscluster (hier: 1) zugeschrieben. Die Zuteilung der Populationscluster und der *HPT-7H*-Allele fand hingegen unabhängig voneinander statt. Damit dürfte keine tiefergehende genetische Struktur die Verteilung der Tocochromanole beeinflusst haben.

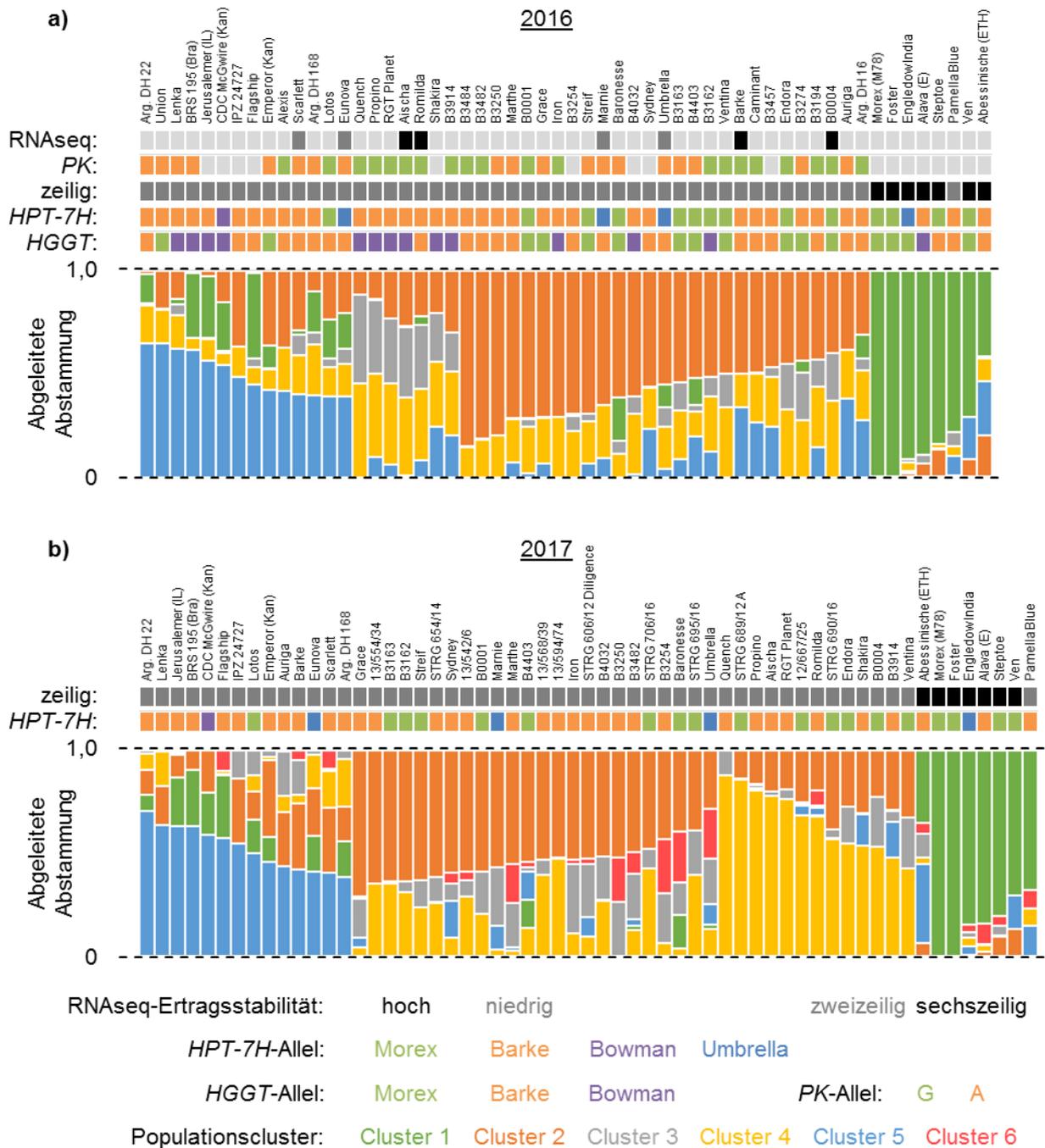


Abbildung 17: Analyse der Populationsstruktur. Basierend auf 4320 SNP-Markern wurde die Populationsstruktur der Genotypen in einem modelbasierten Ansatz abgeleitet. Die Analyse erfolgte für die Genotypen der beiden Versuchsjahre getrennt. Die Zuteilung der verschiedenen Populationscluster wurde mit der Ährenarchitektur, den *HPT-7H*-Allelen, den *HGGT*-Allelen (Abschnitt 3.1.12) und den *Pyruvat-Kinase* (*PK*)-Allelen (Abschnitt 3.2.6) verglichen. Markiert sind auch die Genotypen, die für RNAseq-Analysen ausgewählt wurden (Abschnitt 3.2ff). Abbildung adaptiert und erweitert aus Schuy et al. (2019)

3.1.8. Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf den Tocochromanolgehalt in Blättern

Unabhängig vom Versuchsjahr wurden in Pflanzen, die Trockenstress erlitten, höhere Tocochromanolgehalte gemessen (Tabelle 12). Bei einem Vergleich der Werte beider Jahre, fanden sich durchschnittlich die niedrigsten Werte im Jahr 2016 unter gut bewässerten Bedingungen, die höchsten Werte im Jahr 2017 unter Trockenstress. Die Werte aus dem Jahr 2016 unter Trockenstress waren mit den Werten aus dem Jahr 2017 unter gut bewässerten Bedingungen vergleichbar. Für α -Tocopherol ist dies auch in Abbildung 18 dargestellt.

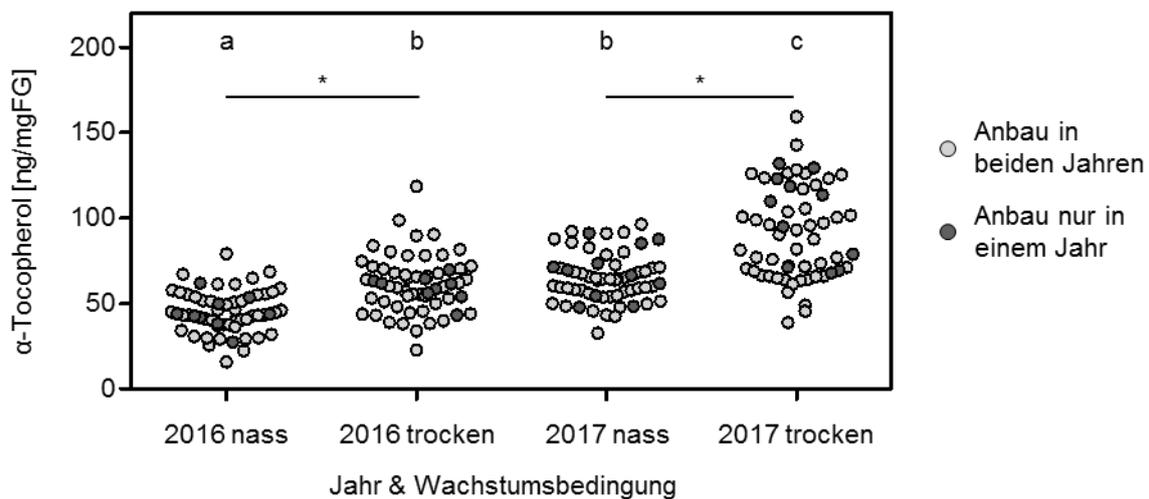


Abbildung 18: Der α -Tocopherolgehalt in Blättern unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert [ng/mgFG] von vier biologischen Replikaten eines Genotyps. Für den jahresinternen Vergleich wurden die Werte aller Genotypen mit einem zweiseitig gepaarten t-Test verglichen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Asterisk (*) markiert. Für den jahresübergreifenden Vergleich wurden nur die 48 Genotypen verglichen, die in beiden Versuchsjahren wuchsen. Die Varianzanalyse erfolgte mittels Bonferronis multiplem Vergleichstest, mit dem die Werte der verschiedenen Wachstumsbedingungen paarweise miteinander verglichen wurden. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

		Jahresinterner Vergleich		Jahresübergreifender Vergleich	
		MW	t-Tests	MW	VA
α -Ttr	2016 n	2,59	< 0,0001	2,64	a
	2016 t	4,22		4,31	b
	2017 n	4,43	< 0,0001	4,43	b
	2017 t	5,80		5,80	c
γ -Tph	2016 n	0,70	< 0,0001	0,70	a
	2016 t	1,11		1,12	a
	2017 n	1,40	< 0,0001	1,30	a
	2017 t	6,25		5,43	b
α -Tph	2016 n	45,37	< 0,0001	45,46	a
	2016 t	61,53		61,95	b
	2017 n	65,05	< 0,0001	64,17	b
	2017 t	90,88		88,61	c
Ges-Tph	2016 n	46,07	< 0,0001	46,16	a
	2016 t	62,64		63,08	b
	2017 n	66,45	< 0,0001	65,47	b
	2017 t	97,13		94,04	c
Ges-Tcr	2016 n	48,66	< 0,0001	48,81	a
	2016 t	66,86		67,39	b
	2017 n	70,88	< 0,0001	69,90	b
	2017 t	102,93		99,84	c

Tabelle 12: Der Tocochromanolgehalt in Blättern unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) der Tocochromanolgehalte [ng/mgFG] der Genotypen, nachdem diese entsprechend der Wachstumsbedingungen (n: bewässert, t: trocken) gruppiert wurden. Für den jahresinternen Vergleich sind die Werte für alle Genotypen gezeigt, die im jeweiligen Jahr wuchsen. Die Werte wurden mit einem zweiseitig gepaarten t-Test verglichen. Für den jahresübergreifenden Vergleich wurden nur die 48 Genotypen betrachtet, die in beiden Versuchsjahren wuchsen. Die Varianzanalyse (VA) erfolgte mittels Bonferronis multiplem Vergleichstest, mit dem die Werte aller Gruppen paarweise miteinander verglichen wurden. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch ungleiche Buchstaben dargestellt.

3.1.9. Expressionshöhe der *HPT-7H* in Blättern in Abhängigkeit der Allele und Einfluss auf den Tocochromanolgehalt

Unterschiede in der Genaktivität der verschiedenen Allele wurden als eine mögliche molekulare Determinante angesehen, die den Tocochromanolgehalt beeinflussen könnte. Deshalb wurde in den zwölf Genotypen, in denen die *HPT-7H*-Allele eindeutig über Sanger-Sequenzierung bestimmt wurden (siehe Abschnitt 3.1.5), die Transkriptmenge der *HPT-7H* über RT-qPCR-Analysen ermittelt. In beiden Jahren stieg in den Genotypen mit dem Morex- oder dem Barke-Allel die Transkriptmenge durch den Trockenstress signifikant, nicht aber in den Genotypen mit dem Umbrella-Allel (Abbildung 19). Darüber hinaus war im Jahr 2016

unter beiden Wachstumsbedingungen und im Jahr 2017 unter Trockenstress die Aktivität in den Genotypen mit dem Morex-Allel höher als in den übrigen Genotypen.

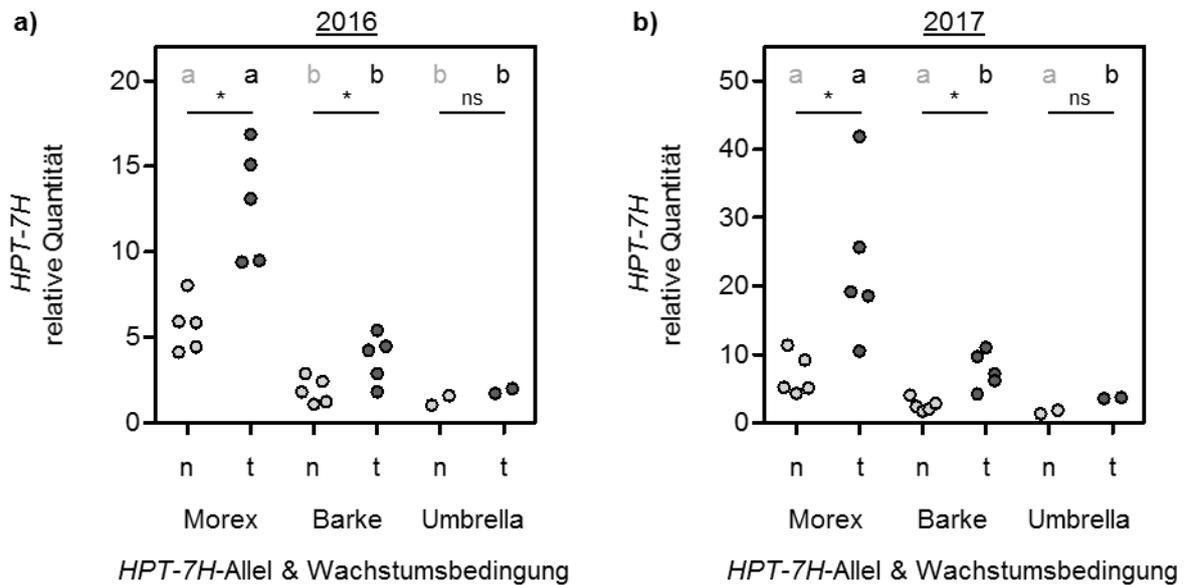


Abbildung 19: Transkriptmenge der *HPT-7H* in Blättern von Genotypen gruppiert nach Allelen und Wachstumsbedingungen. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert der relativen Transkriptmenge der *HPT-7H* von vier biologischen Replikaten eines Genotyps innerhalb einer Wachstumsbedingung (n: bewässert, t: trocken). Die Transkriptmenge wurde durch RT-qPCR-Analysen bestimmt. Der Vergleich zwischen den Wachstumsbedingungen innerhalb eines Allels erfolgte mit einem zweiseitig gepaarten t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Asterisk (*) markiert. Der Vergleich zwischen den Allelen innerhalb einer Wachstumsbedingung erfolgte über Varianzanalyse mittels Bonferronis multiplen Vergleichstest. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

Es konnten positive lineare Zusammenhänge zwischen den Transkriptmengen und dem Gehalt von α -, γ - und Gesamt-Tocopherol sowie Gesamt-Tocochromanol gefunden werden, nicht jedoch mit dem Gehalt von α -Tocotrienol (Tabelle 13). Für α -Tocopherol ist dieser Zusammenhang in Abbildung 20 dargestellt. Später (siehe Abschnitt 3.2ff) wurden in acht Genotypen RNAseq-Analysen durchgeführt. Damit wurde auch in diesen Genotypen die Transkriptmenge der *HPT-7H* bestimmt. Es konnten positive lineare Zusammenhänge zum Gehalt von α -, γ - und Gesamt-Tocopherol sowie Gesamt-Tocochromanol identifiziert werden (Tabelle 13). Für α -Tocopherol ist dieser Zusammenhang in Abbildung 21 dargestellt. Für den Gehalt von α -Tocotrienol konnte unter Trockenstress ein negativer lineare

Zusammenhang identifiziert werden, denn eine hohe *HPT-7H*-Transkriptmenge stand mit einem niedrigen α -Tocotrienolgehalt in Verbindung (Tabelle 13).

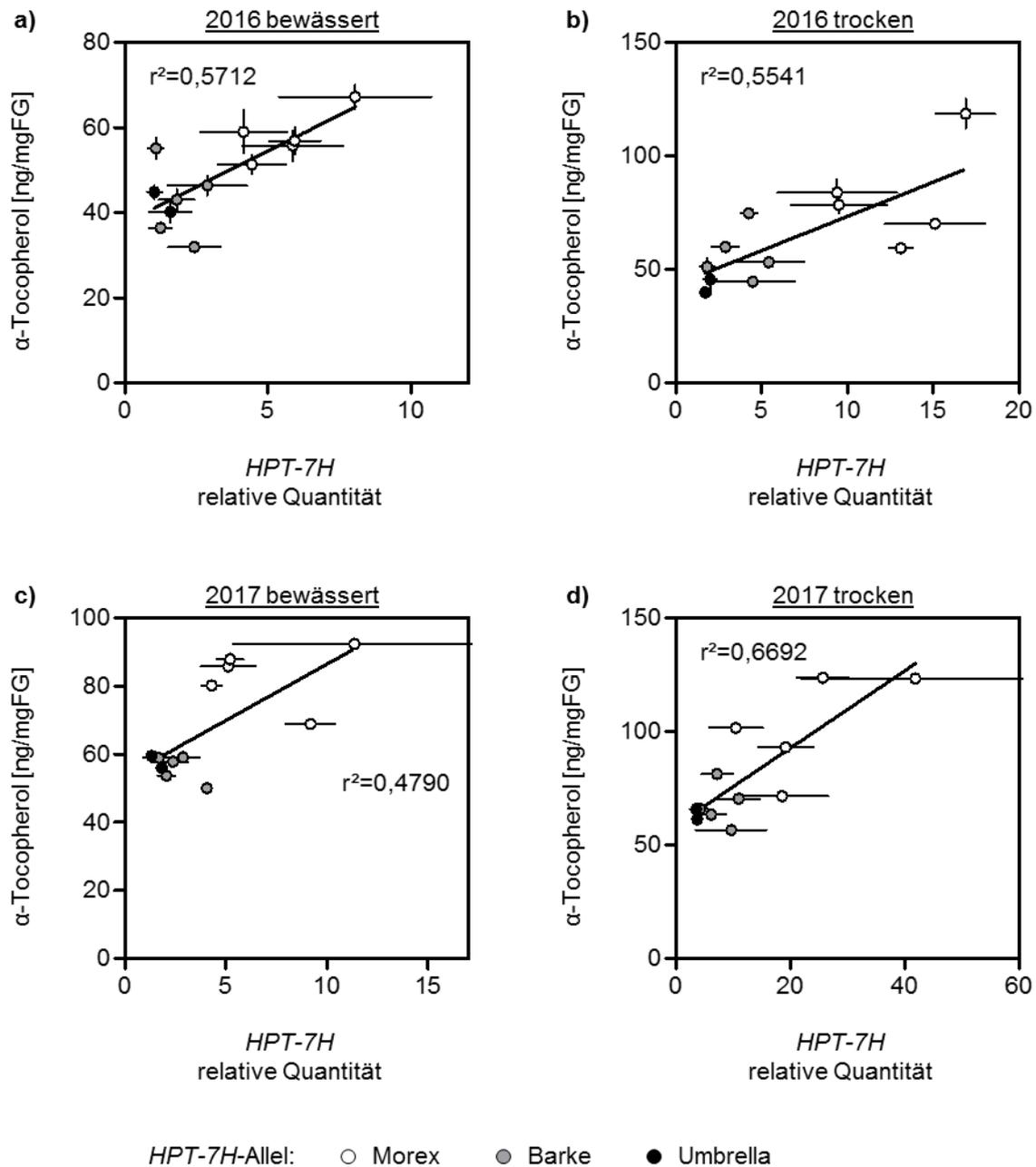


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen relativer *HPT-7H* Transkriptmenge und α -Tocopherolgehalt in Blättern. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert (plus Standardabweichung) der relativen Transkriptmenge der *HPT-7H* und dem α -Tocopherolgehalt von vier biologischen Replikaten eines Genotyps. Die Transkriptmenge wurde durch RT-qPCR-Analysen bestimmt (Abbildung 19). Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

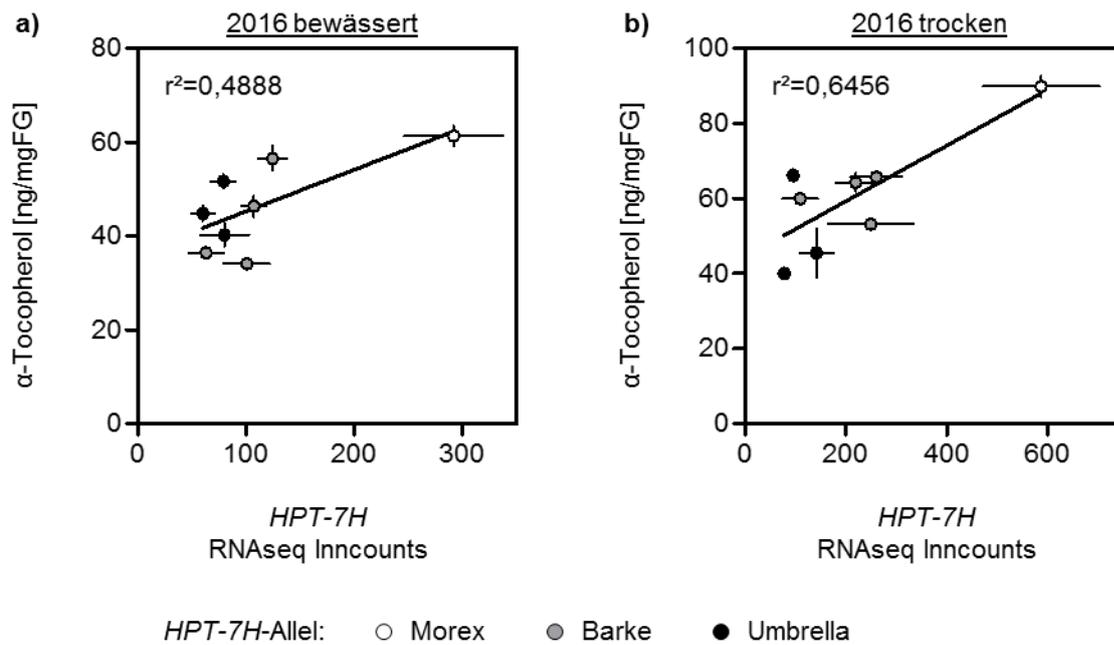


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen *HPT-7H* Transkriptmenge (*Inncounts*) und α -Tocopherolgehalt in Blättern. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert (plus Standardabweichung) der Transkriptmenge der *HPT-7H* und dem α -Tocopherolgehalt von vier biologischen Replikaten eines Genotyps. Die Transkriptmenge wurde durch RNAseq-Analysen bestimmt (Abschnitt 3.2ff).

		α -Ttr		γ -Tph		α -Tph		Ges-Tph		Ges-Tcr		
		r	r ²	r	r ²	r	r ²	r	r ²	r	r ²	
2016:	nass:	RT-qPCR:	+	0,0161	+	0,1562	+	0,5712	+	0,5773	+	0,5646
		RNAseq:	+	0,1144	+	0,6418	+	0,4888	+	0,5149	+	0,5346
	trocken:	RT-qPCR:	+	0,0519	+	0,7211	+	0,5541	+	0,5662	+	0,5492
		RNAseq:	-	0,4729	+	0,8670	+	0,6456	+	0,6768	+	0,6688
2017:	nass:	RT-qPCR:	-	0,0478	+	0,4923	+	0,4790	+	0,4842	+	0,4748
	trocken:	RT-qPCR:	-	0,0298	+	0,5753	+	0,6692	+	0,6928	+	0,6888

Tabelle 13: Lineare Korrelationen zwischen der *HPT-7H*-Transkriptmenge und dem Gehalt verschiedener Tocochromanolarten in Blättern. Für alle ermittelten linearen Zusammenhänge ist das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten (r), also die Richtung der Korrelation und das Bestimmtheitsmaß (r^2) der Korrelation gezeigt. Die *HPT-7H* Transkriptmenge wurde über RT-qPCR- (Abbildung 19) oder über RNAseq-Analysen (Abschnitt 3.2ff) ermittelt.

3.1.10. Messung des Tocochromanolgehalts in reifen Körnern

Da deutliche Zusammenhänge zwischen dem Tocochromanolgehalt und genetischen und molekularen Komponenten in Blättern identifiziert werden konnten, wurde auch der Tocochromanolgehalt von reifen Körnern untersucht. Die untersuchten Körner stammten von den Pflanzen, die im Jahr 2016 im RGH gewachsen waren. Die durchschnittlichen Werte sind mit den aus der Literatur bekannten Werten (Panfili et al. 2003; Graebner et al. 2015) vergleichbar (Tabelle 14).

	γ -Tocotrienol	α -Tocotrienol	δ -Tocopherol	γ -Tocopherol	α -Tocopherol
Mittelwert:	13,85	23,27	0,56	4,20	12,02
σ :	3,17	4,78	0,35	1,81	2,84

Tabelle 14: Tocochromanolgehalt von reifen Körnern. Von reifen Körnern von Pflanzen, die im Jahr 2016 im RGH wuchsen, wurde der Tocochromanolgehalt [ng/mgFG] bestimmt. Die Daten wurden für die verschiedenen Genotypen und Wachstumsbedingungen getrennt ausgewertet und anschließend als Mittelwerte (plus Standardabweichung (σ)) für diese Tabelle zusammengefasst. Zugang zur vollständigen Aufschlüsselung nach Genotyp und Wachstumsbedingung in Anhang 6.2.

Im Gegensatz zu Blättern (Tabelle 7) akkumulierte in reifen Körnern deutlich mehr Tocotrienol und weniger Tocopherol. Insgesamt akkumulierte sogar mehr Tocotrienol als Tocopherol. Die α -Formen machten immer noch den größten Anteil an der jeweiligen Metabolitgruppe aus, jedoch akkumulierten auch substantielle Mengen der γ -Formen. Es konnte durchschnittlich achtmal so viel δ -Tocopherol gemessen werden wie in Blättern, weshalb für die folgenden Analysen keine Tocochromanolart ausgeschlossen wurde.

3.1.11. GWAS zum Tocochromanolgehalt in reifen Körnern

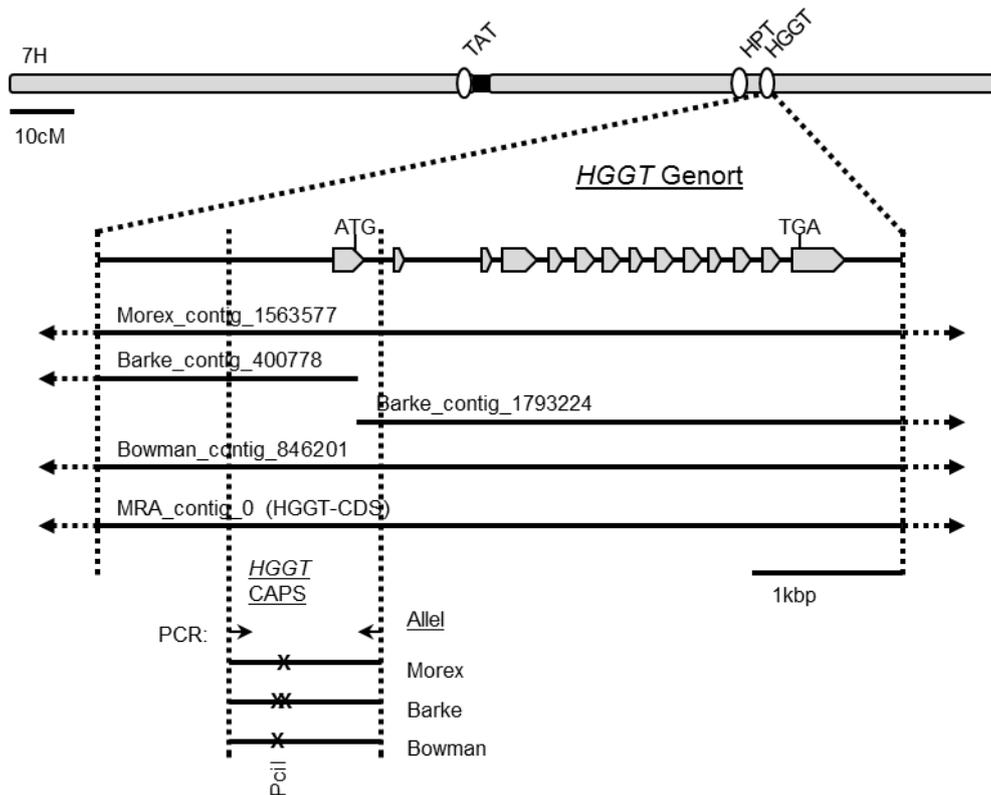
Für den Tocochromanolgehalt von reifen Körnern wurden GWAS durchgeführt. Analysiert wurde der Gehalt der fünf Tocochromanolarten individuell, die Summe der beiden Tocotrienolarten, die der drei Tocopherolarten und die Summe aller fünf Tocochromanolarten. Analysiert wurden außerdem die prozentualen Anteile der einzelnen Tocotrienolarten an der Summe der Tocotrienole, die Anteile der Tocopherolarten am Gesamt-Tocopherolgehalt und der Anteil des Gesamt-Tocopherols am Gesamt-Tocochromanol. Insgesamt wurden zehn SNP-Marker (i_SCRI_RS_162504,

i_SCRI_RS_153797, i_SCRI_RS_144579, i_SCRI_RS_229687, i_SCRI_RS_161533, i_12_30749, i_SCRI_RS_144162, i_SCRI_RS_148652, i_12_30765 und i_SCRI_RS_126229) identifiziert, die in Körnern, die unter Trockenstress gebildet wurden, mit dem prozentualen Anteil von γ -Tocotrienol am Gesamt-Tocotrienolgehalt assoziiert waren. Die Marker wurden auf Chromosom 6H zwischen 53,9-55,0 cM verankert und befinden sich somit in der Nähe der *HPD* und einer *MPHQ-MT* (Abbildung 14).

3.1.12. Variabilität der *HGGT* und Verbindung zur *HPT-7H*

Neben den Analysen zur Variabilität der *HPT-7H* (Abschnitt 3.1.5) wurde auch die Variabilität der *HGGT* betrachtet. Die *HGGT* ist das Enzym, das die Tocotrienol- von der Tocopherolbiosynthese unterscheidet (Cahoon et al. 2003). Im Korn akkumulierte mehr Tocotrienol als Tocopherol (Tabelle 14) und Graebner et al. (2015) hatten in der Genomregion, in der die *HPT-7H* und *HGGT* liegen, in reifen Körnern QTLs für den Gehalt aller vier Tocotrienolarten, für den Gehalt von δ - und γ -Tocopherol und für den Gehalt von Gesamt-Tocotrienol und -tocochromanol identifiziert. Die WGS_contigs der drei Genotypen Morex, Barke und Bowman legten nahe, dass die höchste Variabilität im *HGGT*-Genort in der Region des Kernpromotors bis 1000 bp *upstream* des Startcodons auftritt. Dies wurde über Sanger-Sequenzierungen in den zwölf Genotypen bestätigt, die bereits für die Sequenzierung der *HPT-7H* ausgewählt wurden. Für die *HGGT* wurde dadurch kein weiteres Allel identifiziert, jedoch konnte ein CAPS-Marker erstellt werden, der zur Durchmusterung weiterer Genotypen der Kollektion eingesetzt wurde (Abbildung 22).

Abbildung 22 (nächste Seite): Illustration des *HGGT*-Genorts. Das Chromosom 7H ist wie in Abbildung 14 dargestellt. Gezeigt ist der *HGGT*-Genort, wie er über die vorhandenen WGS- und MRA_contigs bestimmt wurde. Graue Balken stellen Exon-Bereiche dar. Der Verdau eines PCR-Produkts, dessen Sequenz zuvor über Sanger-Sequenzierung validiert wurde, erzeugte allelspezifische Bandenmuster (CAPS-Marker, siehe Abschnitt 2.14) zur Durchmusterung weiterer Genotypen. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).



In 16 Genotypen wurde das Morex-Allel identifiziert, in 15 das Bowman- und in 26 das Barke-Allel. Das Morex-*HGGT*-Allel fand sich dabei überwiegend in Genotypen, in denen das Morex-*HPT-7H*-Allel auftrat. Das Barke- und das Bowman-*HGGT*-Allel fanden sich überwiegend in Genotypen, in denen das Barke-*HPT-7H*-Allel auftrat. Die Verteilung war laut einem exakten Test nach Fisher nicht zufällig ($p=6,28 \cdot 10^{-5}$) (Tabelle 15). Die Verteilung der *HGGT*-Allele stand jedoch in keinem erkennbaren Zusammenhang zur Zuteilung der Populationscluster (Abbildung 17).

		Σ : 57	<i>HPT-7H</i> -Allel			
			Morex	Barke	Bowman	Umbrella
<i>HGGT</i> -Allel	Morex	16	11	4	0	1
	Bowman	15	1	13	1	0
	Barke	26	3	20	0	3

Tabelle 15: Verteilung zwischen *HGGT*-Allelen und *HPT-7H*-Allelen. Die Verteilung der *HGGT*-Allele, die über CAPS-Analysen bestimmt wurden (Abbildung 22), wurde mit der Verteilung der *HPT-7H*-Allele verglichen. Die *HGGT*-Allele wurden nur in den 57 Genotypen bestimmt, die im Jahr 2016 wuchsen.

3.1.13. Zusammenhang zwischen dem Tocochromanolgehalt in reifen Körnern und der Variabilität der *HGGT* und *HPT-7H*

Wurden die Tocochromanolgehalte der Körner nach *HGGT*-Allelen gruppiert, konnten nur Unterschiede im Gehalt von γ -, α - und Gesamt-Tocotrienol identifiziert werden (Tabelle 16). Im Detail traten in Genotypen mit dem Morex-*HGGT*-Allel höhere Werte auf als in Genotypen mit dem Barke-*HGGT*-Allel, jedoch nur in Körnern, die unter gut bewässerten Bedingungen gebildet wurden. Für Gesamt-Tocotrienol ist dieser Zusammenhang in Abbildung 23 dargestellt. Für die Tocopherole wurden keine Unterschiede gefunden, nachdem die Genotypen auf Basis der *HGGT*-Allele gruppiert worden waren. Wurden die Genotypen auf Basis der *HPT-7H*-Allele gruppiert, konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden, weder für Tocotrienole noch für Tocopherole (Tabelle 17).

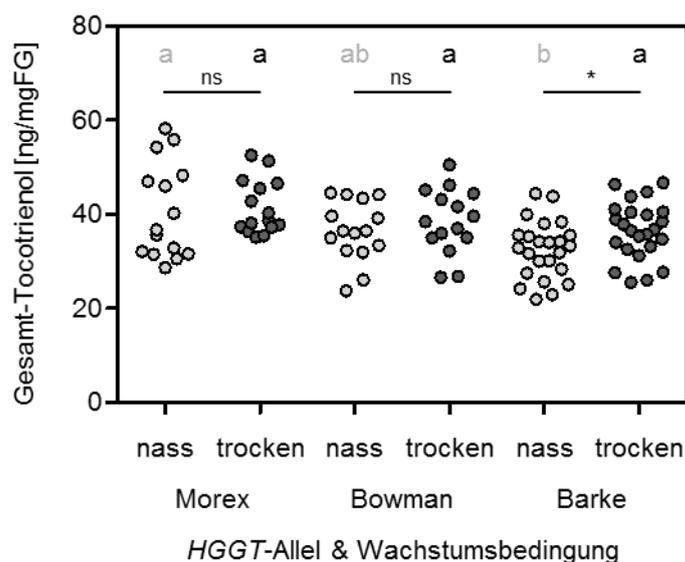


Abbildung 23: Der Gesamt-Tocotrienolgehalt in reifen Körnern von Genotypen gruppiert nach *HGGT*-Allelen. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert [ng/mgFG] von allen biologischen Replikaten eines Genotyps innerhalb einer Wachstumsbedingung (n: bewässert, t: trocken). Der Vergleich zwischen den Wachstumsbedingungen innerhalb eines Allels erfolgte mit einem zweiseitig gepaarten t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Asterisk (*) markiert. Der Vergleich zwischen den Allelen innerhalb einer Wachstumsbedingung erfolgte über Varianzanalyse mittels Bonferronis multiplem Vergleichstest. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

	HGGT-Allel	bewässert		t-Test	trocken	
		MW	VA		MW	VA
γ-Ttr	Morex	15,22	a	0,1510	16,07	a
	Bowman	13,05	ab	0,0220	14,44	a
	Barke	11,71	b	< 0,0001	13,89	a
α-Ttr	Morex	25,40	a	0,9828	25,42	a
	Bowman	23,38	ab	0,4174	24,06	a
	Barke	20,74	b	0,0026	22,61	a
Ges-Ttr	Morex	40,62	a	0,5635	41,49	a
	Bowman	36,42	ab	0,1350	38,50	a
	Barke	32,45	b	< 0,0001	36,50	a
δ-Tph	Morex	0,41	a	0,0022	0,70	a
	Bowman	0,37	a	0,0001	0,57	a
	Barke	0,41	a	< 0,0001	0,82	a
γ-Tph	Morex	3,76	a	0,0005	4,56	a
	Bowman	3,57	a	0,0032	4,06	a
	Barke	3,76	a	< 0,0001	5,14	a
α-Tph	Morex	11,85	a	0,0747	10,85	a
	Bowman	13,67	a	0,0221	12,00	a
	Barke	11,85	a	0,7598	12,01	a
Ges-Tph	Morex	16,01	a	0,8565	16,11	a
	Bowman	17,61	a	0,2036	16,63	a
	Barke	16,02	a	0,0011	17,96	a
Ges-Tcr	Morex	56,63	a	0,6316	57,60	a
	Bowman	54,04	a	0,5719	55,13	a
	Barke	48,47	a	< 0,0001	54,46	a

Tabelle 16: Der Tocochromanolgehalt von reifen Körnern von Genotypen gruppiert nach *HGGT-Allelen*. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) der Tocochromanolgehalte [ng/mgFG] der Genotypen, nachdem diese entsprechend der *HGGT-Allele* gruppiert wurden. Die Varianzanalyse (VA) erfolgte mittels Bonferronis multiplern Vergleichstest. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Die Werte zwischen den Wachstumsbedingungen wurden mit einem zweiseitig gepaarten t-Test verglichen.

	HPT-7H-Allel	bewässert		t-Test	trocken	
		MW	VA		MW	VA
γ-Ttr	Morex	14,56	a	0,0792	15,59	a
	Barke	12,56	a	< 0,0001	14,25	a
	Umbrella	11,87	a	0,0372	14,31	a
	Bowman	14,08	NaN	NaN	16,37	NaN
α-Ttr	Morex	24,46	a	0,6634	24,79	a
	Barke	22,41	a	0,0808	23,39	a
	Umbrella	20,10	a	0,1694	22,94	a
	Bowman	22,38	NaN	NaN	26,71	NaN
Ges-Ttr	Morex	39,02	a	0,2829	40,38	a
	Barke	34,97	a	0,0024	37,64	a
	Umbrella	31,97	a	0,0834	37,25	a
	Bowman	36,46	NaN	NaN	43,08	NaN
δ-Tph	Morex	0,45	a	0,0006	0,91	a
	Barke	0,40	a	< 0,0001	0,67	a
	Umbrella	0,28	a	0,1551	0,52	a
	Bowman	0,26	NaN	NaN	0,50	NaN
γ-Tph	Morex	4,27	a	0,0009	5,51	a
	Barke	3,58	a	< 0,0001	4,44	a
	Umbrella	3,11	a	0,1866	4,30	a
	Bowman	2,76	NaN	NaN	3,65	NaN
α-Tph	Morex	12,35	a	0,0136	11,08	a
	Barke	12,40	a	0,0910	11,79	a
	Umbrella	12,56	a	0,8629	12,72	a
	Bowman	10,02	NaN	NaN	12,51	NaN
Ges-Tph	Morex	17,06	a	0,5042	17,50	a
	Barke	16,37	a	0,3440	16,90	a
	Umbrella	15,95	a	0,3523	17,54	a
	Bowman	13,04	NaN	NaN	16,67	NaN
Ges-Tcr	Morex	56,08	a	0,3292	57,88	a
	Barke	51,34	a	0,0111	54,54	a
	Umbrella	47,93	a	0,1393	54,79	a
	Bowman	49,50	NaN	NaN	59,75	NaN

Tabelle 17: Der Tocochromanolgehalt von reifen Körnern in Genotypen gruppiert nach *HPT-7H-Allelen*. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) der Tocochromanolgehalte [ng/mgFG] der Genotypen, nachdem diese entsprechend der *HPT-7H-Allele* gruppiert wurden. Die Varianzanalyse (VA) erfolgte mittels Bonferronis multiplen Vergleichstest. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden durch ungleiche Buchstaben dargestellt. Die Werte zwischen den Wachstumsbedingungen wurden mit einem zweiseitig gepaarten t-Test verglichen. Das Bowman-Allel fand sich nur in einem Genotyp, weshalb keine statistische Analyse möglich war (NaN).

3.1.14. Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf den Tocochromanolgehalt in reifen Körnern

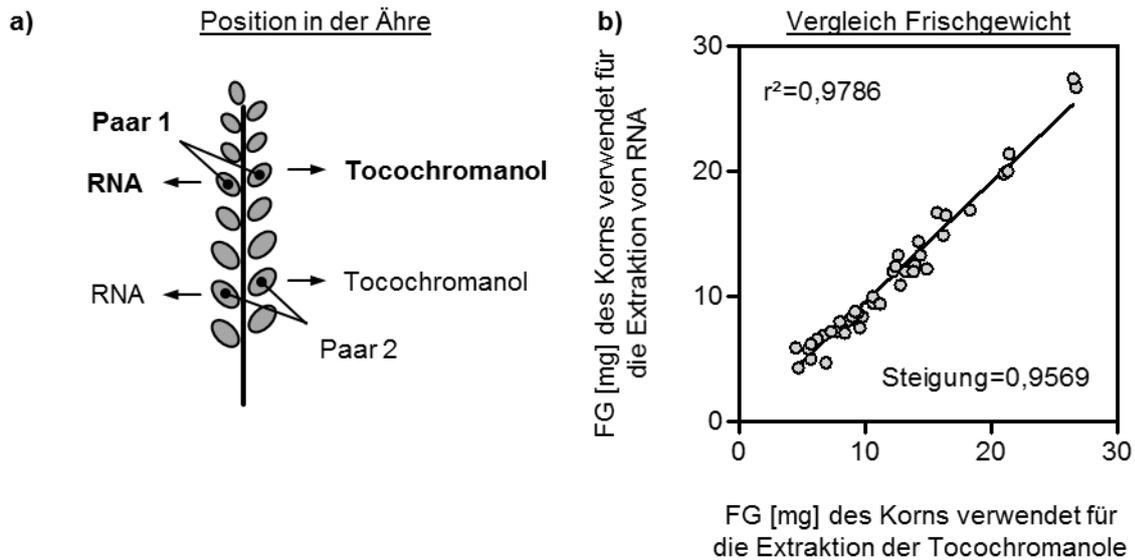
Ebenso wie im Blatt (Tabelle 12), verursachte der Trockenstress auch in reifen Körnern einen Anstieg des Tocochromanolgehalts. Dabei stieg der Gehalt von γ -, α - und Gesamt-Tocotrienol nur in Körnern von Genotypen, die das Barke- oder teilweise das Bowman-*HGGT*-Allel hatten, nicht jedoch in Körnern von Genotypen, die das Morex-*HGGT*-Allel

hatten (Tabelle 16). Der Gehalt von δ -, γ - und α -Tocopherol stieg nur in Körnern von Genotypen, die das Morex- und teilweise das Barke-*HPT-7H*-Allel hatten, nicht jedoch in Körnern von Genotypen, die das Umbrella-*HPT-7H*-Allel hatten (Tabelle 17).

3.1.15. Messung des Tocochromanolgehalts und der Expressionshöhe der *HPT-7H* und *HGGT* in unreifen Körnern

Um weitere Aspekte der Tocochromanolakkumulation in Körnern zu entschlüsseln, sollten unreife, sich entwickelnde Körner (frühe Milchreife bis frühe Teigreife, BBCH-Skala für Getreide Stadium 73 bis 83) analysiert werden. Wie im Blatt (Abschnitt 3.1.9), sollten die Tocochromanolwerte mit Expressionshöhen von Biosynthesegenen verglichen werden. Jedes individuelle Korn konnte nur für die Messung der Tocochromanole oder für die Extraktion von RNA verwendet werden. Deshalb wurden Kornpaare gebildet. Aus einem Korn wurde RNA extrahiert, für das andere der Tocochromanolgehalt bestimmt. Um die Vergleichbarkeit beider Parameter zu gewährleisten, wurden je Paar Körner gewählt, die innerhalb der Ähre in Nachbarschaft gewachsen waren (Abbildung 24a) und ein vergleichbares Frischgewicht aufgewiesen hatten (Abbildung 24b). Das Frischgewicht repräsentiert auch das Entwicklungsstadium der Körner. Für zehn Genotypen wurden je Wachstumsbedingungen jeweils zwei Kornpaare analysiert, also insgesamt 40 Kornpaare. Da die Entwicklung der Körner im RGH nicht künstlich synchronisiert wurde, wurden Körner in verschiedensten Entwicklungsstadien analysiert (Abbildung 24b). Deshalb wurden die Tocochromanolwerte stets unter zwei Aspekten betrachtet. Einmal als Gesamtmasse pro Korn ([ng/Korn], Tabelle 18) und einmal wie in Blättern und reifen Körnern als Massenanteil am Frischgewicht ([ng/mgFG], Tabelle 19). Da sich der Gehalt von δ -Tocopherol in den folgenden Analysen vergleichbar wie der Gehalt von γ -Tocopherol verhielt, wurde er nicht weiter aufgeführt.

Abbildung 24 (nächste Seite): Analyisierte Paare unreifer Körner. Jedes individuelle Korn konnte nur für die Analyse der Tocochromanole oder für die Extraktion von RNA verwendet werden. Damit die Werte miteinander verglichen werden können, wurden Kornpaare analysiert. **a)** Die Körner eines Paares wuchsen in der Ähre in Nachbarschaft und **b)** wiesen ein vergleichbares Frischgewicht (FG) und somit Entwicklungsstadium auf. Gezeigt sind die Frischgewichte aller analysierten Kornpaare. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).



	γ -Tocotrienol	α -Tocotrienol	δ -Tocopherol	γ -Tocopherol	α -Tocopherol
Mittelwert:	4,65	12,83	0,05	2,90	37,85
σ :	2,22	15,65	0,05	3,14	9,90

Tabelle 18: Tocochromanolgehalt (Gesamtmasse pro Korn) von unreifen Körnern. Von unreifen Körnern von Pflanzen, die im Jahr 2017 im RGH wuchsen, wurde der Tocochromanolgehalt [ng/Korn] bestimmt. Die Daten wurden für die einzelnen Körner getrennt ausgewertet und anschließend als Mittelwerte (plus Standardabweichung (σ)) für diese Tabelle zusammengefasst. Zugang zur vollständigen Aufschlüsselung findet sich in Anhang 6.2.

	γ -Tocotrienol	α -Tocotrienol	δ -Tocopherol	γ -Tocopherol	α -Tocopherol
Mittelwert:	0,41	0,80	0,01	0,40	3,85
σ :	0,21	0,68	0,01	0,54	2,10

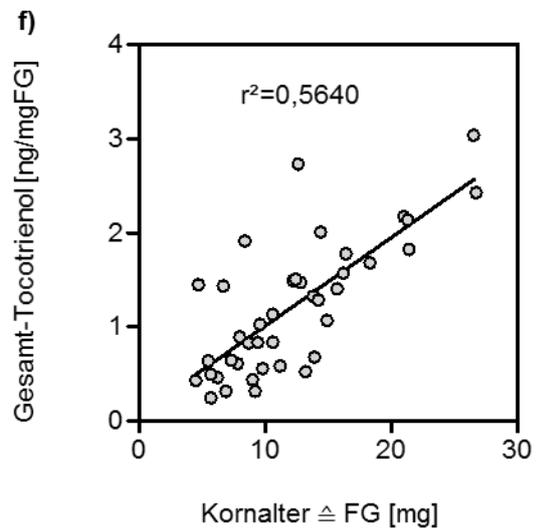
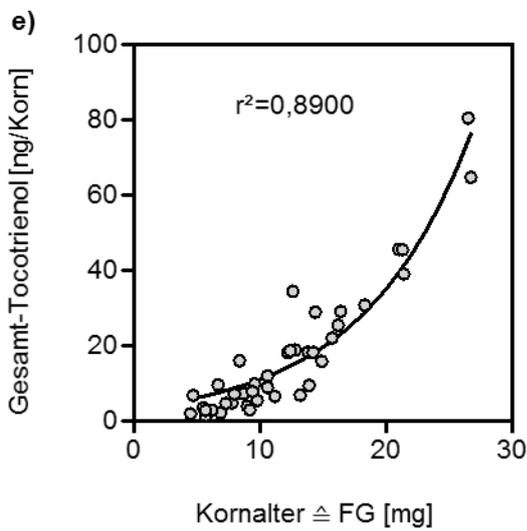
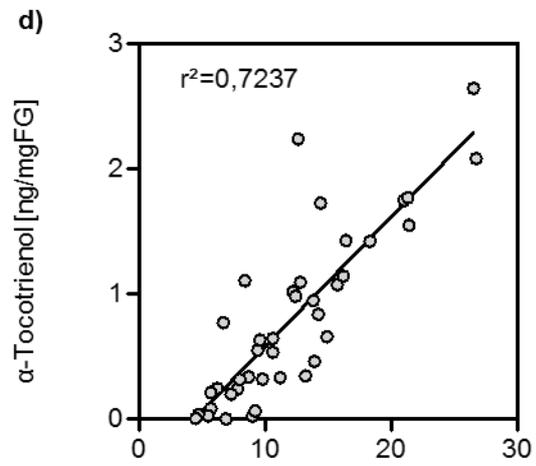
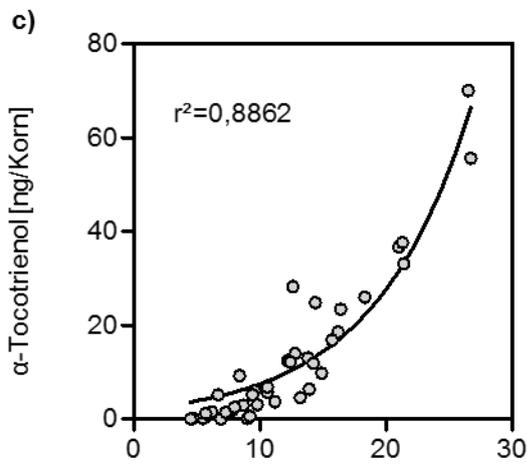
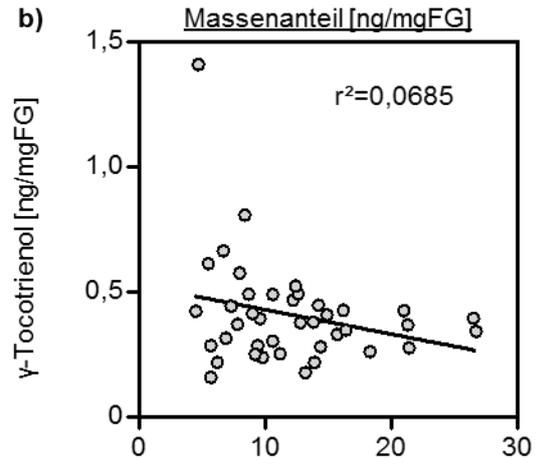
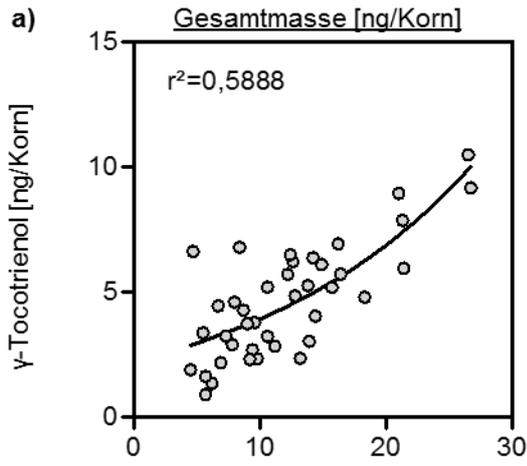
Tabelle 19: Tocochromanolgehalt (Massenanteil am Frischgewicht) von unreifen Körnern. Von unreifen Körnern von Pflanzen, die im Jahr 2017 im RGH wuchsen, wurde der Tocochromanolgehalt [ng/mgFG] bestimmt. Die Daten wurden für die einzelnen Körner getrennt ausgewertet und anschließend als Mittelwerte (plus Standardabweichung (σ)) für diese Tabelle zusammengefasst. Zugang zur vollständigen Aufschlüsselung findet sich in Anhang 6.2.

3.1.16. Verlauf des Tocochromanolgehalts in unreifen Körnern

Es konnte weder ein Zusammenhang zwischen den Tocochromanolwerten und den verschiedenen Genvarianten der *HPT-7H* und *HGGT*, noch ein Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen identifiziert werden. Die Tocochromanolwerte standen jedoch teilweise in direktem Zusammenhang mit dem Alter der Körner und wurden deshalb fortan unabhängig von der Zugehörigkeit der Genotypen und der Wachstumsbedingungen betrachtet. Die Gesamtmasse [ng/Korn] von α -, γ - und Gesamt-Tocotrienol nahm mit steigendem Kornalter exponentiell zu (Abbildung 25a,c,e). Der Massenanteil [ng/mgFG] von γ -Tocotrienol blieb in den hier betrachteten Entwicklungsstadien konstant (Abbildung 25b), der von α - und damit auch der von Gesamt-Tocotrienol stieg linear (Abbildung 25d,f). Von γ -Tocopherol sank die Gesamtmasse mit steigendem Kornalter exponentiell (Abbildung 26a), die von α - und Gesamt-Tocopherol veränderte sich in den hier betrachteten Entwicklungsstadien nicht (Abbildung 26c,e). Die Massenanteile von γ -, α - und Gesamt-Tocopherol sanken mit zunehmendem Alter der Körner exponentiell (Abbildung 26b,d,f).

Die Betrachtung der prozentualen Verteilungen der einzelnen Tocochromanolarten und der Gruppen verriet, dass in jüngeren Körnern mehr γ - als α -Tocotrienol detektiert wurde, sich das Verhältnis aber verschob (Abbildung 27a). Es wurde nie mehr γ - als α -Tocopherol detektiert, jedoch verschob sich auch hier die Verteilung zunehmend zu Gunsten von α -Tocopherol (Abbildung 27b). Mit zunehmendem Alter akkumulierten darüber hinaus insgesamt mehr Tocotrienole als Tocopherole (Abbildung 27c).

Abbildung 25 (nächste Seite): Verlauf des Tocotrienolgehalts in unreifen Körnern. Jeder Datenpunkt zeigt den Tocochromanolgehalt eines einzigen Kornes. Gezeigt sind die Gesamtmassen pro Korn (links) und die Massenanteile am Frischgewicht (FG) (rechts) der angegebenen Tocochromanolarten oder -gruppen, stets in Relation zum individuellen Frischgewicht der Körner. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).



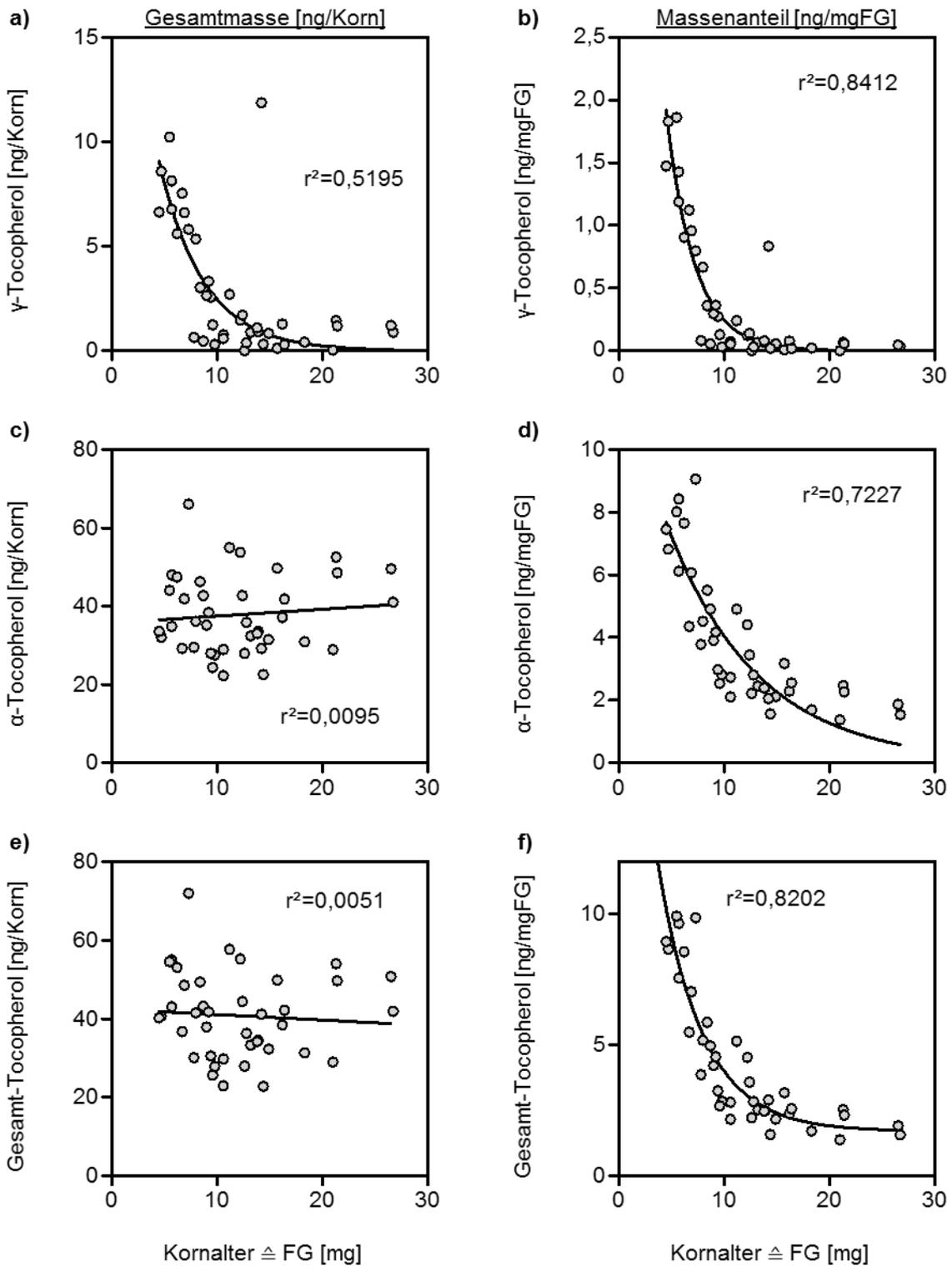


Abbildung 26: Verlauf des Tocopherolgehalts in unreifen Körnern. Weiteres siehe Abbildung 25.

Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

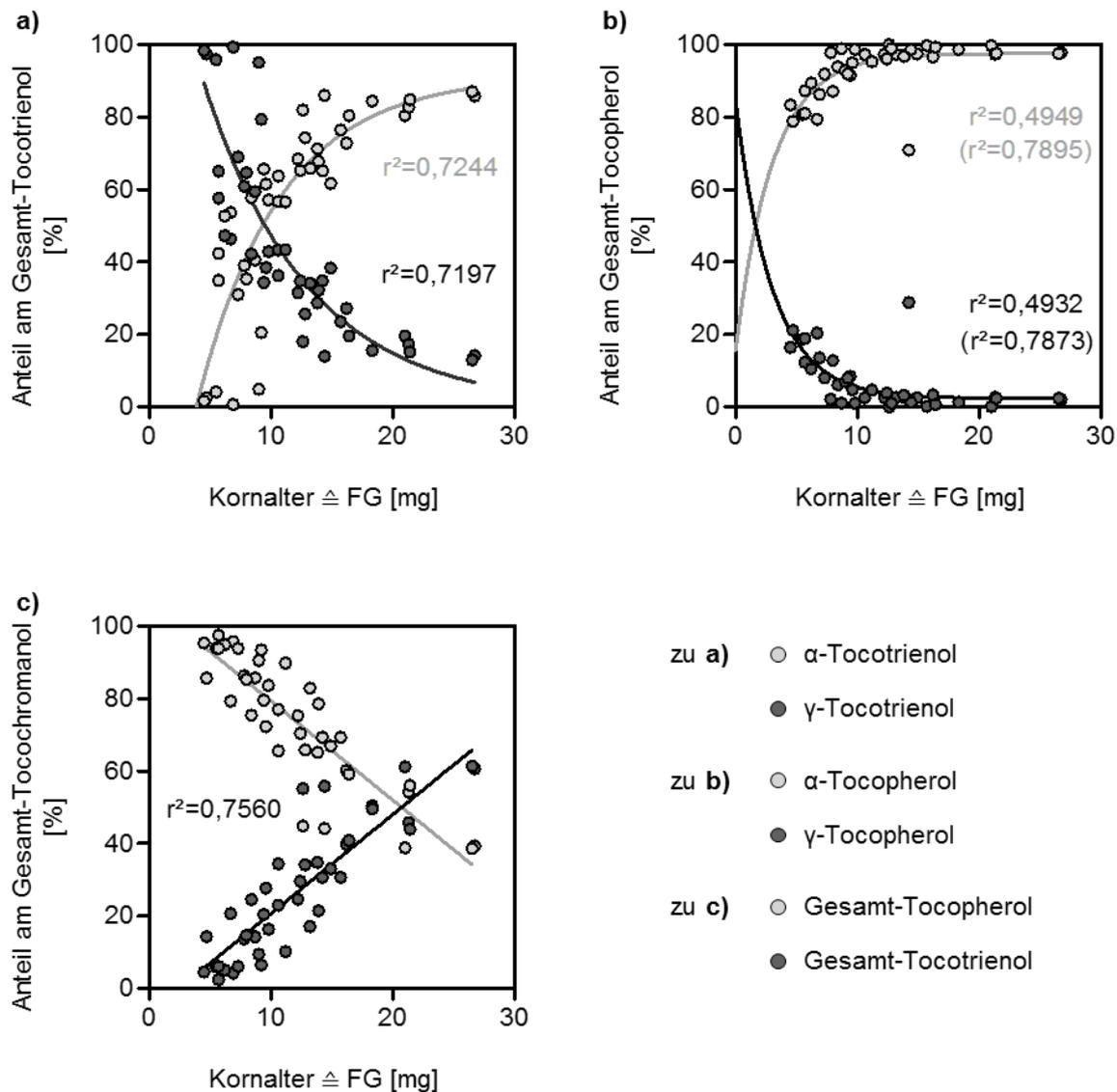


Abbildung 27: Verlauf der Tocochromanolanteile in unreifen Körnern. Jeder Datenpunkt zeigt den Tocochromanolgehalt eines einzigen Korns. Gezeigt sind die prozentualen Anteile verschiedener Tocochromanolarten an Tocochromanolgruppen wie angegeben, stets in Relation zum individuellen Frischgewicht der Körner. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

3.1.17. Verlauf der Expressionshöhen von *HPT-7H* und *HGGT* in unreifen Körnern und Einfluss auf den Tocochromanolgehalt

Auch die Transkriptmengen der *HPT-7H* und *HGGT* konnten weder mit den Genvarianten noch mit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in Verbindung gebracht werden. In älteren Körnern wurden jedoch schwach erhöhte Transkriptmengen der *HGGT* detektiert (Abbildung 28a). Wurde die Transkriptmenge der *HPT-7H* mit dem Kornalter verrechnet,

wurde eine exponentielle Abnahme in älteren Körnern verzeichnet (Abbildung 28d). Wurden die Expressionswerte mit den Tocochromanolwerten verglichen, konnte nur ein schwacher linearer Zusammenhang zwischen der Gesamtmenge der *HGGT* und der Gesamtmasse der Tocotrienole (Abbildung 29a), sowie ein Zusammenhang zwischen den Massenanteilen der Tocopherole und den Transkriptmengen der *HPT-7H* gefunden werden, die mit dem Kornalter der Körnern verrechnet wurden (Abbildung 29d). Zu den einzelnen Tocochromanolarten ergaben sich vergleichbare Zusammenhänge (nicht gezeigt).

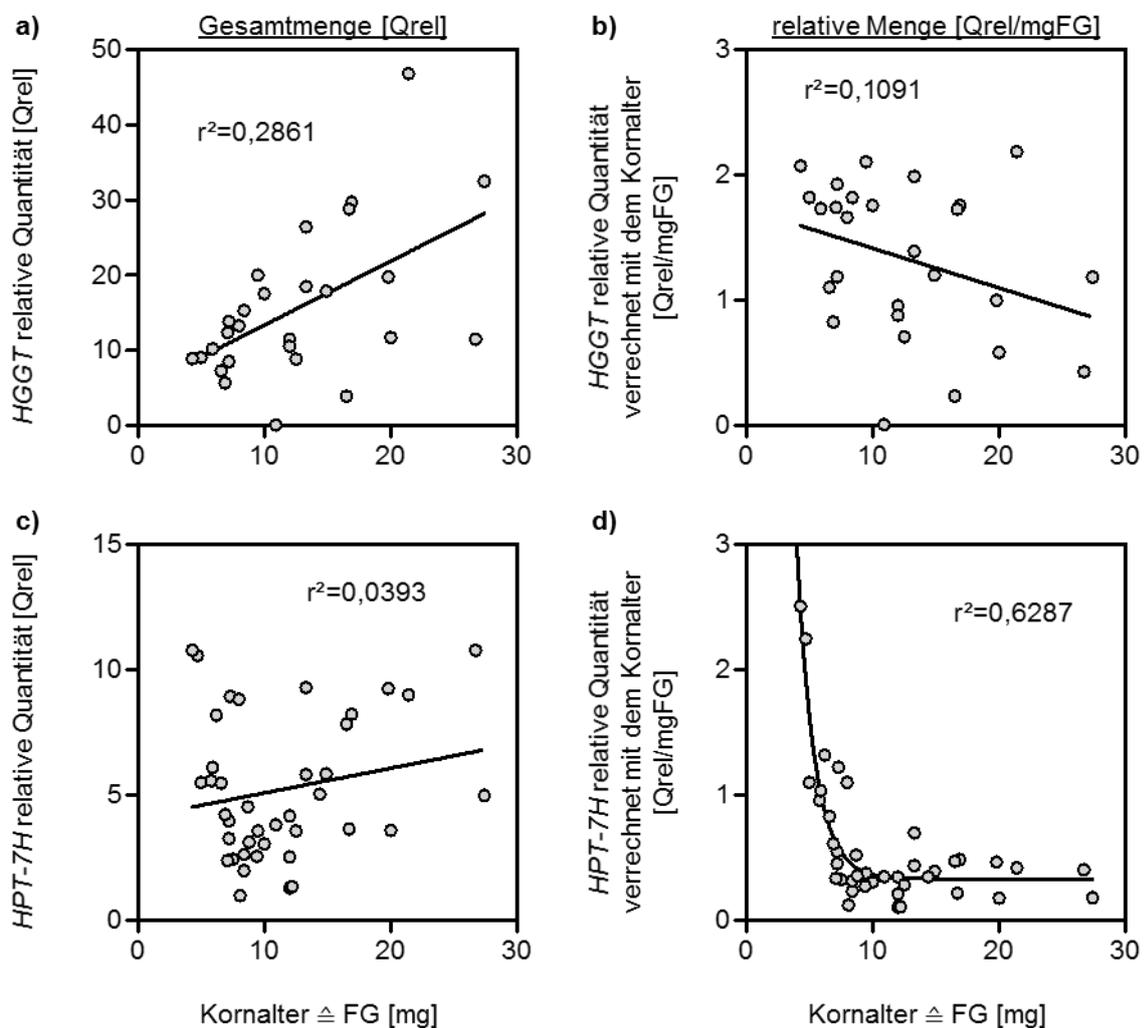


Abbildung 28: Verlauf der Transkriptmengen in unreifen Körnern. Jeder Datenpunkt zeigt die relative Transkriptmenge [Qrel] der *HGGT* (oben) oder der *HPT-7H* (unten), entweder direkt (links) oder mit dem Kornalter verrechnet (rechts), stets in Relation zum individuellen Frischgewicht jedes einzelnen Kornes. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

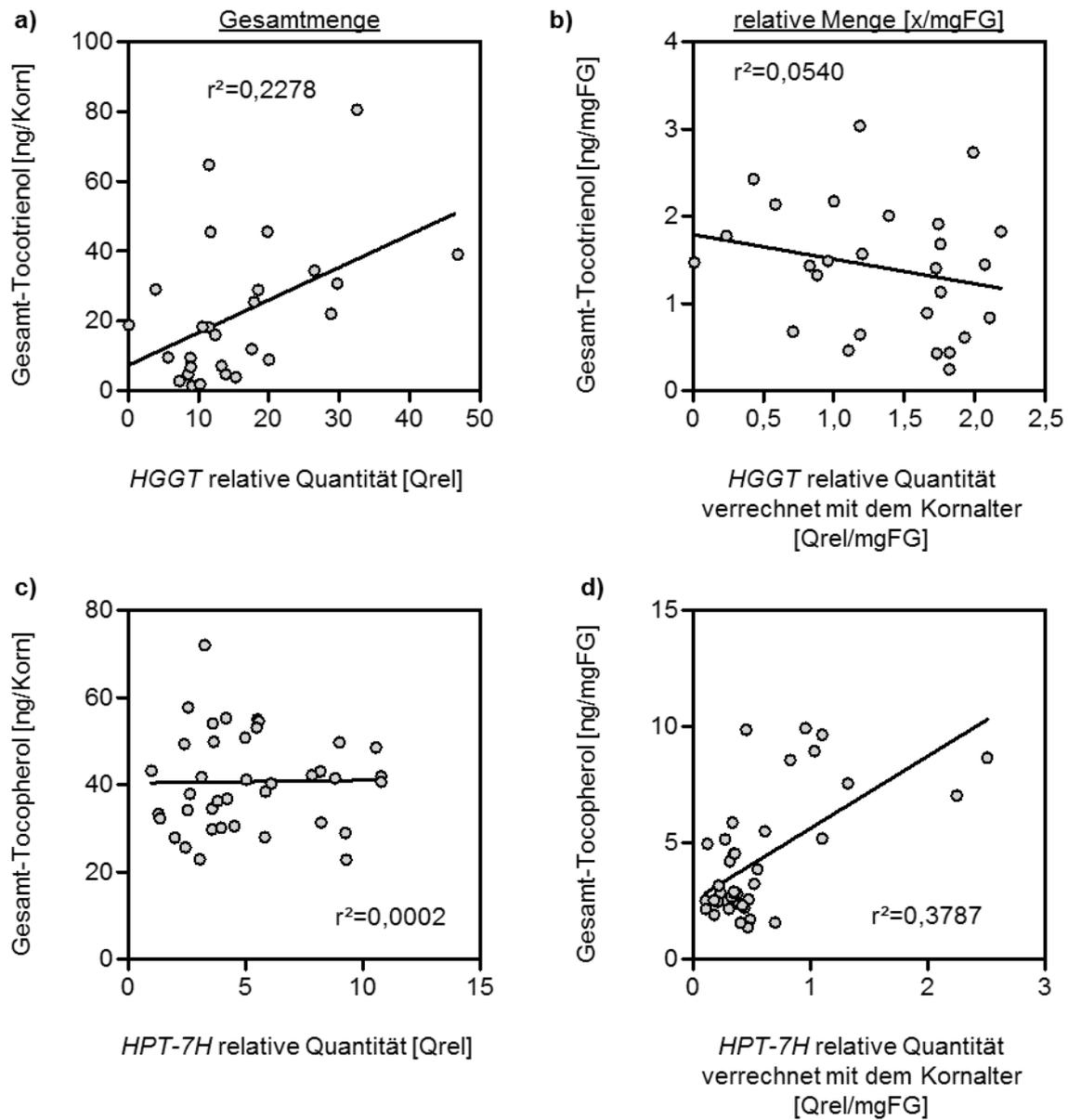


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen relativer Transkriptmenge und Tocochromanolgehalt in unreifen Körnern. Jeder Datenpunkt zeigt die relative Transkriptmenge [Qrel] der *HGGT* (oben) oder der *HPT-7H* (unten), entweder direkt (links) oder mit dem Kornalter verrechnet (rechts), stets in Relation zur Gesamtmasse einer Tocochromanolgruppe (links) oder dem Massenanteil einer Tocochromanolgruppe (rechts) (vergleiche Abbildung 25e,f und Abbildung 26e,f). Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

3.1.18. Einfluss des Tocochromanolgehalts auf die Stressresistenz von Gerstenpflanzen

Neben der Aufschlüsselung der Tocopherol-QTLs sollten auch Einflüsse der Tocochromanole auf das Pflanzenwachstum untersucht werden. Dafür wurden Assoziationen zwischen dem Tocochromanolgehalt und den verschiedenen morphologischen und physiologischen Wachstumsparametern der Pflanzen im RGH gesucht. Es wurden auch die dynamischen Veränderungen der Werte zwischen unterschiedlichen Wachstumsbedingungen betrachtet, wie es beispielsweise für den Quotienten des Kornertrags in Abschnitt 1.7.2 dargestellt ist. Es konnten keine eindeutigen Hinweise detektiert werden, dass Genotypen mit verbesserten Tocochromanoleigenschaften veränderte Wachstumseigenschaften aufwiesen. Auch die von Templer et al. (2017) berichtete Beobachtung, dass Genotypen mit einem höheren γ -Tocopherolgehalt ein höheres TKG aufweisen, konnte nicht validiert werden (Abbildung 30). Betrachtet wurde all dies stets für alle analysierten Genotypen, nur für die Gruppe der zweizeiligen Genotypen, um den Einfluss verschiedener Ährenarchitekturen zu verringern und nur für die Gruppe der europäischen Elitelinien. Auch von Templer et al. (2017) wurde der Zusammenhang (Abbildung 2) nur für die Gruppe der europäischen Elitelinien, nicht jedoch für die als mediterran eingestuft Genotypen gefunden. Es konnte jedoch ein linearer Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Tocopherolgehalt aller Genotypen und verschiedenen Wachstumsparametern detektiert werden, die mit steigender Stressintensität abnahmen (Abbildung 31).

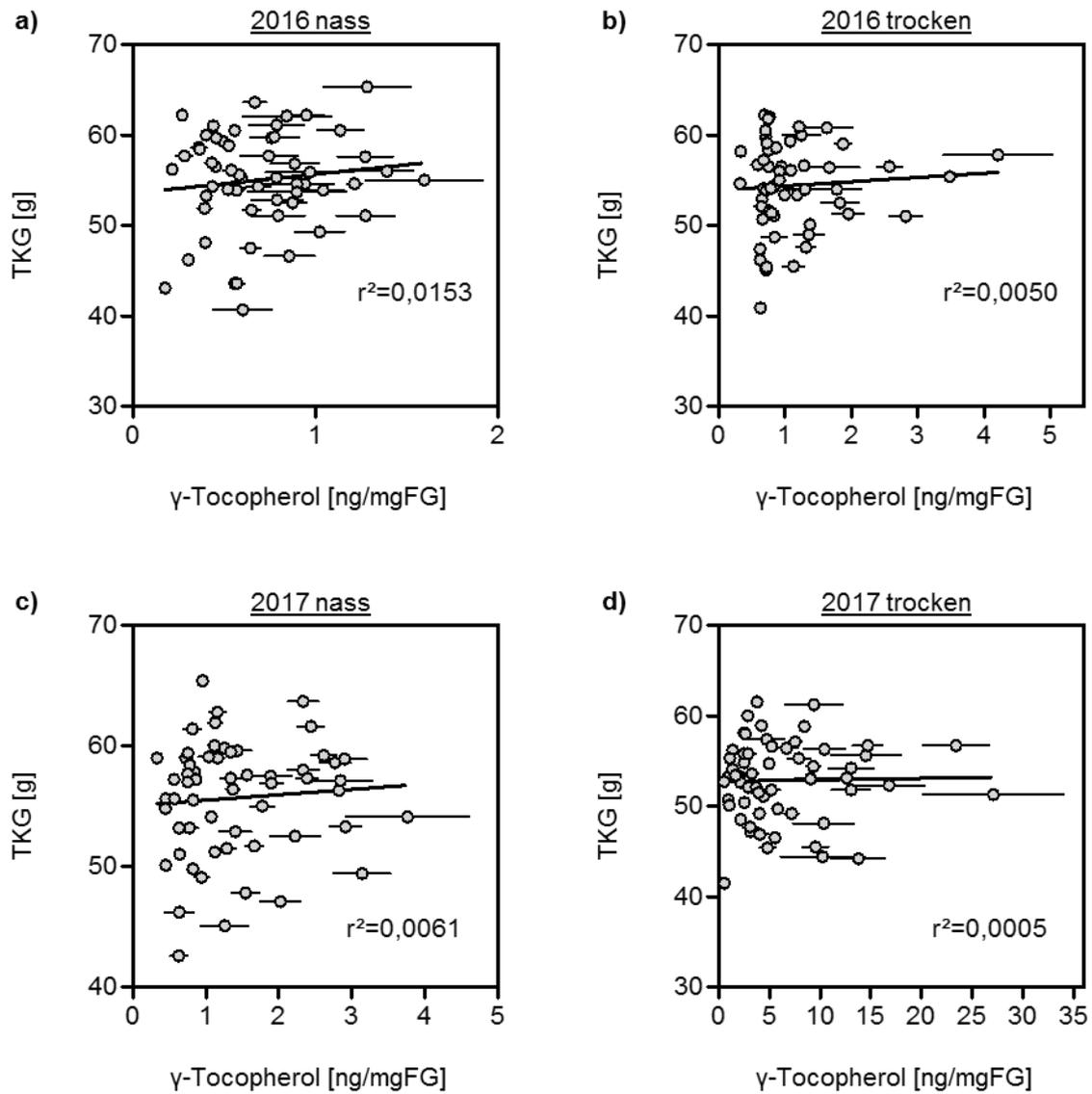


Abbildung 30: Zusammenhang zwischen dem TKG und dem γ -Tocopherolgehalt im RGH. Jeder Datenpunkt zeigt das TKG eines Genotyps in Relation zum γ -Tocopherolgehalt in Fahnenblättern -1.

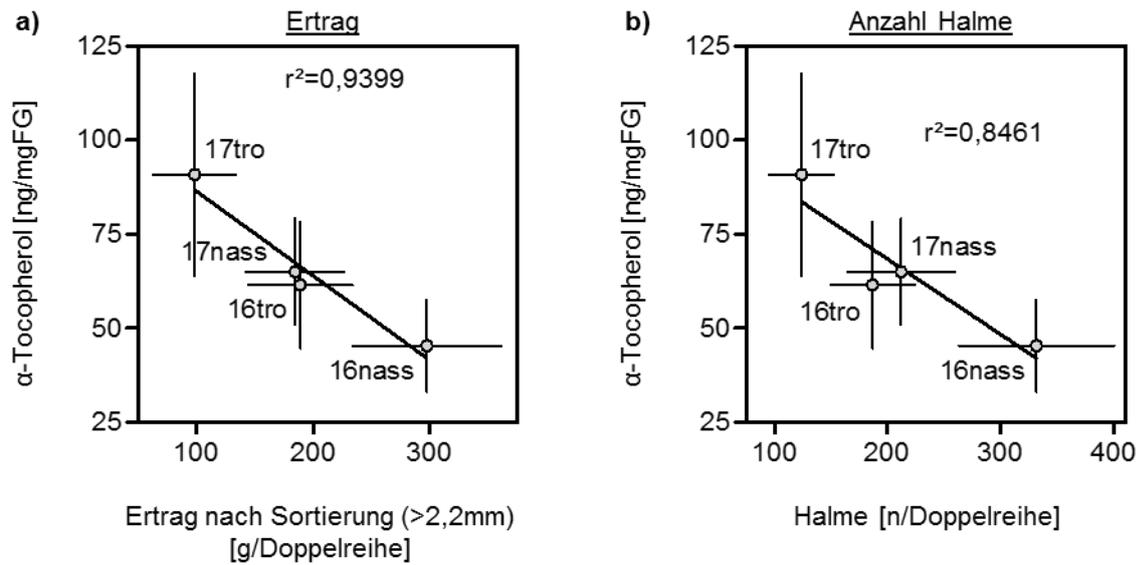


Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Wachstumsparametern und dem α -Tocopherolgehalt im RGH. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert (plus Standardabweichung) des α -Tocopherolgehalts in Blättern der 48 Genotypen, die in beiden Jahren im RGH gewachsen sind, in Relation zum Mittelwert verschiedener Wachstumsparameter. Abbildung adaptiert aus Schuy et al. (2019).

3.2. Transkriptomanalysen

3.2.1. Überblick über die Transkriptomstruktur

Die Analyse des Transkriptoms von Blättern sollte weitere Einblicke in die Adaptionsstrategien der Pflanzen gegen Trockenstress liefern (Abschnitt 1.7). Dafür wurden vier Genotypen, die eine hohe, und vier Genotypen, die eine niedrige Ertragsstabilität aufwiesen, analysiert (Abbildung 11). Bei der Auswahl der Genotypen wurde auch die Populationsstruktur berücksichtigt. Nicht allen ertragsstabilen bzw. -instabilen Genotypen sollten ähnliche Anteile der Populationscluster zugeschrieben worden sein (Abbildung 17).

Von jedem Genotyp wurden zunächst alle vier Replikate beider Wachstumsbedingungen bearbeitet, also insgesamt 64 Proben. Der kommerzielle Sequenzierungsanbieter konnte jedoch fünf Proben nicht verarbeiten. Die Sequenzierungsdaten wurden anschließend intern bioinformatisch aufgearbeitet (Details siehe Abschnitt 2.20). Nach Qualitätsfilterung wurden alle Sequenzen (*reads*) einzeln auf das aktuelle Gerstenreferenzgenom (Mascher et al. 2017, Beier et al. 2017) kartiert. Alle *reads*, die eindeutig in Regionen kartiert werden konnten die als Transkripte annotiert sind, wurden für das jeweilige Gen als Transkriptmenge (*counts*) gezählt. Von den 39734 Genen, die im Referenzgenom annotiert sind, waren je Probe durchschnittlich 20332,4 Gene exprimiert (σ : 455,3 Gene), d.h. für diese Gene wurde mindestens ein *count* gefunden, wobei für durchschnittlich 4139,7 dieser Gene (σ : 216,9 Gene) zehn oder weniger *counts* gezählt wurden. Die schwach exprimierten Gene dürften wenig Einfluss auf die übergeordnete Struktur des Transkriptoms nehmen.

Um die übergeordnete Struktur des Transkriptoms abschätzen zu können, wurden basierend auf den *counts* aller Gene Hauptkomponentenanalysen (PCAs, engl.: *principal component analysis*) durchgeführt. Dabei gruppieren die einzelnen Proben primär entsprechend ihres Genotyps, wobei die Gruppierung nach Transformation der Daten durch *VST* deutlicher ausfiel als nach Transformation durch *RLOG* (Abbildung 32). Fünf Proben gruppieren nicht mit den jeweils anderen Proben ihres Genotyps. Dafür konnte keine definitive Erklärung gefunden werden, weshalb sie von den Analysen ausgeschlossen wurden. Ohne diese Ausreißer war die Gruppierung der 54 übrigen Proben noch deutlicher zu erkennen (Abbildung 33a,b). Somit waren die Unterschiede in der Transkriptomstruktur zwischen den Genotypen größer als die Unterschiede, die durch die verschiedenen Wachstumsbedingungen ausgelöst wurden. Die Proben der verschiedenen Wachstumsbedingungen teilten sich erst innerhalb der Gruppierungen nach Genotyp auf, dafür stets entlang derselben Hauptkomponenten (PCs, engl.: *principal components*). Sie separierten nach *RLOG* entlang PC 1 und nach *VST* entlang PC 2 (Abbildung 33a,b). Zusätzlich dazu konnte vor allem nach *RLOG* eine Aufteilung der Proben nach dem

Zeitpunkt der Probennahme erkannt werden (Abbildung 33d). Die Replikate eins und zwei, die früher am Tag erstellt wurden, separierten in der hier gewählten Darstellung entlang PC 1 vermehrt nach links, während die Replikate drei und vier, die später am Tag erstellt wurden, sich vermehrt nach rechts aufteilten.

Auch die Separierung der Genotypen folgte einem gewissen Muster. Die ertragsstabilen Genotypen Aischa und Romilda trennten sich nach *VST* entlang PC 1 und nach *RLOG* entlang PC 2 von den übrigen Genotypen. Die beiden anderen ertragsstabilen Genotypen Barke und B0004 trennten sich entlang der jeweils anderen PCs von den übrigen Genotypen (Abbildung 33a,b). Der ertragsinstabile Genotyp Scarlett separierte nach *VST* entgegen den ertragsstabilen Genotypen Barke und B0004. Ansonsten zeigten alle ertragsinstabilen Genotypen ein ähnliches Verhalten auf. Den erwähnten Genotypenpaaren wurden bereits in der Populationsstrukturanalyse ähnliche abgeleitete Abstammungen zugeschrieben (Abbildung 17). Dies traf auch auf die Genotypen Barke und Marnie zu, die trotz unterschiedlicher Ertragsstabilität vor allem nach *VST* ähnlich gruppierten.

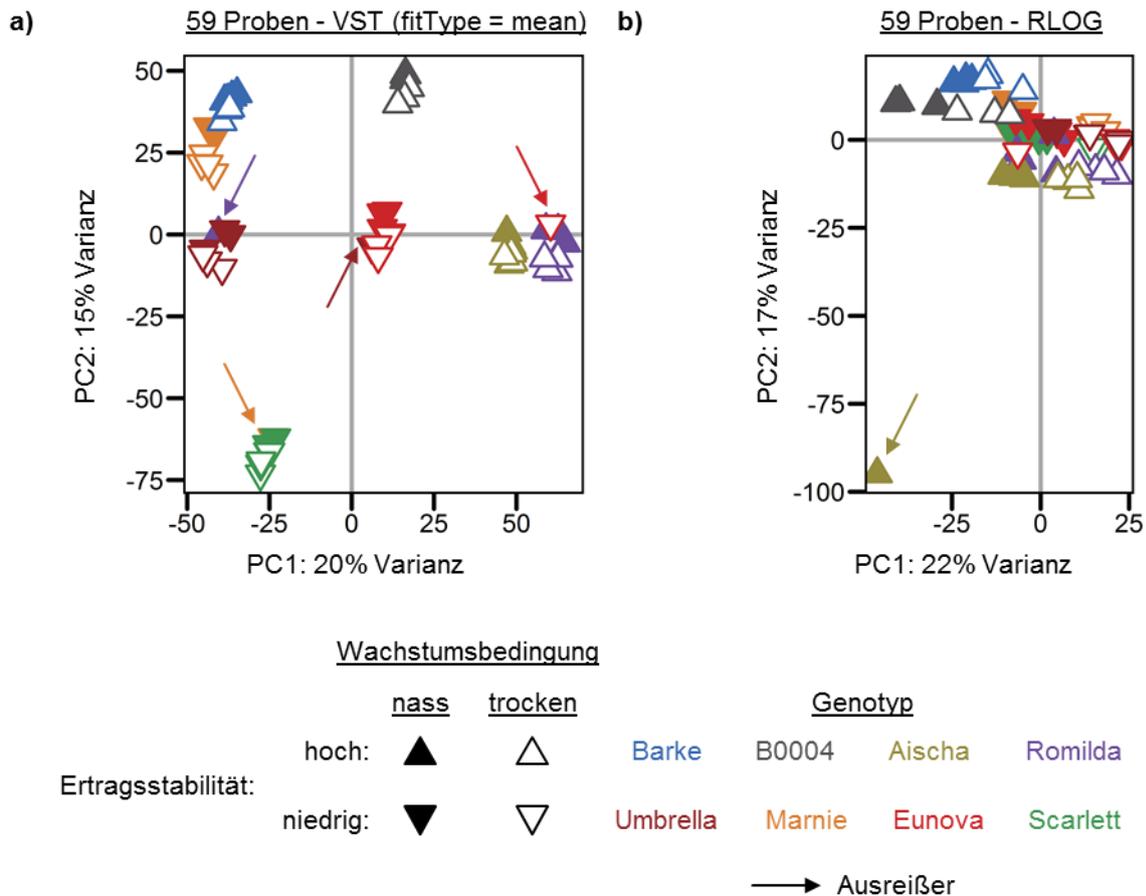
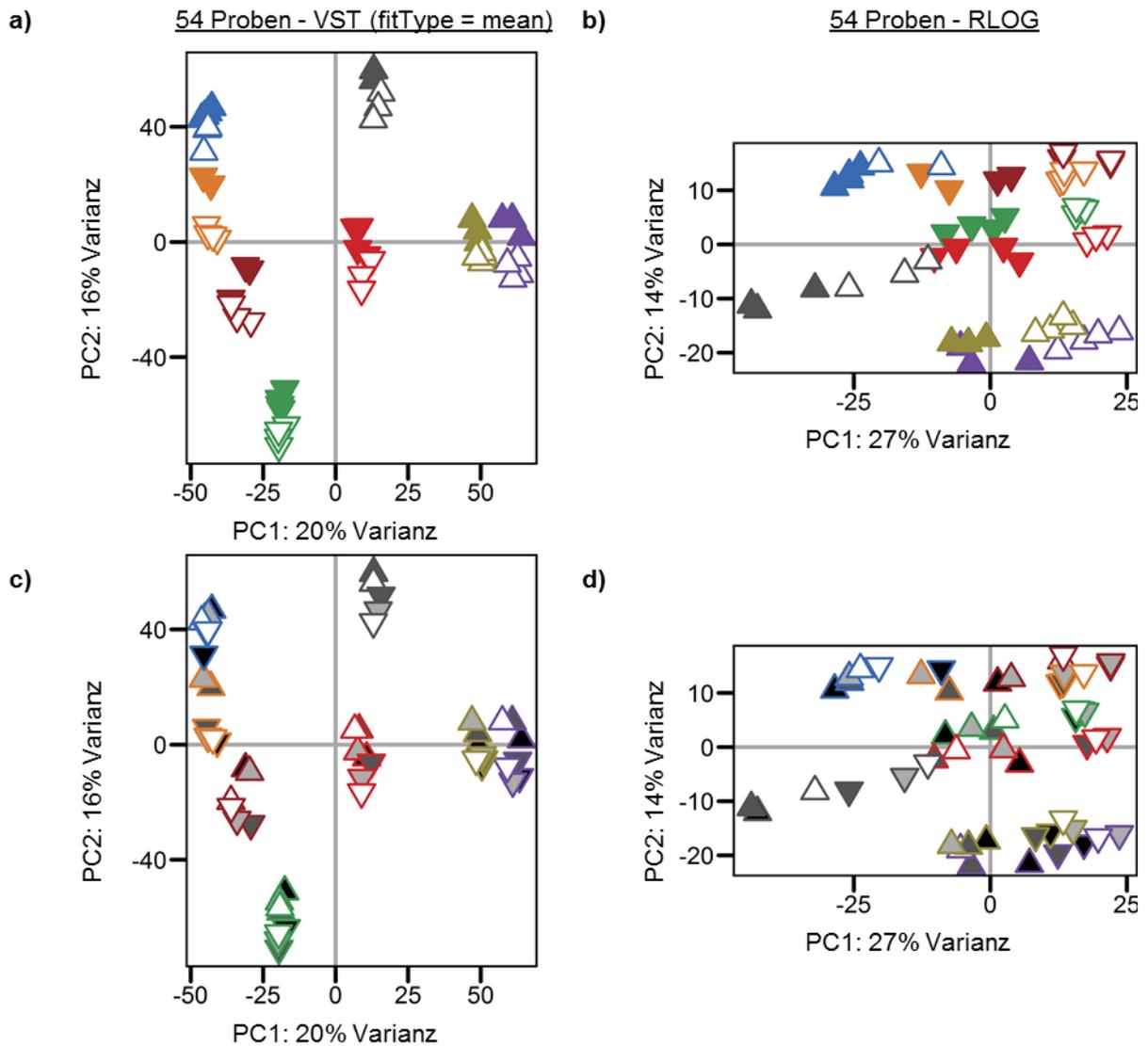


Abbildung 32: PCAs für 59 RNAseq-Proben. Basierend auf den RNAseq-counts aller Gene wurden für 59 Proben Hauptkomponentenanalysen (PCAs) durchgeführt. Die Daten wurden mit zwei unterschiedlichen Transformationsmethoden (VST: *variance stabilizing transformation*; RLOG: *regularized log transformation*) transformiert, wodurch Unterschiede in den Daten verschieden akzentuiert wurden. Dadurch erklären auch die Hauptkomponenten (PCs) unterschiedlich große Anteile der Varianz des Datensatzes. Fünf Proben gruppierten nicht mit den übrigen Proben desselben Genotyps (Ausreißer) und wurden anschließend von den Analysen ausgeschlossen.



Genotyp: Umbrella Eunova Marnie Scarlett Aischa Barke B0004 Romilda

zu a) und b) Wachstumsbedingung

nass trocken

Ertragsstabilität: hoch: ▲ △

niedrig: ▼ ▽

zu c) und d) Replikate

1 2 3 4

Wachstumsbedingung: nass: ▲▲▲▲

trocken: ▼▼▼▼

Abbildung 33: PCAs für 54 RNAseq-Proben. Basierend auf den RNAseq-counts aller Gene wurden für 54 Proben PCAs durchgeführt. Sowohl die PCAs in a) und c) als auch die in b) und d) sind identisch, zur Erkennung von übergeordneten Strukturen wurden die Proben, wie in der Legende angedeutet, unterschiedlich markiert. Weiteres in Abbildung 32.

3.2.2. Normalisierung der *count*-Werte und Gene mit der stärksten Expression

Die einzelnen Proben wurden unterschiedlich effektiv sequenziert. Die Anzahl der *reads* reichte von 39'621'000 bis 181'415'82. Dadurch unterschied sich auch die Summe der *counts* aller Gene (linearer Zusammenhang: $r^2 = 0,6262$). Vor der Analyse der differentiellen Genexpression wurde die Anzahl der *counts* für alle Proben normalisiert (*ncounts*). Die Normalisierung der *counts* der verschiedenen Gene und Proben ist ansatzweise mit der VST aus den PCAs vergleichbar (Love et al. 2014). Für die Darstellung in dieser Arbeit wurden die *ncounts* anschließend zusätzlich anhand der annotierten Länge des primären Transkripts normalisiert (*Inncounts* = *ncounts* / 1 kbp), da durch den Fragmentierungsprozess vor der Sequenzierung längere Transkripte öfter sequenziert werden können. Unabhängig von Genotyp oder Wachstumsbedingung zeigt

Tabelle 20 die fünfzig am stärksten exprimierten Gene. Darunter befinden sich einige Gene, die laut Annotation an der Photosynthese, der CO₂-Assimilation, der Stressadaptation oder der Verteilung der Photoassimilate beteiligt sind.

Gen ID	<i>Inncounts</i>	Annotation
HORVU3Hr1G116060	347511,5	undescribed protein
HORVU3Hr1G115990	339120,0	undescribed protein
HORVU5Hr1G002150	196674,2	RNA-binding protein 1
HORVU6Hr1G085170	180871,0	Photosystem II 10 kDa polypeptide
HORVU5Hr1G051010	151236,1	ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A
HORVU6Hr1G033160	148062,7	chlorophyll A/B binding protein 3
HORVU0Hr1G013900	147220,8	L-lactate dehydrogenase
HORVU2Hr1G057700	146633,2	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic
HORVU7Hr1G090100	141582,6	Thiamine thiazole synthase
HORVU7Hr1G046320	139477,5	Chlorophyll a-b binding protein 1B-21, chloroplastic
HORVU0Hr1G004830	133795,1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
HORVU2Hr1G005150	124082,3	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B
HORVU3Hr1G057090	119069,7	carbonic anhydrase 2
HORVU2Hr1G017420	118257,3	Stress responsive protein
HORVU4Hr1G015260	106909,0	Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic
HORVU4Hr1G058970	105786,3	ATP synthase subunit b'
HORVU2Hr1G036960	102042,9	Chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic
HORVU2Hr1G010690	100279,2	ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A
HORVU5Hr1G002130	97540,4	undescribed protein
HORVU4Hr1G019570	93979,8	fructose-bisphosphate aldolase 2
HORVU5Hr1G082420	88755,6	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
HORVU7Hr1G049870	85314,4	alanine:glyoxylate aminotransferase
HORVU2Hr1G041610	81692,3	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
HORVU2Hr1G019270	78055,6	undescribed protein
HORVU0Hr1G003270	76882,3	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic
HORVU3Hr1G026920	73816,6	metallothionein 3
HORVU4Hr1G027260	72245,4	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic
HORVU5Hr1G109710	69610,9	Photosystem I reaction center subunit II
HORVU3Hr1G112010	69260,8	Abscisic stress-ripening protein 1
HORVU1Hr1G055520	65778,9	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA
HORVU6Hr1G012570	63614,2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
HORVU7Hr1G091740	63067,6	post-illumination chlorophyll fluorescence increase
HORVU3Hr1G009210	62123,6	Photosystem I reaction center subunit XI
HORVU5Hr1G032980	61848,1	fructose-bisphosphate aldolase 2
HORVU2Hr1G041280	60340,0	Chlorophyll a-b binding protein CP29
HORVU2Hr1G086140	60261,9	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme
HORVU3Hr1G013840	57944,5	Metallothioneine type2
HORVU6Hr1G089600	51222,2	Sugar transporter SWEET
HORVU2Hr1G079920	51126,6	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
HORVU7Hr1G107740	51101,5	ATP-dependent zinc metalloprotease Ftsh
HORVU2Hr1G040780	51057,3	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic
HORVU6Hr1G087720	50171,1	Thioredoxin-like 2-2, chloroplastic
HORVU4Hr1G082040	50047,7	catalase 2
HORVU2Hr1G019820	49810,3	Photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic
HORVU7Hr1G077740	48323,8	ferredoxin 1
HORVU5Hr1G061770	46565,1	Cathepsin B-like cysteine proteinase
HORVU5Hr1G098890	45369,6	malate dehydrogenase
HORVU4Hr1G011500	43645,4	serine hydroxymethyltransferase 2
HORVU4Hr1G085050	43101,2	purple acid phosphatase 27
HORVU5Hr1G040970	42450,7	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs

Tabelle 20 (vorherige Seite): Top 50 exprimierte Gene. Gezeigt sind die fünfzig Gene, die in allen 54 analysierten Proben durchschnittlich die meisten *Inncounts* aufwiesen.

3.2.3. Durch Trockenstress differentiell exprimierte Gene

Die Analyse der differentiellen Genexpression zwischen den beiden Wachstumsbedingungen erfolgte für jeden Genotyp individuell. Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEG) reichte von 597 (Umbrella) bis 3429 (Eunova). Durchschnittlich 38,1 % (σ : 4,3 %) der DEG wiesen unter Trockenstress eine höhere Transkriptmenge auf als unter gut bewässerten Bedingungen. Die Unterschiede in der Anzahl der DEG konnten nicht mit der Ertragsstabilität oder einer anderen morphologischen oder physiologischen Eigenschaft der Genotypen in Verbindung gebracht werden. Die Anzahl konnte jedoch mit der kleinsten Differenz zwischen zwei Proben kontrastierender Wachstumsbedingungen entlang PC 1 nach *RLOG* in Verbindung gebracht werden (Abbildung 34).

PC 1 nach *RLOG* erklärte den größten Anteil der Varianz des Datensatzes (Abbildung 33). Somit stellt die Differenz in PC 1 nach *RLOG* annähernd ein Maß für die Ähnlichkeit von zwei Proben dar. Für jeden Genotyp wurde die kleinste Differenz zwischen zwei Proben unterschiedlicher Wachstumsbedingungen entlang PC 1 ausgelesen (Abbildung 34a). Für alle Genotypen, für die mindestens drei Proben je Wachstumsbedingung analysiert wurden, stand diese kleinste Differenz linear mit der Anzahl der DEG in Verbindung (Abbildung 34b). Für den Genotyp Marnie wurden nur zwei Replikate von gut bewässerten Wachstumsbedingungen analysiert.

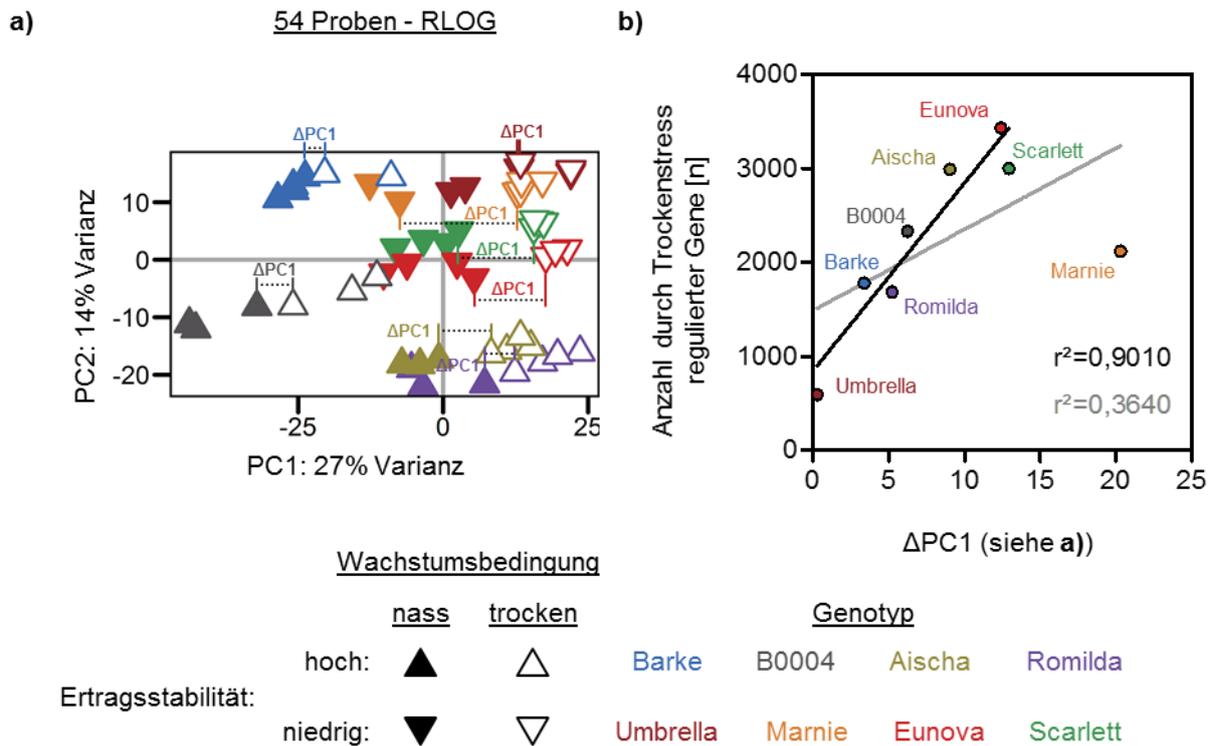


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen Transkriptomstruktur und Anzahl der DEG. Der Abstand von zwei Proben entlang PC1 nach RLOG repräsentiert die Ähnlichkeit der Transkriptomstruktur. a) Für jeden Genotyp wurde die kleinste Differenz entlang PC1 ausgelesen, die zwischen zwei Proben kontrastierender Wachstumsbedingungen auftrat ($\Delta PC1$). b) Für alle Genotypen, für die mindestens drei Replikate je Wachstumsbedingung analysiert wurden, stand $\Delta PC1$ linear mit der Anzahl der DEG exprimierten Gene in Verbindung.

Anschließend wurden sechs Schnitt- bzw. Ausschlussmengen der DEG der verschiedenen Genotypen gebildet. Gene, die unter Trockenstress in allen acht Genotypen eine höhere (Tabelle 21) oder niedrigere Transkriptmenge (Tabelle 22) aufwiesen als unter gut bewässerten Bedingungen, stellen die generelle Reaktion aller Genotypen dar. Gene, die unter Trockenstress nur in allen vier ertragsstabilen Genotypen, jedoch in keinem ertragsinstabilen Genotyp eine höhere (Tabelle 23) oder niedrigere Transkriptmenge (Tabelle 24) aufwiesen, stellen die spezifische Reaktion der ertragsstabilen Genotypen dar. Gene, die ausschließlich in den vier ertragsinstabilen Genotypen eine höhere (Tabelle 25) oder niedrigere Transkriptmenge (Tabelle 26) aufwiesen, stellen die spezifische Reaktion dieser Genotypen dar. Insgesamt 119 Gene wurden uniform in allen Genotypen entweder induziert oder reprimiert (Tabelle 21, Tabelle 22). Davon waren 46 induziert (Tabelle 21), ein Prozentsatz von 38,6 %. Ähnliches wurde bereits für die Genotypen individuell beobachtet (s.o.). Die gemeinschaftliche Reaktion ist demnach die Essenz der individuellen Reaktionen.

Bei der Erstellung der Schnittmengen wurde nicht auf Unterschiede in den Transkriptmengen zwischen den Genotypen geachtet. Auch wurde der Grad der trockenstressvermittelten Induktion/Reprimierung nicht beachtet.

(1) In allen Sorten durch Trockenstress induziert		Umbrella 47,0%		Eunova 47,6%		Marnie 50,3%		Scarlett 52,4%		Aischa 77,6%		Barke 78,9%		B0004 82,5%		Romilda 83,2%			
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU0Hr1G008950	Branched-chain-amino-acid aminotransferase 6	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G018370	undescribed protein none	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G025870	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G031460	acyl carrier protein 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G053930	Oxysterol-binding protein-related protein 2A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G057880	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G058520	beta glucosidase 11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G081490	Ubiquitin domain-containing protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G089730	Iron-sulfur cluster assembly protein 1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
HORVU1Hr1G095410	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 4	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
HORVU2Hr1G039640	NAC domain protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G078380	undescribed protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G103150	Pectinesterase inhibitor domain containing protein	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G110230	Protein kinase superfamily protein	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G116090	undescribed protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G029750	unknown protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G050340	Protein phosphatase 2C family protein	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
HORVU3Hr1G053210	unknown protein	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
HORVU3Hr1G059170	Protein phosphatase 2C family protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G067380	Protein phosphatase 2C family protein	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
HORVU3Hr1G074360	unknown function	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G077930	Nucleoredoxin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G083250	bZIP transcription factor 27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G085930	Protein phosphatase 2C family protein	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
HORVU3Hr1G090170	tropinone reductase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G093310	Transcription factor bHLH62	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G112600	unknown function	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
HORVU4Hr1G000620	ATP binding cassette subfamily B1	1	1	2	1	1	1	1	3	3	2	4	4	3	4	3	3	3	3
HORVU4Hr1G049500	sucrose synthase 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU4Hr1G060370	Protein phosphatase 2C family protein	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
HORVU4Hr1G074840	Cytochrome P450 superfamily protein	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2
HORVU4Hr1G084390	beta-amylase 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G021610	CASP-like protein 4C1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G045650	NAC domain protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G077140	Esterase/lipase/thioesterase family protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
HORVU5Hr1G105840	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	1	1	2	3	2	4	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
HORVU6Hr1G015480	Phototropic-responsive NPH3 family protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G026370	undescribed protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G084070	Dehydrin DHN3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2
HORVU7Hr1G024960	ABC transporter C family member 10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU7Hr1G024980	ABC transporter C family member 10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU7Hr1G051860	methyl-CPG-binding domain protein 02	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU7Hr1G073640	nitrate reductase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU7Hr1G088730	Dentin sialophosphoprotein-like	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU7Hr1G095890	undescribed protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU7Hr1G115670	undescribed protein	1	1	3	1	3	3	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2

Tabelle 21: Gene, die in allen acht Genotypen unter Trockenstress signifikant höhere Transkriptmengen aufwiesen. Für jeden Genotyp wurde der Mittelwert der *ncounts* aller analysierten Replikate jeder Wachstumsbedingung (n: gut bewässert; t: trocken) bestimmt. Für jedes Gen ist die Anzahl der *ncounts* als Farbskala dargestellt, von niedrig (rot) bis hoch (grün). Auf Basis der *reads* wurde für jeden Genotyp die Genvariante (A) bestimmt. In einzelnen Fällen konnten keine Allele ausgelesen werden, da keine *reads* vorhanden waren. Gezeigt ist außerdem die prozentuale Ertragsstabilität der Genotypen.

(2) In allen Sorten durch Trockenstress reprimiert		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%		
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
		HORVU1Hr1G018710	Carboxypeptidase Y homolog A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G028030	NAD-dependent malic enzyme 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G045690	Benzyl alcohol O-benzoyltransferase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G049120	Glutathione S-transferase family protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G054020	Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G060960	Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase RihA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G070420	Abscisic acid receptor PYR1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G072890	unknown function	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G086450	pirin	1	1	2	1	2	3	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
HORVU1Hr1G092240	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G092250	receptor kinase 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G092300	receptor kinase 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU1Hr1G092310	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G000280	cysteine synthase C1	1	1	2	1	2	1	1	3	4	1	3	4	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	4
HORVU2Hr1G004230	12-oxophytodienoate reductase 2	1	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
HORVU2Hr1G014670	undescribed protein	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
HORVU2Hr1G028330	EF hand family protein	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
HORVU2Hr1G034090	Heparanase-like protein 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G060350	serine/threonine protein kinase 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G093210	cyclin p4;1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU2Hr1G098390	receptor kinase 2	1	1	1	1	1	4	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2
HORVU2Hr1G109590	HXXXD-type acyl-transferase family protein	1	1	2	1	2	1	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	1
HORVU2Hr1G117360	Protein kinase superfamily protein	1	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	3	1	3	3
HORVU2Hr1G124930	Peroxidase superfamily protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G010140	auxin response factor 16	1	1	2	1	2	1	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3
HORVU3Hr1G010190	B3 domain-containing transcription factor NGA2	1	1	3	1	3	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU3Hr1G018820	Chromosome 3B, genomic scaffold, cultivar Chinese Spring	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2
HORVU3Hr1G020230	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU3Hr1G095340	Chromosome 3B, genomic scaffold, cultivar Chinese Spring	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HORVU4Hr1G000850	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	1	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	4	1	4	4	1	5	5	1	5	6	1	6	6
HORVU4Hr1G002390	WRKY DNA-binding protein 57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU4Hr1G004460	Protein NRT1/ PTR FAMILY 2.9	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU4Hr1G050930	Cytochrome P450 superfamily protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU4Hr1G050990	calmodulin like 42	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU4Hr1G055220	Abscisic acid receptor PYR1	1	1	2	1	3	3	1	3	4	1	4	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	1
HORVU4Hr1G059150	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1	1	3	2
HORVU4Hr1G062330	unknown function	1	1	2	1	2	2	1	2	3	1	3	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
HORVU4Hr1G067450	sugar transporter protein 7	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU4Hr1G081210	Cytochrome P450 superfamily protein	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1
HORVU5Hr1G012240	Glucan 1,3-beta-glucosidase	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU5Hr1G019650	Heparanase-like protein 1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G043010	unknown function	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G043460	calmodulin like 23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G062410	Hypersensitive-induced response protein 1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G064260	HXXXD-type acyl-transferase family protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU5Hr1G084880	receptor kinase 2	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU5Hr1G084900	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU5Hr1G094700	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU5Hr1G098640	receptor kinase 2	1	1	2	1	3	3	1	2	4	1	4	3	1	3	3	1	4	3	1	4	4	1	4	4
HORVU5Hr1G102900	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25	1	1	2	1	3	4	1	4	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	1
HORVU5Hr1G104670	Glutathione S-transferase family protein	1	1	2	1	2	2	1	3	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1
HORVU5Hr1G123550	receptor kinase 2	1	1	3	1	3	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
HORVU6Hr1G011970	Calcium-binding EF-hand family protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G017860	L-aspartate oxidase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G027360	mercaptopyruvate sulfurtransferase 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G055820	Ankyrin repeat family protein	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
HORVU6Hr1G062380	Ethylene-responsive transcription factor 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G083680	glutamate receptor 2.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G084370	receptor kinase 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HORVU6Hr1G088980	receptor kinase 3	1	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1
HORVU7Hr1G001570	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1
HORVU7Hr1G024670	GDSL esterase/lipase	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2

(3) Spezifisch in ertragsstabilen Sorten durch Trockenstress induziert		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%		
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU4Hr1G067430	Heat shock 70 kDa protein 8		1			2			2			1			1			2			1			1	
HORVU7Hr1G060130	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A		1			1			1			1			1			1			1			1	

Tabelle 23: Gene, die nur in den vier ertragsstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsinstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant höhere Transkriptmengen aufwiesen. Weiteres siehe Tabelle 21.

(4) Spezifisch in ertragsstabilen Sorten durch Trockenstress reprimiert		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%		
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU2Hr1G032330	sulfotransferase 17		1			1			1			1			1			1			1			1	
HORVU4Hr1G054970	Wound-induced protein 1		1			1			1			1			1			1			1			1	

Tabelle 24: Gene, die nur in den vier ertragsstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsinstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant niedrigere Transkriptmengen aufwiesen. Weiteres siehe Tabelle 21.

(5) Spezifisch in ertragsinstabilen Sorten durch Trockenstress induziert		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%		
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU2Hr1G105140	Protein of unknown function																								
HORVU3Hr1G094100	Protein of unknown function		1			1			1			1			1			1			1			1	
HORVU4Hr1G022950	vacuolar sorting receptor homolog 1		1			1			1			1			1			1			1			1	
HORVU4Hr1G056100	Mitochondrial substrate carrier family protein		1			3			1			1			2			1			1			1	
HORVU5Hr1G015010	dihydroflavonol 4-reductase-like1		1			1			1			1			1			1			1			1	
HORVU5Hr1G015040	dihydroflavonol 4-reductase-like1		1			1			1			1			1			1			1			1	
HORVU6Hr1G049790	acyl carrier protein 1																								
HORVU7Hr1G014870	ABC transporter G family member 14																								
HORVU7Hr1G056700	BAG family molecular chaperone regulator 3		1			1			1			1			1			1			1			1	

Tabelle 25: Gene, die nur in den vier ertragsinstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant höhere Transkriptmengen aufwiesen. Weiteres siehe Tabelle 21.

(6) Spezifisch in ertragsinstabilen Sorten durch Trockenstress reprimiert		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%		
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU6Hr1G027620	tubulin beta chain 2		1			1			1			1			1			1			1			1	
HORVU7Hr1G033230	sucrose synthase 4		1			2			1			1			1			1			1			1	

Tabelle 26: Gene, die nur in den vier ertragsinstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant niedrigere Transkriptmengen aufwiesen. Weiteres siehe Tabelle 21.

3.2.4. Gene, deren Aktivität mit Ertragsstabilität korreliert

Als nächstes wurden Gene identifiziert, deren Aktivität direkt mit der prozentualen Ertragsstabilität der Genotypen in Verbindung stand. Die Ertragsstabilität ist der Wachstumsparameter, der als repräsentatives Maß für die Fitness der Pflanzen betrachtet wurde (Abschnitt 1.7). Folglich wurden Gene gesucht, die zwischen den Genotypen unterschiedliche Transkriptmengen aufwiesen. Die Analyse erfolgte getrennt für die Proben beider Wachstumsbedingungen. Unter gut bewässerten Bedingungen stand die Transkriptmenge von 386 Genen mit der Ertragsstabilität in Verbindung. Davon waren 232 positiv assoziiert, d.h. hohe Transkriptmengen fanden sich in Genotypen mit hoher Ertragsstabilität, und 152 waren negativ assoziiert, d.h. hohe Transkriptmengen fanden sich in Genotypen mit niedriger Ertragsstabilität. In den Trockenstressproben wurden 541 Gene identifiziert, 352 waren positiv und 189 negativ assoziiert. Die Ertragsstabilität errechnete sich aus dem Kornertrag beider Wachstumsbedingungen (Abbildung 11). Deshalb wurden zunächst nur Gene betrachtet, deren Aktivität unter beiden Wachstumsbedingungen assoziiert war. 128 Gene waren unter beiden Wachstumsbedingungen positiv assoziiert, 89 negativ und kein Gen unter beiden Wachstumsbedingungen entgegengesetzt.

Bei der individuellen Betrachtung der Gene, die positiv mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, fand sich in einer Vielzahl von Genen ein sehr distinktes Expressionsmuster. Die Gene waren in den beiden ertragsstabilen Genotypen Barke und B0004 deutlich stärker exprimiert als in allen anderen sechs Genotypen. Die Transkriptmenge dieser Gene stand damit nicht strikt linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung, wie es für die anderen Gene beobachtet wurde (Abbildung 35). Deshalb wurden in einem nächsten Schritt speziell Gene identifiziert, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 im Vergleich zu den übrigen sechs Genotypen stärker exprimiert waren. Die Analyse erfolgte erneut getrennt für die Proben beider Wachstumsbedingungen. Unter gut bewässerten Bedingungen wurden 1867 und unter Trockenstress 1999 Gene identifiziert. Anhand dieser Gene wurde die Liste der 128 Gene bereinigt, die mit der Ertragsstabilität in Verbindung standen (s.o.). Somit standen noch 53 Gene streng linear positiv mit der Ertragsstabilität in Verbindung (Tabelle 27). Heuristisch betrachtet beschränkte sich dieser Phänotyp nur auf Gene, die in den beiden Genotypen stärker exprimiert waren. Formell konnten Gene identifiziert werden, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 schwächer exprimiert waren als in den übrigen sechs Genotypen. Dieser Phänotyp war jedoch nicht stark ausgeprägt. Die Liste der 89 Gene, die negativ mit der Ertragsstabilität in Verbindung standen (s.o.), wurde nicht bereinigt (Tabelle 28).

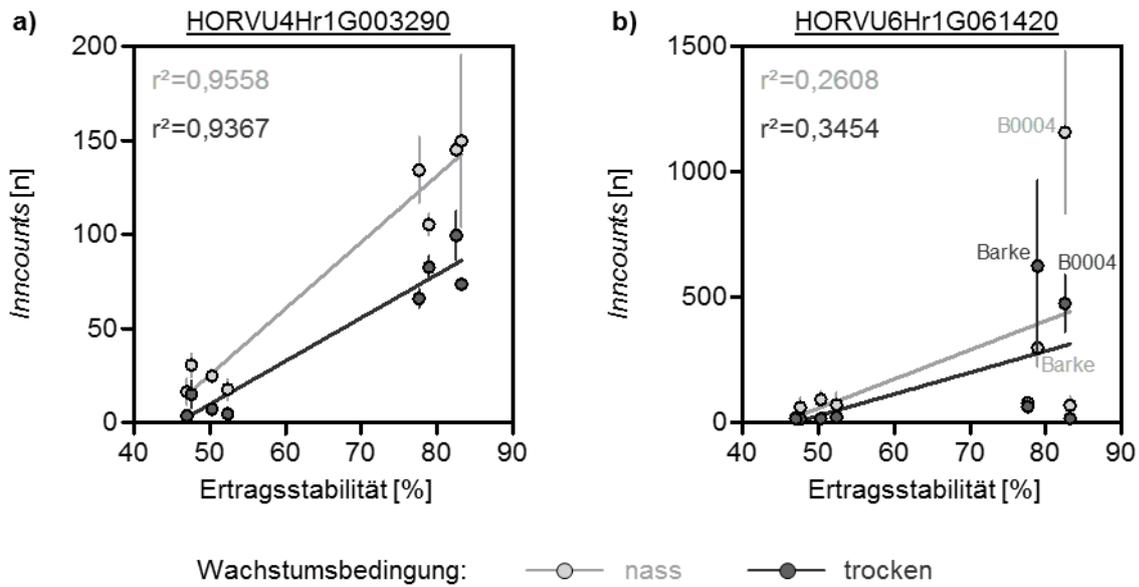


Abbildung 35: Beispiele für betrachtete Expressionsmuster in RNAseq-Analysen. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert (plus Standardabweichung) der *Inncounts* aus RNAseq-Analysen von allen Proben eines Genotyps, je Wachstumsbedingung, in Relation zur Ertragsstabilität des Genotyps. **(a)** Ein Beispiel für ein Gen, dessen Transkriptmenge unter beiden Wachstumsbedingungen streng linear mit der Ertragsstabilität assoziiert ist (Pyruvat-Kinase, siehe auch folgende Abschnitte). **(b)** Ein Beispiel für ein Gen, dessen Transkriptmenge formell auch mit der Ertragsstabilität assoziiert ist, jedoch heuristisch betrachtet nicht linear (nicht weiter betrachtet, siehe Erklärungen in Abschnitt 3.2.4). Auf Basis von weiteren Analysen wurde es letztlich von der Liste der Gene, die streng linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung stehen sollen, ausgeschlossen.

Positiv mit Ertragsstabilität in Verbindung		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%					
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU1Hr1G004080	Disease resistance protein			1			2			3			4			5			6			5			7			
HORVU1Hr1G005260	ankyrin repeat family protein			1			1			1			2			3			2			3			3			
HORVU1Hr1G007310	Calcium-transporting ATPase 1			1			2			3			4			5			6			7			5			
HORVU1Hr1G090950	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3-II			1			2			2			2			2			2			2			2			
HORVU1Hr1G094050	Protein kinase superfamily protein			1			1			1			2			3			3			3			3			
HORVU1Hr1G094800	V-type proton ATPase subunit C			1			1			1			2			3			4			3			3			
HORVU1Hr1G095270	Zinc finger CCCH domain-containing protein 37			1			1			1			2			3			4			3			3			
HORVU2Hr1G015240	auxin response factor 2			0			1			0			1			2			0			2			2			
HORVU2Hr1G104500	F-box protein PP2-B1			1			2			1			1			3			2			3			3			
HORVU2Hr1G105130	Glycosyltransferase			1			1			1			1			2			2			3			3			
HORVU2Hr1G118290	actin-related protein 8			1			2			1			1			1			1			1			1			
HORVU2Hr1G118520	exocyst subunit exo70 family protein H6			1			2			1			1			3			3			3			3			
HORVU2Hr1G119780	Disease resistance protein RPM1			1			2			2			2			1			1			1			1			
HORVU2Hr1G119820	CsATPR5, putative, expressed			0			1			0			0			2			2			2			2			
HORVU2Hr1G120440	early nodulin-like protein 6			0			0			0			0			1			1			1			1			
HORVU3Hr1G021970	Transcription initiation factor IIA subunit 2			1			2			2			1			3			2			2			3			
HORVU3Hr1G095770	Insulin-degrading enzyme			1			1			1			1			1			1			1			1			
HORVU3Hr1G096330	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU3Hr1G096830	Carboxypeptidase Y homolog A			1			2			1			1			3			1			3			3			
HORVU3Hr1G098150	Disease resistance protein			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU3Hr1G098430	unknown function			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU3Hr1G099000	unknown function			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU3Hr1G110190	unknown function			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU3Hr1G110550	unknown function			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU3Hr1G113090	Vacuolar protein sorting-associated protein 55 homolog			1			1			1			1			2			3			2			3			
HORVU3Hr1G113120	Wound-induced protein			1			1			1			1			2			3			2			3			
HORVU4Hr1G001070	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein			1			1			1			1			2			1			2			1			
HORVU4Hr1G002160	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase fam			1			1			1			1			2			1			2			1			
HORVU4Hr1G003290	Pyruvate kinase family protein			1			1			1			1			2			2			2			2			
HORVU4Hr1G003420	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)			1			1			1			1			2			2			2			2			
HORVU4Hr1G007220	Basic blue protein			1			1			1			1			1			1			1			2			
HORVU4Hr1G043300	14-3-3-like protein GF14-D			1			1			1			1			1			1			1			1			
HORVU4Hr1G056080	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase fam			0			0			0			0			1			0			1			1			
HORVU4Hr1G064080	B-cell receptor-associated 31-like			1			1			1			1			2			1			1			2			
HORVU4Hr1G083950	serine carboxypeptidase-like 19			1			1			1			1			2			1			2			2			
HORVU4Hr1G085990	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25			1			1			2			1			1			2			2			1			
HORVU4Hr1G088190	2-phosphoglycerate kinase			1			1			1			1			2			1			2			2			
HORVU4Hr1G088610	Quinone oxidoreductase			1			1			1			1			2			1			1			2			
HORVU4Hr1G089080	UDP-N-acetylglucosamine-peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit			1			1			1			1			2			1			1			2			
HORVU5Hr1G079830	unknown function			1			2			1			1			1			3			2			3			
HORVU5Hr1G098710	Endoglucanase 7			0			0			1			0			1			0			1			1			
HORVU5Hr1G099160	NB-ARC domain containing protein			1			2			3			1			4			3			4			4			
HORVU6Hr1G030590	calcium-transporting ATPase, putative			1			1			1			1			1			1			1			1			
HORVU7Hr1G000910	NAC domain containing protein 62			1			1			1			1			2			3			2			2			
HORVU7Hr1G001560	Mitochondrial pyruvate carrier 4			1			2			2			2			2			2			2			2			
HORVU7Hr1G003920	glutamine cyclotransferase			1			2			2			2			1			3			1			1			
HORVU7Hr1G012370	Succinate dehydrogenase subunit 5, mitochondrial			1			2			3			1			3			3			3			4			
HORVU7Hr1G020720	receptor-like protein kinase 4			1			2			1			1			3			4			3			3			
HORVU7Hr1G021200	Oligosaccharyltransferase complex/magnesium transporter			1			2			1			1			1			2			1			1			
HORVU7Hr1G103550	Polyubiquitin			1			1			1			1			1			1			1			1			
HORVU7Hr1G103560	unknown function			1			1			1			1			1			1			1			1			
HORVU7Hr1G107010	Ubiquitin family protein			1			1			1			2			1			2			1			1			
HORVU7Hr1G108000	BTB/POZ domain-containing protein			1			1			1			2			1			2			1			1			

Tabelle 27: Gene, deren Transkriptmenge unter beiden Wachstumsbedingungen positiv linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung steht. Für jeden Genotyp wurde der Mittelwert der *ncounts* aller analysierten Replikate jeder Wachstumsbedingung (n: gut bewässert; t: trocken) bestimmt. Für jedes Gen ist die Anzahl der *ncounts* als Farbskala dargestellt, von niedrig (rot) bis hoch (grün). Auf Basis der *reads* wurde für jeden Genotyp die Genvariante (A) bestimmt. Fett gedruckte Gen IDs: Die Allele verteilen sich spezifisch auf die ertragsinstabilen oder die ertragsstabilen Genotypen. In einigen Fällen konnten keine Allele ausgelesen werden, da keine *reads* vorhanden waren. Gezeigt ist außerdem die prozentuale Ertragsstabilität der Genotypen.

Tabelle 28 (nächste Seite): Gene, deren Transkriptmenge unter beiden Wachstumsbedingungen negativ linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung steht. Weiteres siehe Tabelle 27.

Negativ mit Ertragsstabilität in Verbindung		Umbrella 47,0%			Eunova 47,6%			Marnie 50,3%			Scarlett 52,4%			Aischa 77,6%			Barke 78,9%			B0004 82,5%			Romilda 83,2%					
Gen ID	Annotation	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A	n	t	A
HORVU0Hr1G039050	C2 domain-containing protein		1			1		1		2		2		2		2		2		3		3		3				
HORVU0Hr1G040540	RING/U-box superfamily protein		1		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU1Hr1G000860	Disease resistance protein		1		0		1		2		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU1Hr1G001510	Disease resistance protein RPM1		1		2		1		2		2		3		4		3		3		2		2		2			
HORVU1Hr1G002590	receptor-like protein kinase 4																											
HORVU1Hr1G002600	receptor-like protein kinase 4																											
HORVU1Hr1G003700	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family		1		1		1		2		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU1Hr1G012180	Disease resistance protein RPP13		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU1Hr1G068380	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU1Hr1G079510	Galactosyltransferase family protein		1		1		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU1Hr1G079610	unknown function		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU1Hr1G079650	unknown function		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU1Hr1G091050	ATP-dependent RNA helicase DBP2		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU1Hr1G091230	Protein kinase superfamily protein		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU1Hr1G092260	Glutaredoxin family protein		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU1Hr1G094810	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein		1		1		1		1		2		2		1		2		2		2		2		2			
HORVU1Hr1G095020	casein kinase I-like 5		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU1Hr1G095170	Rho GDP-dissociation inhibitor 1		1		2		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU1Hr1G095430	UDP-glucose 4-epimerase 1		1		1		1		2		3		4		3		4		3		3		3		3			
HORVU2Hr1G001330	serpin 3		1		2		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G005340	Disease resistance protein RPM1		1		2		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G006280	Phosphoglycerate mutase family protein		1		1		1		2		3		3		3		3		2		3		2		3			
HORVU2Hr1G006320	Phosphoglycerate mutase family protein		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU2Hr1G006910	Cytochrome P450 superfamily protein		1		2		1		3		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU2Hr1G024120	terpenoid synthase 13		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU2Hr1G029230	NAD-dependent epimerase/dehydratase		1		1		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU2Hr1G036220	NAD-dependent epimerase/dehydratase		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU2Hr1G096400	CsAtPR5, putative, expressed		1		2		1		2		1		2		1		1		1		1		1		1			
HORVU2Hr1G102130	Hypoxia-responsive family protein		1		1		2		1		3		3		2		3		3		3		3		3			
HORVU2Hr1G104530	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH		1		2		1		3		4		5		4		5		4		4		4		4			
HORVU2Hr1G117380	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein		1		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G117490	Serine/threonine-protein kinase		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G117600	homogentisate phytyltransferase 1		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G117680	Protein kinase superfamily protein		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G118410	Plant cysteine oxidase 3		1		2		1		1		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU2Hr1G118420	regulatory protein RecX family protein		1		2		1		1		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU2Hr1G119380	Disease resistance protein		1		3		2		2		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU2Hr1G119680	undescribed protein		0		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU2Hr1G119970	ankyrin repeat family protein																											
HORVU2Hr1G120340	myb domain protein 16		1		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU2Hr1G120420	undescribed protein		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU2Hr1G122030	unknown function																											
HORVU3Hr1G002330	receptor-like protein kinase 4																											
HORVU3Hr1G004110	Chromosome 3B, genomic scaffold, cultivar Chinese Spring		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU3Hr1G004130	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1		1		1		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU3Hr1G006220	unknown function		1		2		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU3Hr1G015120	Cytochrome P450 superfamily protein		1		2		3		1		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU3Hr1G015130	Cytochrome P450 superfamily protein		1		2		3		1		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU3Hr1G067020	NAD-dependent epimerase/dehydratase		1		2		2		1		3		3		3		3		3		3		3		3			
HORVU3Hr1G097010	beta glucosidase 11		1		3		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2			
HORVU3Hr1G097230	Oxalyl-CoA decarboxylase		1		1		1		1		2		1		2		1		2		2		2		2			
HORVU3Hr1G098730	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein		1		2		3		1		4		3		4		4		4		4		4		4			
HORVU3Hr1G099430	Histone-lysine N-methyltransferase setd3		1		1		1		1		2		1		2		1		2		2		2		2			
HORVU3Hr1G104070	BRCT domain-containing DNA repair protein																											
HORVU3Hr1G108150	Cytochrome P450 superfamily protein																											
HORVU4Hr1G003090	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU4Hr1G003470	unknown function		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU4Hr1G050580	unknown function		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU4Hr1G057520	Protein kinase superfamily protein		1		1		1		1		3		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU4Hr1G057530	Elongator complex protein 6		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU4Hr1G060600	Protein of unknown function (DUF3527)		1		2		2		2		3		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU4Hr1G083310	DET1- and DDB1-associated protein 1		1		1		1		1		2		1		2		1		2		2		2		2			
HORVU4Hr1G083930	Cytochrome P450 superfamily protein		1		1		1		1		2		1		2		1		2		2		2		2			
HORVU4Hr1G089230	Cytochrome P450 superfamily protein		1		1		1		1		2		1		2		1		2		1		1		1			
HORVU5Hr1G095140	unknown function		1		2		1		3		4		1		4		4		4		4		4		4			
HORVU5Hr1G099640	Protein of unknown function (DUF1068)		1		1		1		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G114950	Kinetochore protein NDC80 homolog		1		1		2		3		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G115280	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G115320	Pre-mRNA-splicing factor CWC21		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G117070	Pentatricopeptide repeat-containing protein		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G117600	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase		1		1		0		1		0		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU5Hr1G117610	Domain of unknown function (DUF2431)		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G117680	Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU5Hr1G117800	B3 domain-containing protein		1		1		2		1		2		2		2		2		2		2		2		2			
HORVU6Hr1G003630	unknown function		1		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
HORVU6Hr1G057260	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases		1		2		0		1		2		0		2		0		2		2		2		2			
HORVU6Hr1G091600	unknown function		1		0		0		0		1		0		0		0		0		0		0		0			
HORVU7Hr1G000820	WD repeat-containing protein 89 homolog		1		1		1																					

3.2.5. Technische Validierung der Daten über RT-qPCR

Welche Rolle die in den Abschnitten 3.2.3 und 3.2.4 identifizierten Gene für die Adaption der Pflanzen an den Trockenstress spielen könnten, wird später diskutiert. Für acht repräsentativ ausgewählte Gene sollten die über RNAseq ermittelten Transkriptmengen technisch über RT-qPCR Analysen validiert werden. Sechs dieser Gene standen linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung und zwei wiesen das in Abschnitt 3.2.4 beschriebene spezielle Expressionsmuster auf, waren also in den beiden Genotypen Barke und B0004 stärker exprimiert als in den übrigen Genotypen (Abbildung 36a,b). Die RT-qPCR Analysen erfolgten für die identischen RNA-Proben, von denen Teile an den kommerziellen Sequenzierungsanbieter verschickt wurden. Für sieben Gene konnten starke lineare Korrelationen zwischen den *Inncounts* und der ermittelten relativen Quantität identifiziert werden (Abbildung 36).

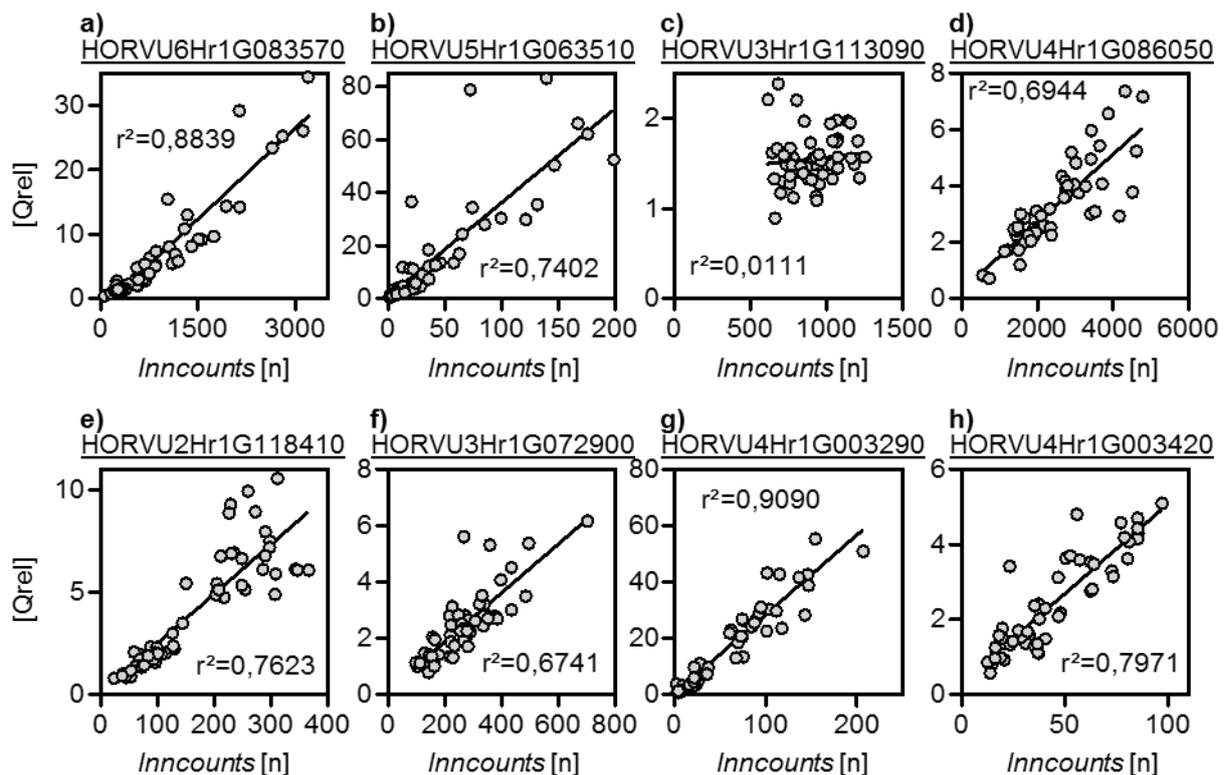


Abbildung 36: Technische Validierung der *Inncounts* von acht ausgewählten Genen. Jeder Datenpunkt zeigt die *Inncounts* in Relation zur relativen Quantität [Qrel] jedes biologischen Replikates. Näheres zu den gezeigten Genen: **a+b)** *Glutamate Receptor 2.8 + 2.7*: (Abschnitt 4.2.9). **c)** *Vacuolar protein sorting-associated protein 55 homolog* (Abschnitt 4.2.1, Abschnitt 4.2.7). **d+f)** *12-oxophytodienoate reductase + Calcyclin-binding protein* (Abschnitt 4.2.11).

e+h) *Plant cysteine oxidase* + *Early-responsive to dehydration stress protein* (im Rahmen dieser Arbeit nicht detaillierter betrachtet) g) *Pyruvat-Kinase* (u.a. folgender Abschnitt).

3.2.6. Biologische Validierung im Jahr 2016

Das als *Pyruvat-Kinase* annotierte Gen HORVU4Hr1G003290 wurde für fortführende Analysen als ein primäres Kandidatengen identifiziert. Die Transkriptmengen dieses Gens konnten in den Proben der acht analysierten Genotypen technisch validiert werden (Abbildung 36g). Es stand unter beiden Wachstumsbedingungen positiv mit der Ertragsstabilität in Verbindung (Abbildung 35a, Tabelle 27) und wies unter allen 142 Genen, die streng linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung standen (Tabelle 27, Tabelle 28), unter anderem die größten prozentualen Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen den ertragsstabilen und den ertragsinstabilen Genotypen auf. Über die *reads* konnten zwei distinkte Genvarianten identifiziert werden, die mit der Transkriptmenge in Verbindung standen (Tabelle 27). Um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen auch auf weitere Genotypen ausgeweitet werden können, wurde die Transkriptmenge in 33 weiteren Genotypen überprüft, die im RGH im Jahr 2016 in einem sehr engen Zeitfenster unter Trockenstress Ährenschieben aufgewiesen hatten (Abbildung 11b). Auch für die acht ursprünglichen Genotypen wurde erneut RNA extrahiert, um den Einfluss verschiedener Extraktionsvorgänge zu überprüfen. Für alle Genotypen wurde außerdem die Genvariante der *Pyruvat-Kinase* bestimmt. Die Verteilung der Genvarianten konnte nicht mit der Zuteilung der Populationscluster in Verbindung gebracht werden (Abbildung 17).

Für die Replikate der acht in den Transkriptomanalysen betrachteten Genotypen wurden starke lineare Zusammenhänge zwischen der Transkriptmenge der neu extrahierten RNA, den *Inncounts* und der Transkriptmenge identifiziert, die bei der technischen Validierung ermittelt wurde (Abbildung 37). Es konnten erneut Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen den Genotypen mit unterschiedlichen Genvarianten identifiziert werden (Abbildung 38). Die Transkriptmenge änderte sich auch signifikant in Proben aus unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Abbildung 38). Es konnte jedoch kein streng linearer, positiver Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge der *Pyruvat-Kinase* und der Ertragsstabilität aller 41 Genotypen identifiziert werden, da auch in Genotypen mit einer niedrigen Ertragsstabilität hohe Transkriptmengen und in Genotypen mit hoher Ertragsstabilität geringe Transkriptmengen gefunden wurden (Abbildung 39a,b). Wurden die Genotypen jedoch auf Basis der Höhe der Transkriptmenge in zwei Gruppen eingeteilt, wiesen die Genotypen mit hoher Transkriptmenge signifikant höhere Werte für die Ertragsstabilität auf (Abbildung 39c).

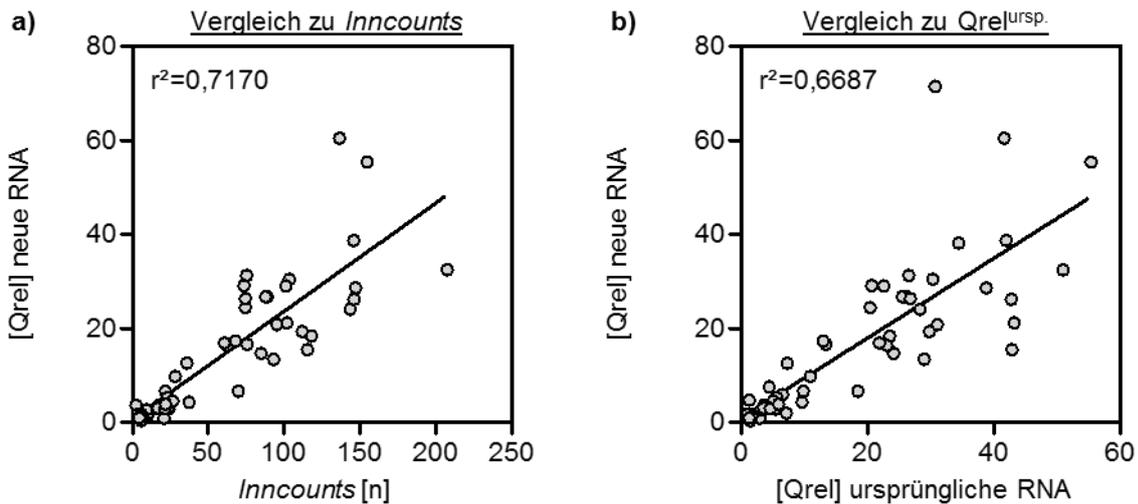


Abbildung 37: Erneute technische Validierung: Einfluss verschiedener Extraktionsvorgänge.

Jeder Datenpunkt zeigt die relative Quantität [Qrel] der *Pyruvat-Kinase* (PK, HORVU4Hr1G003290) von neu extrahierter RNA jedes biologischen Replikates, in Relation zur den Inncounts a) und der Qrel der ursprünglichen RNA b).

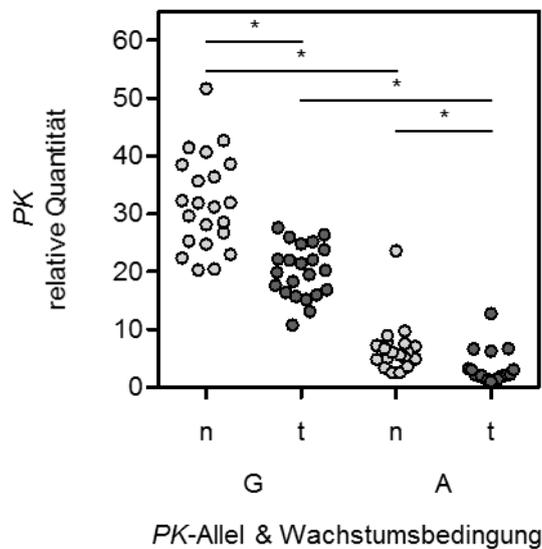


Abbildung 38: Transkriptmenge der *PK* in Blättern von Genotypen gruppiert nach Allelen und Wachstumsbedingungen.

Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert der relativen Transkriptmenge der *PK* von vier biologischen Replikaten eines Genotyps innerhalb einer Wachstumsbedingung (n: bewässert, t: trocken). Die Transkriptmenge wurde durch RT-qPCR-Analysen bestimmt. Der Vergleich zwischen den Wachstumsbedingungen innerhalb eines Allels erfolgte mit einem zweiseitig gepaarten t-Test. Der Vergleich zwischen den Allelen innerhalb einer Wachstumsbedingung erfolgte mit einem zweiseitigen heteroskedastischen t-Tests. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Asterisk (*) markiert.

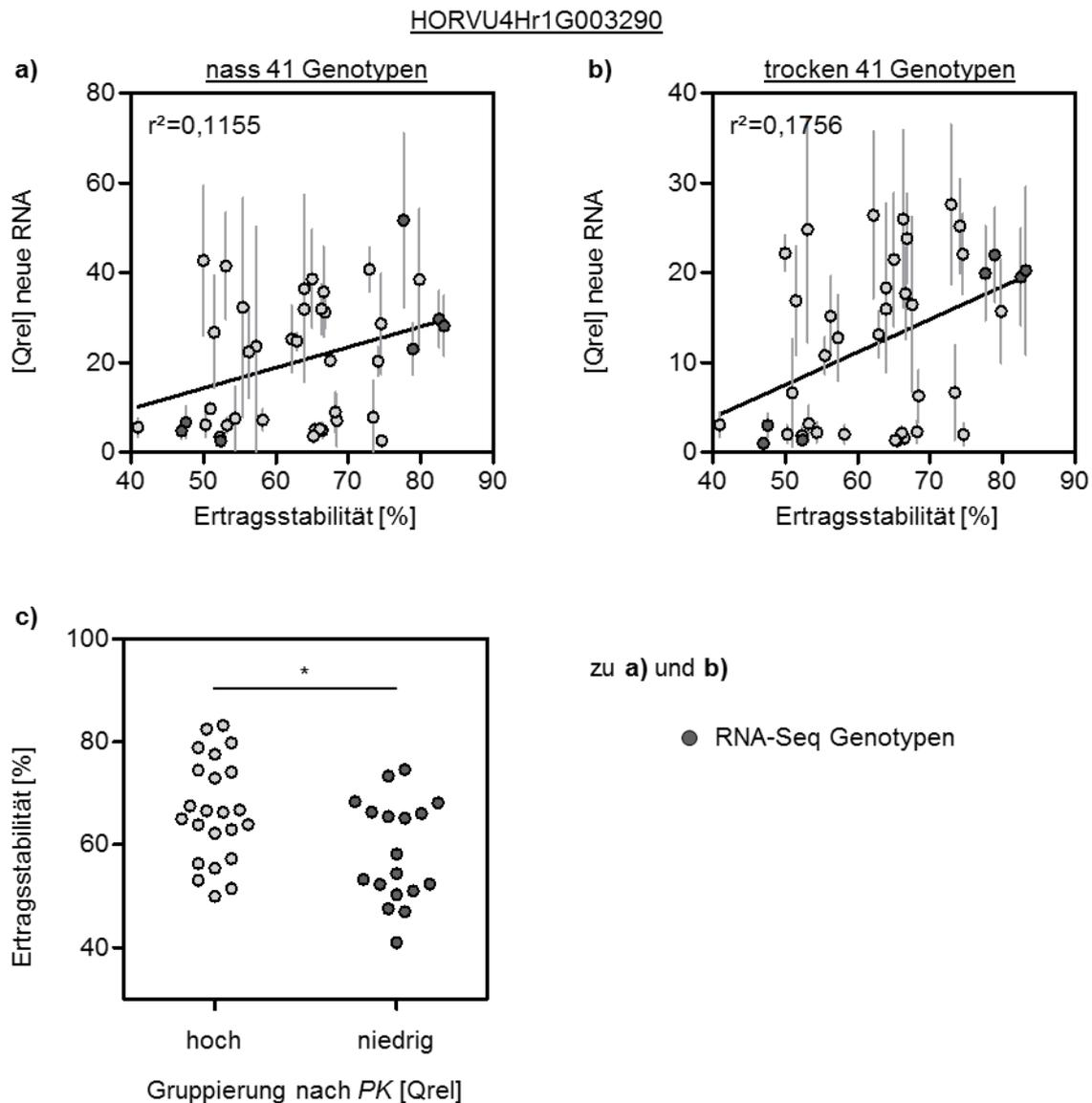


Abbildung 39: Einfluss der PK-Transkriptmenge auf die Ertragsstabilität. a,b) Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert (plus Standardabweichung) der PK-Transkriptmenge eines Genotyps in Relation zur Ertragsstabilität. Markiert sind auch die acht RNAseq-Genotypen. c) Jeder Datenpunkt zeigt die Ertragsstabilität eines Genotyps. Die Genotypen wurden auf Basis der Transkriptmenge der PK in zwei Kategorien eingeteilt. hoch: Qrel>10; niedrig: Qrel<10 (vgl. auch Abbildung 38). Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit einem zweiseitigen heteroskedastischen t-Tests. Signifikante Unterschiede ($p<0,05$) sind mit einem Asterisk (*) markiert.

3.2.7. Biologische Validierung im Jahr 2018

Zuletzt wurden einige Expressionsdaten in einem unabhängigen Experiment validiert. Analysiert wurde das RGH-Experiment aus dem Jahr 2018. In diesem Jahr wurden nur 15

Genotypen angebaut, diese jedoch in größeren Parzellen, wodurch Ertragsdaten zuverlässiger bestimmt werden konnten. Die Anzucht erfolgte erneut unter zwei Wachstumsbedingungen. Die Bodenfeuchte wurde nicht analysiert, das Bewässerungsregime war jedoch mit dem der Jahre 2016 und 2017 vergleichbar. Die Analyse der Proben aus dem Jahr 2018 wurde gegenüber den Proben aus dem Jahr 2017 bevorzugt, da die Ertragsdaten der Jahre 2016 und 2018 vergleichbarer waren als die der Jahre 2016 und 2017 (Tabelle 29). Außerdem waren die Temperaturen vor und während der Probennahme im Jahr 2018 mit denen aus dem Jahr 2016 besser vergleichbar. In den drei Tagen vor der Probennahme war die Tagesdurchschnittstemperatur im Jahr 2017 um durchschnittlich 7,9 °C erhöht, im Jahr 2018 um 4,2 °C. Am Tag der Probennahme war die Tageshöchsttemperatur im Jahr 2017 um 6,9 °C erhöht, im Jahr 2018 um 1,8 °C.

Ertrag 2016	Ertrag 2017		Ertrag 2018
	n: 48	n: 13	n: 13
nass	0,1674	0,0006	0,2628
trocken	0,0710	0,0052	0,4303
Stabilität	0,0243	0,0420	0,4325

Tabelle 29: Vergleich der Ertragsdaten der Jahre 2017 und 2018 zum Jahr 2016. Im Jahr 2018 wurden 15 Genotypen angebaut, von denen 13 auch im Jahr 2016 angebaut wurden. Auf Basis dieser 13 Genotypen wurde der Ertrag unter beiden Wachstumsbedingungen und die Ertragsstabilität verglichen. Für den Vergleich der Jahre 2016 und 2017 ist zusätzlich der Vergleich auf Basis aller 48 Genotypen gezeigt, die in beiden Jahren wuchsen. Gezeigt sind die Bestimmtheitsmaße (r^2) einer linearen Korrelation.

Erneut wurden Fahnenblätter -1 zum Zeitpunkt des Ährenschiebens analysiert. Betrachtet wurden die Expressionswerte von sieben Genen, die bereits im Jahr 2016 technisch validiert wurden (Abschnitt 3.2.5). Für vier Gene konnten im Jahr 2018 lineare Zusammenhänge zu den Expressionswerten des Jahres 2016 identifiziert werden (Abbildung 40d-g). Die Expressionswerte des Gens HORVU3Hr1G113090 konnten ebenso wie bei der technischen Validierung nicht bestätigt werden (Abbildung 40c). Die beiden Gene, die im Jahr 2016 in den beiden Genotypen Barke und B0004 sehr hohe Expressionswerte aufgewiesen hatten, wiesen nur noch im Genotyp Barke und nicht mehr im Genotyp B0004 höhere Transkriptmengen auf als in den übrigen Genotypen (Abbildung 40a,b). Für die *Pyruvat-Kinase* (HORVU4Hr1G003290) konnten die für das Jahr 2018 ermittelten Werte nicht nur mit den Werten der acht RNAseq Genotypen in Verbindung gebracht werden (Abbildung 40g),

sondern auch mit den Werten von zwölf Genotypen, die bei der biologischen Validierung aus dem Jahr 2016 betrachtet wurden (Abbildung 40h).

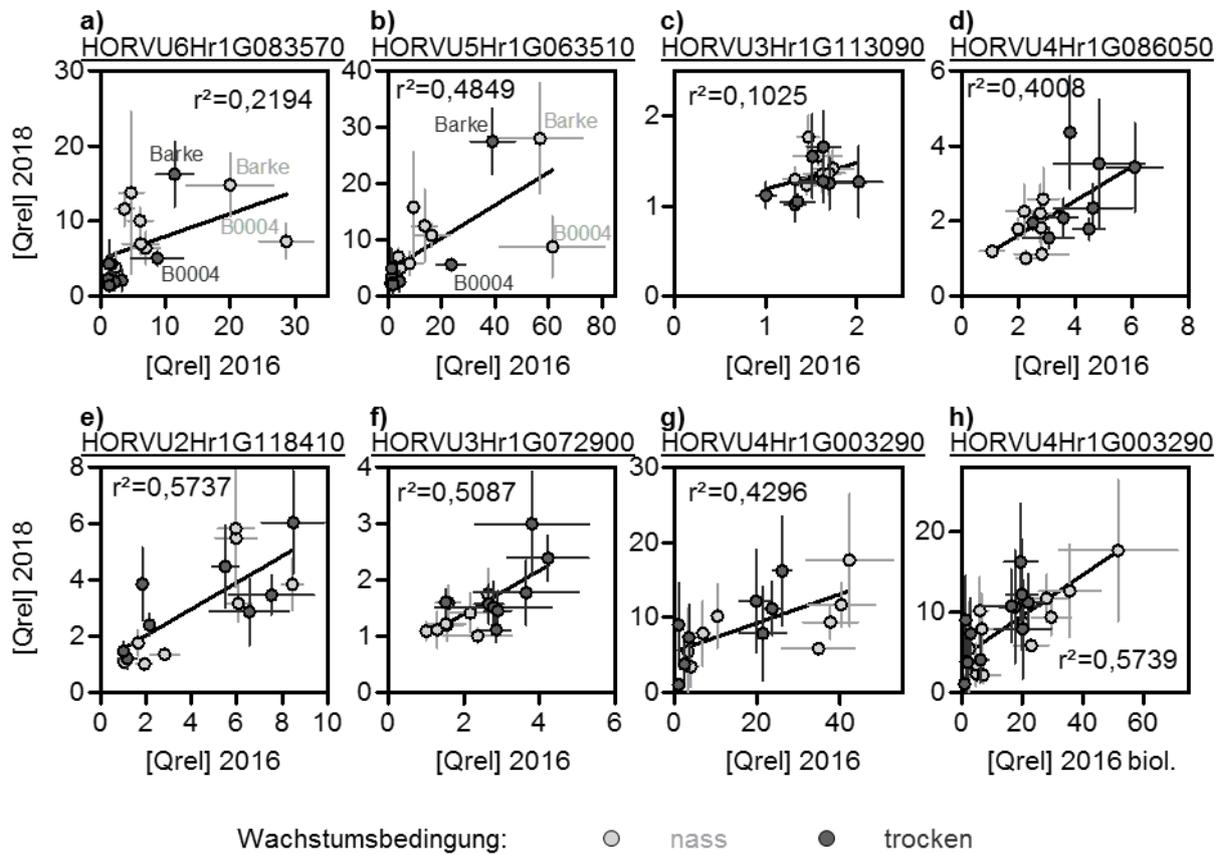


Abbildung 40: Biologische Validierung der Transkriptmengen von sieben Genen. Jeder Datenpunkt zeigt die Mittelwerte (plus Standardabweichung) der Transkriptmenge von allen Replikaten einer Wachstumsbedingung eines Genotyps der Proben aus dem Jahr 2018, in Relation zu den Transkriptmengen aus dem Jahr 2016. **a-g)** Transkriptmenge aus dem Jahr 2016 aus der technischen Validierung für acht Genotypen (vergleiche Abbildung 36). **h)** Transkriptmenge aus dem Jahr 2016 aus der biologischen Validierung für 12 Genotypen (Abbildung 39). Die lineare Korrelation ist für alle Werte gezeigt, unabhängig von der Wachstumsbedingung. Weiters zu den Genen siehe Abbildung 36.

Wurden alle 15 Genotypen betrachtet, konnten die Transkriptmengen nicht linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung gebracht werden (Abbildung 41). Wurden nur die acht Genotypen betrachtet, die über RNAseq Analysen abgedeckt wurden und in denen im Jahr 2016 lineare Zusammenhänge zur Ertragsstabilität identifiziert wurden, konnten nur für die

Pyruvat-Kinase (HORVU4Hr1G023290, Abbildung 41j) und ein weiteres Gen (Abbildung 41f) Assoziationen zur Ertragsstabilität identifiziert werden.

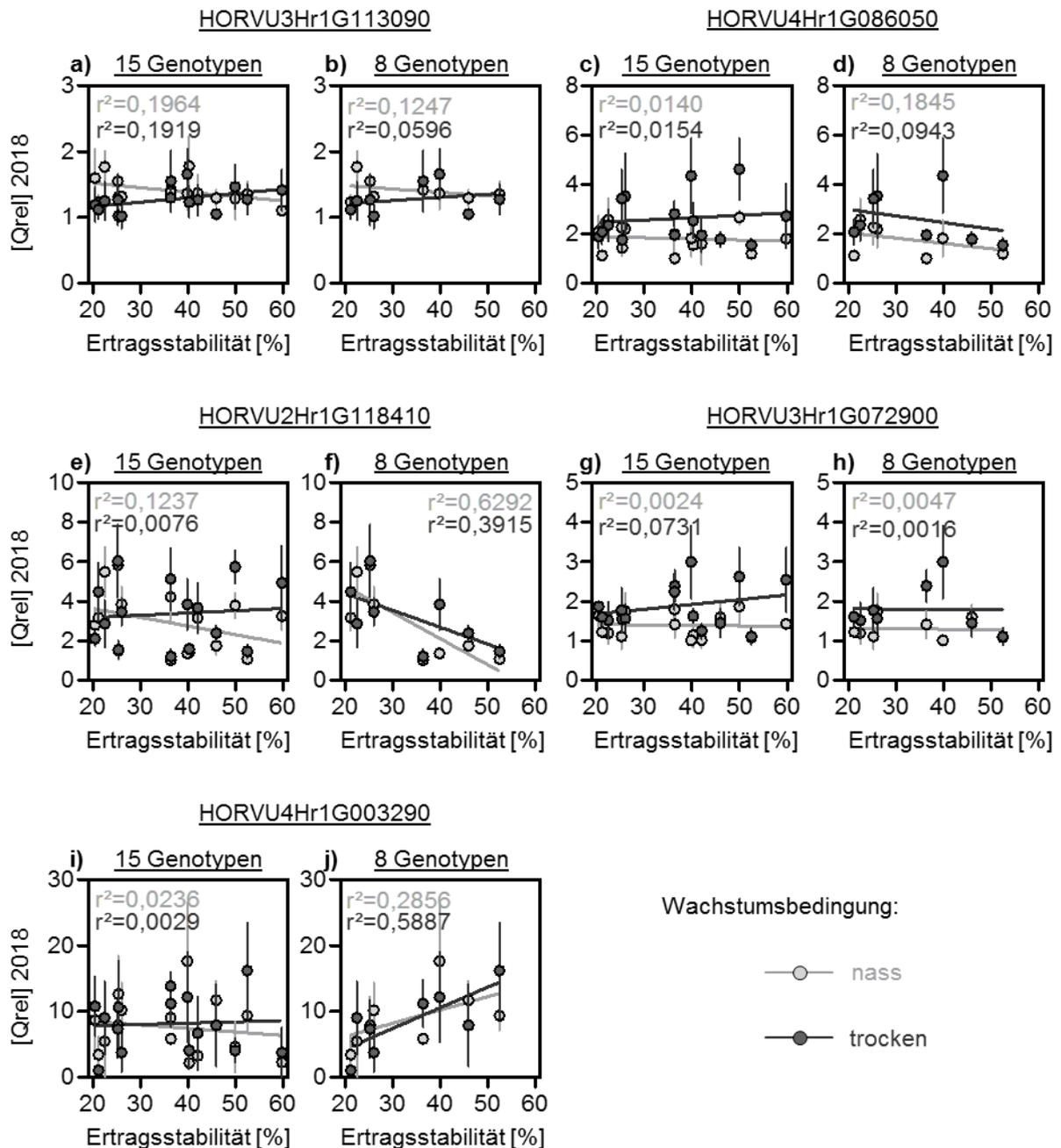


Abbildung 41: Einfluss der Transkriptmenge auf die Ertragsstabilität im Jahr 2018. Für jeden Genotyp ist der Mittelwert (plus Standardabweichung) der Transkriptmenge aller biologischer Replikate gezeigt, in Relation zur Ertragsstabilität. Je Gen sind die Werte für alle 15 Genotypen gezeigt, die im Jahr 2018 wuchsen (links), und nur für die acht Genotypen, die im Jahr 2016 für RNAseq Analysen verwendet wurden (rechts). Weiteres zu den Genen siehe Abbildung 36.

4. Diskussion

4.1. Analysen zum Tocochromanolgehalt

4.1.1. Aufschlüsselung eines Tocopherol-QTLs im Blatt

GWAS zum Tocochromanolgehalt von Nutzpflanzen finden sich unter anderem für Tomate (Almeida et al. 2011), Raps (Marwede et al. 2005, Fritsche et al. 2012, Wang et al. 2012), Mais (Diepenbrock et al. 2017, Shutu et al. 2012, Lipka et al. 2013, Wang et al. 2018), Soja (Li et al. 2010, Shaw et al. 2017), Reis (Sookwong et al. 2009, Wang et al. 2015) und Gerste (Graebner et al. 2015, Templer et al. 2017). Nachfolgende Berichte über die genetische und molekulare Aufschlüsselung der QTLs finden sich seltener (s.u.). In dieser Arbeit sollte der von Templer et al. (2017) identifizierte QTL für den Tocochromanolgehalt in Blättern auf Chromosom 7H (Abbildung 1) validiert werden, da auch ein Zusammenhang zwischen der Fitness der Pflanzen und dem Tocochromanolgehalt identifiziert wurde (Abbildung 2). Da kandidatengenbasierte Ansätze bereits erfolgreich eine Feinkartierung von QTLs unnötig gemacht hatten (Nguyen et al. 2004, Tondelli et al. 2006), wurde die Position des Tocopherol-QTLs mit der Position von Genen im Gerstengenom verglichen (Abbildung 14), von denen bekannt war, dass sie den Tocochromanolgehalt beeinflussen können (Abschnitt 1.5.3). Nur ein Gen, die *HPT-7H*, qualifizierte sich für weitergehende Analysen. Es wurden verschiedene Genvarianten identifiziert, die genetisch an die zuvor identifizierten SNPs gekoppelt waren (Tabelle 10). Die verschiedenen Allele konnten mit Unterschieden im Tocopherolgehalt in Verbindung gebracht werden, nicht jedoch mit Unterschieden im Tocotrienolgehalt (Tabelle 11). Deshalb wurde angenommen, dass die *HPT-7H* die Determinante ist, die für die Ausbildung des QTLs in den Analysen von Templer et al. (2017) und den in dieser Arbeit identifizierten QTLs (Tabelle 9) verantwortlich war.

In einem nächsten Schritt sollten die Ursachen identifiziert werden, warum die verschiedenen *HPT-7H*-Allele Unterschiede im Tocochromanolgehalt vermitteln. Die Analyse der SNP-Muster hatte gezeigt, dass im Barke-Allel SNPs einen K60E und einen S358N Aminosäureaustausch in der vorhergesagten Primärsequenz des translatierten Proteins verursachen (Abbildung 15). Im Bowman-Allel kann von einem A388T Aminosäureaustausch ausgegangen werden. Das Morex- und das Umbrella-Allel waren mit den höchsten bzw. den niedrigsten Tocopherolwerten assoziiert (Tabelle 11), wiesen jedoch eine identische vorhergesagte Primärsequenz auf (Abbildung 15). Die Unterschiede im Tocopherolgehalt von Genotypen mit dem Morex- und dem Umbrella-Allel konnten damit nicht auf eine veränderte Funktion des Proteins zurückzuführen sein.

Deshalb wurde in ausgewählten Genotypen die Transkriptmenge der *HPT-7H* analysiert. In Genotypen mit verschiedenen Genvarianten konnten distinkte Transkriptmengen identifiziert

werden (Abbildung 19), die darüber hinaus linear mit dem Tocochromanolgehalt in Verbindung standen (Tabelle 13). Der Gehalt der Tocochromanole war in beiden Versuchsjahren in Pflanzen höher, die unter Trockenstress aufgewachsen waren (Tabelle 12). Da die Transkriptmenge der *HPT-7H* auch in beiden Versuchsjahren durch Trockenstress stieg (Abbildung 19) und stets mit dem Tocochromanolgehalt assoziiert war (Tabelle 13), wurde vermutet, dass die trockenstressvermittelte Induktion der *HPT-7H*-Expression den Anstieg der Tocochromanolakkumulation verursachte.

Durch biotechnologische Veränderungen in Überexpressions-, Repressions- und Deletionsgenotypen in verschiedenen Pflanzenarten ist bekannt, dass die Transkriptmenge von Strukturgenen der Vitamin E Biosynthese Einfluss auf den Tocochromanolgehalt nehmen kann (siehe z.B. Zusammenstellungen in Fritsche et al. 2017). Ebenso wurde ein Anstieg des Tocochromanolgehalts durch abiotischen Stress bereits mehrfach in verschiedenen Pflanzenarten beobachtet (Abschnitt 4.1.6). Berichte, dass Umweltbedingungen, verschiedene Entwicklungsstadien oder genetische Variationen natürlicherweise die Expression von Strukturgenen der Tocochromanolbiosynthese beeinflussen und damit den Gehalt der Tocochromanole verändern, finden sich in der Literatur seltener. In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) wurde gezeigt, dass das Phytohormon Jasmonsäure, das die Seneszenz von Pflanzengewebe fördern kann, die Expression einer *Tyrosin-Aminotransferase* (*TAT*) erhöhen kann, was eine Akkumulation von γ -Tocopherol verursachte (Sandorf & Holländer-Czytko 2002). Falk et al. (2002) berichteten, dass in Gerste die Transkriptmenge der *4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase* (*HPD*) stieg, nachdem Blätter extern mit Methyljasmonat, einem Methyl ester der Jasmonsäure, versorgt wurden, dem Phytohormon Ethen ausgesetzt wurden oder direkt oxidative Schäden durch Applikation von H_2O_2 induziert wurden. Auch in Mangopflanzen (*Mangifera indica* L.) konnte gezeigt werden, dass die *HPD*-Aktivität durch Ethen induziert werden kann, was laut Singh et al. (2011) direkt in einem Anstieg des Tocopherolgehalts in Blättern resultierte. GWAS und RNAseq-Analysen ließen Diepenbrock et al. (2017) darüber hinaus schlussfolgern, dass in Mais (*Zea mays* L.) der Vitamin E Gehalt durch genotypspezifische Unterschiede in der Aktivität von einigen Tocochromanolbiosynthesestrukturgenen beeinflusst wird. Für den Tocopherolgehalt von reifen Tomatenfrüchten von Introgressionslinien von domestizierten Tomatensorten (*Solanum lycopersicum* L.) und wilden Tomatensorten (*Solanum pennellii* CORRELL) konnte ebenso ein QTL identifiziert werden (Almeida et al. 2011). Später zeigte sich, dass dieser QTL auf verschiedene Epiallele einer *MPBQ-MT* zurückzuführen ist, die den ursprünglichen Tomatenarten entsprangen und durch epigenetische Regulation unterschiedliche Genaktivität aufwiesen, wodurch sie den Tocopherolgehalt beeinflussten (Quadrana et al. 2014). Basierend auf 137 Reisgenotypen (*Oryza sativa* L.) identifizierten

Wang et al. (2015) QTLs und schlussfolgerten, dass Unterschiede im Promotorbereich einer γ TMT mit gesteigerter Genaktivität in Verbindung gebracht werden können, die mit einem erhöhten Gehalt von α -Tocopherol einhergingen. Ähnlich den Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, identifizierten demnach Diepenbrock et al. (2017), Quadrana et al. (2014) und Wang et al. (2015) natürlich vorkommende Variationen in Genen der Tocochromanolbiosynthese, die mit unterschiedlichen Genaktivitäten in Verbindung standen und den Vitamin E Gehalt beeinflussten. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass unterschiedliche Allele nicht nur unterschiedliche Grundaktivitäten (Genaktivität unter Kontrollbedingungen) vermittelten, sondern auch unterschiedlich stark durch abiotische Stressfaktoren aktiviert werden können (Abbildung 19) und somit die Akkumulation von Tocochromanolen beeinflussen.

Da Wang et al. (2015) Unterschiede in der Promotorstruktur mit Unterschieden in der Aktivität der *O γ TMT* in Verbindung bringen konnten, sollte dies auch für die *HPT-7H* untersucht werden. Es wurden Bindestellen für MYB- und *ethylene response* Transkriptionsfaktoren (TF) identifiziert, die prinzipiell die Steigerung der Genaktivität unter Trockenstress erklären könnten (Erläuterungen zu den TFs z.B. in Ambawat et al. 2013, Müller & Munné-Bosch 2015). Da Promotorbereiche des Umbrella-Allels nicht sequenziert werden konnten und das Bowman-Allel eine große Deletion aufwies (Abbildung 15) konnten Unterschiede in den Bindestellen der verschiedenen Allele nicht aussagekräftig interpretiert werden. Details zu diesen Analysen finden sich deshalb nur an anderer Stelle (Schuy et al. 2019).

4.1.2. Weitere QTLs zum Tocochromanolgehalt in Gerste

Um die Tocochromanolbiosynthese in Gerste weiter aufzuschlüsseln, wurde die Position der im Gerstengenom verankerten Gene (Abbildung 14), noch mit weiteren QTLs verglichen, die für den Tocochromanolgehalt in Gerste bekannt sind. Templer et al. (2017) identifizierten für den α -Tocopherolgehalt von Pflanzen, die unter gut bewässerten Bedingungen aufgewachsen waren, drei weitere QTLs, die in der Nähe von Strukturgenen der Tocochromanolbiosynthese kartiert worden waren. Assoziiert war ein SNP-Marker auf Chromosom 3H bei 146,1 cM neben der *MPHQ-MT* bei 148,2 cM, ein SNP-Marker auf Chromosom 6H bei 49,2 cM neben der *HPD* bei 52,8 cM und acht SNP-Marker auf Chromosom 5H zwischen 44,5-51,6 cM neben einer *MPHQ-MT* bei 43,8 cM. Sechs dieser acht Marker auf Chromosom 5H waren auch mit dem Gehalt von Gesamt-Tocopherol assoziiert (Templer et al. 2017). In dieser Arbeit wurden ebenso GWAS für den Tocochromanolgehalt im Blatt durchgeführt. Neben den Markern, die im Kontext der *HPT-7H*

untersucht wurden, fanden sich noch zwei Marker, die auf Chromosom 7H nahe der *HGGT* kartierten (Tabelle 9). In dieser Studie wurden auch GWAS zum Tocochromanolgehalt in reifen Körnern durchgeführt. Die zehn assoziierten Marker wurden auf Chromosom 6H zwischen 53,9 - 55,0 cM verankert und befinden sich somit in der Nähe der *HPD* und einer *MPHQ-MT* (Abschnitt 3.1.11). Für den Tocochromanolgehalt in reifen Körnern von Gerste hatten auch Graebner et al. (2015) QTLs identifiziert. Sie kartierten einen QTL für den Gehalt von γ -Tocotrienol nahe der γ *TMT* auf Chromosom 6H und diverse QTLs für den Gehalt aller vier Tocotrienolarten, für den Gehalt von δ - und γ -Tocopherol und für den Gehalt von Gesamt-Tocotrienol und Gesamt-Tocochromanol in der Region auf Chromosom 7H, in der die *HPT-7H* und die *HGGT* kodiert sind.

Für die genannten Gene wurde die Variabilität anhand der WGS_contigs der Genotypen Morex, Barke und Bowman abgeschätzt. Nur für den *HGGT*-Genort konnten Hinweise auf genetische Variation identifiziert werden, die eine genauere Untersuchung rechtfertigten. Deshalb wurde die genetische Variation der in dieser Arbeit betrachteten Genotypen bestimmt (Abbildung 22). Auf Grund der Nähe auf Chromosom 7H war die Verteilung der *HPT-7H*- und *HGGT*-Allele nicht zufällig, sondern deutete auf eine Kopplung der Genorte hin (Tabelle 15). Für die Körner der Pflanzen, die im Jahr 2016 im RGH wuchsen, konnten Unterschiede im Tocochromanolgehalt identifiziert werden, wenn Genotypen basierend auf verschiedenen *HGGT*-Allelen gruppiert wurden (Tabelle 16). Somit können die von Graebner et al. (2015) identifizierten QTLs für den Tocotrienolgehalt als validiert angesehen werden. Einflüsse verschiedener *HPT-7H*-Allele auf den Tocochromanolgehalt in reifen Körnern konnten nicht identifiziert werden (Tabelle 12). Die geringere Anzahl der Genotypen (57) im Vergleich zu den Analysen von Graebner et al. (2015) (1466 Genotypen) könnte die Diskrepanz in der Ausprägung einer statistischen Signifikanz erklären.

4.1.3. Verteilung der Tocochromanolarten

Während der Biosynthese akkumulieren die Benzoquinon-Intermediate nicht in nennenswerten Mengen (Porfirova et al. 2002). Der Substratfluss zwischen den einzelnen Vitamin E Varianten ist jedoch nicht gesättigt, d.h. die unterschiedlichen Tocochromanolarten akkumulieren in unterschiedlichen Pflanzenarten, Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in planta* in unterschiedlichen Verhältnissen (Gliszczyńska-Świgło et al. 2007, Lizarazo et al. 2010). Dies wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. Sowohl in Blättern (Tabelle 7), reifen Körnern (Tabelle 14) und unreifen Körnern (Tabelle 18, Tabelle 19) konnten substantielle Mengen der γ -Tocochromanolarten detektiert werden. Dabei war das Verhältnis in reifen Körnern stärker zu den γ -Formen verschoben als in Blättern. In unreifen

Körnern konnte direkt eine Veränderung der Verhältnisse in verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet werden (Abbildung 27). Dies deutete darauf hin, dass es in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien zu einer Limitierung in der Umsatzrate von den γ - zu den α -Tocochromanolarten gekommen ist, limitiert durch die Aktivität der γ -Tocopherol-Methyltransferase (γ TMT) (Abbildung 6). Vergleichbare Beobachtungen wurden bereits in transgenen Arabidopsis-Pflanzen gemacht, in denen die künstliche Überexpression der *AtHPT* die Komposition des Tocopherolgehalts hin zum γ -Tocopherol verschob, ein Phänotyp, der durch die simultane Überexpression der *At γ TMT* wieder revidiert werden konnte (Collakova & DellaPenna 2003). Ein starker Substratfluss am Beginn der Biosynthese kann demnach einen Substratstau am Ende erzeugen. Dies erklärt auch, warum in Blättern durch eine trockenstressvermittelte Steigerung der *HPT-7H*-Aktivität, γ -Tocopherol prozentual stärker akkumuliert als α -Tocopherol (Tabelle 12). In Samen von Arabidopsis akkumuliert hauptsächlich γ -Tocopherol, d.h. auch dort ist der Substratfluss zum α -Tocopherol beschränkt, kann aber ebenso durch biotechnologische Expression der *At γ TMT* künstlich verschoben werden (Shintani & DellaPenna 1998). Dass es in Körnern von Getreiden vermehrt zu einer Limitierung der γ TMT-Aktivität kommen kann, zeigten auch Metabolitmessungen von reifen Körnern anderer Getreidearten wie Roggen, Weizen, Hafer, Dinkel und Reis (Panfili et al. 2003, Gónas et al. 2015). Die Analyse unreifer Körner legte jedoch nahe, dass die γ TMT-Aktivität in Gerste nicht während der gesamten Kornentwicklung limitiert ist. In den frühen analysierten Entwicklungsstadien war die γ TMT-Aktivität offenbar zunächst sehr limitiert, nahm dann aber zu (Abbildung 27). In späteren, hier nicht abgedeckten Entwicklungsstadien muss sie jedoch wieder abnehmen, um die großen Mengen der γ -Formen in reifen Körnern zu erklären (Tabelle 14). Ein weiterer Hinweis für die Relevanz der γ TMT ist der von Graebner et al. (2015) identifizierte QTL für den γ -Tocotrienolgehalt in reifen Körnern nahe der *γ TMT*.

Neben dem Verhältnis der γ - zu α -Formen war auch der Verlauf der Tocochromanole in unreifen Körnern interessant. Trotz der Zunahme des Korngewichts stieg der Gehalt von α -Tocopherol und damit von Gesamt-Tocopherol nicht (Abbildung 26c,e). Falk et al. (2004) seziierten reife Gerstenkörner und stellten fest, dass Tocopherole primär im Embryo und Tocotrienole hauptsächlich im Endosperm akkumulierten, eine Beobachtung die auch in Hafer (Peterson 1995, Gutierrez-Gonzalez et al. 2013) und Reis gemacht wurde (Jeng et al. 2012). In Anlehnung an diese Beobachtung wird folgendes Modell postuliert: Die Tocopherole akkumulierten im Embryo in noch früheren, als den hier beobachteten Entwicklungsstadien und wurden dann auf einem konstanten Niveau gehalten. Da der Embryo während der Kornentwicklung (siehe z.B. Sreenivasulu et al. 2010) wenig Masse zulegte, vor allem im Vergleich zum wachsenden Endosperm, nahm auch die Gesamtmasse

der Tocopherole nicht zu (Abbildung 26c,e). Da primär das Endosperm gewachsen ist, in dem die Tocopherole nicht in nennenswerten Mengen akkumulierten (Falk et al. 2004), sank ihr Massenanteil an der Gesamtmasse im Verlauf des Kornwachstums (Abbildung 26d,f). Da die Gesamtmasse der Tocopherole nicht zunahm (Abbildung 26c,e), musste die Rate der Biosynthese nur so hoch sein, dass eventuelle Degradationsprozesse ausgeglichen wurden, weshalb, anders als im Blatt (Abbildung 20, Abbildung 21), die *HPT-7H*-Transkriptmenge nicht limitierend für die Tocopherolmenge war (Abbildung 29c). Die Beschränkung der Tocopherolbiosynthese auf den Embryo kann auch erklären, weshalb die Transkriptmenge der *HPT-7H* unverändert blieb (Abbildung 28c), aber ebenso wie die Tocopherole (Abbildung 26d,f) stark exponentiell sank, wenn sie mit dem Kornalter verrechnet wurde (Abbildung 28d). Die Beschränkung auf verschiedene Gewebe innerhalb des Kornes könnte auch den Verlauf der Tocotrienole erklären. Die Massenanteile von α - und damit Gesamt-Tocotrienol stiegen linear (Abbildung 25d,f), folglich akkumulierte zusätzlich zum Wachstum des Endosperms ständig mehr Tocotrienol, weshalb es zu einer exponentiellen Zunahme der Gesamtmasse der Tocotrienole kam (Abbildung 25a,c,e). Die stetige Biosynthese der Tocotrienole war dabei schwach durch die Transkriptmenge der *HGGT* limitiert (Abbildung 29a), obwohl diese in älteren Körnern sogar schwach zunahm (Abbildung 28). Das Wachstum des Endosperms, in dem primär Tocotrienole akkumulierten, verschob letztlich das Verhältnis von Tocopherolen zu Tocotrienolen (Abbildung 27c), sodass in reifen Körnern letztlich mehr Tocotrienole statt Tocopherole detektiert wurden (Tabelle 14).

Im reifen Korn schien die Tocopherol- und die Tocotrienolbiosynthese räumlich getrennt aktiv zu sein (s.o.). Im Rahmen dieser Arbeit gab es zwei Hinweise, dass im Blatt beide Biosynthesewege in Konkurrenz stehen könnten. Die Ausprägung von einigen Markern, die mit dem Tocopherolgehalt assoziiert waren (Tabelle 8), war negativ mit dem γ -Tocotrienolgehalt assoziiert (Abschnitt 3.1.2). Während die *HPT-7H*-Transkriptmenge stets positiv mit dem Tocopherolgehalt assoziiert war, war sie teilweise negativ mit dem α -Tocotrienolgehalt assoziiert (Tabelle 13). Der einzige spezifische Unterschied in der Biosynthese beider Metabolitgruppen geht auf die beiden Enzyme HPT und HGGT zurück, die während der Kondensation mit Homogentisat (HGA) gegenüber dem gesättigten Phytyl-Pyrophosphat und dem ungesättigten Geranylgeranyl-Pyrophosphat unterschiedliche Affinitäten aufweisen (Yang et al. 2010), wobei beide Prenylverbindungen direkt über eine Geranylgeranyl-Diphosphat-Reduktase in Verbindung stehen (Keller et al. 1998). Eine stark aktive Tocopherolbiosynthese könnte die Edukte für die Tocotrienolbiosynthese limitieren, wobei keine weiteren Hinweise dafür in der Literatur gefunden wurden. Selbst die biotechnologische Expression der Gerste *HGGT* in *Arabidopsis* hatte keinen negativen Einfluss auf die Tocopherolakkumulation (Cahoon et al. 2003).

4.1.4. Kein Einfluss auf die Fitness der Pflanzen im RGH

Die Analysen von Templer et al. (2017) zeigten, dass unter Trockenstress Genotypen mit einem gesteigerten γ -Tocopherolgehalt ein erhöhtes Korngewicht aufgewiesen hatten (Abbildung 2). Dies konnte im RGH in keinem der beiden Versuchsjahre beobachtet werden (Abbildung 30). Auch die Analyse weiterer Wachstumsparameter, anderer Tocochromanolarten und die dynamischen Veränderungen der Werte zwischen den Wachstumsbedingungen offenbarten keine eindeutigen Hinweise, dass Genotypen, die vermehrt Tocochromanole akkumulieren, eine gesteigerte Fitness aufwiesen. Im Umkehrschluss konnten auch keine Hinweise gefunden werden, dass Genotypen mit niedrigen Tocochromanolwerten eine geringere Fitness aufwiesen. Wie einführend dargestellt (Abschnitt 1.2) können Pflanzen mit einem komplexen Geflecht physiologischer, zellulärer und biochemischer Mechanismen auf Trockenstress reagieren. So ist auch bekannt, dass der Verlust der Vitamin E-Biosynthese ansatzweise mit einer gesteigerten Akkumulation von Vitamin C kompensiert werden kann (Munné-Bosch 2005). Der Einfluss jedes einzelnen Parameters auf die Fitness der Pflanzen kann schwer zu erkennen sein und unterscheidet sich vermutlich von Genotyp zu Genotyp.

Der von Templer et al. (2017) dargestellte Zusammenhang (Abbildung 2) fand sich auch nur in den zentraleuropäischen Elitelinien, nicht aber in den an Trockenheit und Hitze angepassten mediterranen Linien. Templer et al. (2017) diskutierten, dass die Elitelinien, die für den Anbau in gemäßigten Breiten gezüchtet wurden, womöglich primär auf hohe Ertragsleistung und nicht zwangsläufig auf ein Wachstum unter widrigen Bedingungen gezüchtet wurden, weshalb eine Akkumulation von Tocochromanolen in diesen Genotypen stärker Einfluss auf die Fitness der Pflanzen haben könnte, als in Genotypen, die auch andere Adaptionsmechanismen effektiv nutzen können. Womöglich konnte deshalb in diesen Genotypen ein positiver Einfluss detektiert werden. Unter den im RGH applizierten Wachstumsbedingungen schien die Tocochromanolakkumulation jedoch nicht für die europäischen Elitelinien oder irgendeine andere Gruppe der Genotypen limitierend für die Fitness der Pflanzen gewesen zu sein.

4.1.5. Tocochromanolakkumulation im RGH als Reaktion auf Stress

Verschiedene Erklärungen für die Diskrepanz zu den Beobachtungen von Templer et al. (2017) können diskutiert werden. Zunächst ist jedoch festzuhalten, dass die Tocochromanole auch im RGH zumindest einen Anteil in der Stressadaptation gespielt haben müssen. Der trockenstressvermittelte Anstieg im Tocochromanolgehalt (Tabelle 12), der im Fall der

Tocopherole durch die Induktion der *HPT-7H* vermittelt wurde (Abbildung 19), stand streng mit stressvermittelten Ertragseinbrüchen in Verbindung (Abbildung 31). So wurden für die Pflanzen, die im zweiten Versuchsjahr unter gut bewässerten Bedingungen gewachsen waren, Ertragsparameter beobachtet, die mit den Ertragsparametern der Pflanzen vergleichbar waren, die im ersten Versuchsjahr unter Trockenstress aufgewachsen waren (Abbildung 9). Für diese Pflanzen wurden ebenso vergleichbare Tocochromanolwerte gemessen (Tabelle 12). Da die Wasserverfügbarkeit in beiden Jahren vergleichbar war (Abbildung 7), wird postuliert, dass die gesteigerten Temperaturen im Jahr 2017 (Abbildung 8) für die Pflanzen ebenso einen Stressfaktor darstellten, der das Wachstum einschränkte (Abbildung 9). Im direkten Vergleich zum Jahr 2016 herrschte im Jahr 2017 demnach Hitzestress und kombinierter Trocken- und Hitzestress. Je höher das Stressniveau war, desto mehr Tocochromanole wurden gebildet, wobei der Gehalt von γ -Tocopherol prozentual am stärksten Anstieg (Tabelle 12). Eine durch Hitzestress ausgelöste Akkumulation von Tocochromanolen wurde in einigen Pflanzenarten (siehe Zusammenstellungen in Hasanuzzaman et al. 2014) und unter anderem in Gerste bereits beobachtet (Templer et al. 2017).

Trotz des erhöhten Stressniveaus im Jahr 2017 konnten die Beobachtungen von Templer et al. (2017) nicht reproduziert werden. Dies könnte auf Unterschiede in der Amplitude und der Frequenz der Stressapplikation zurückzuführen sein. In den Klimakammerexperimenten von Templer et al. (2017) wuchsen alle Pflanzen zunächst unter moderaten Temperaturen und mit ausreichender Wasserversorgung auf. Zur Blüte wurden einige Töpfe einem strengen Wasserentzug ausgesetzt und andere Töpfe zusätzlich in Hitzekammern transferiert. Die Pflanzen erfuhren in wenigen Tagen eine drastische Reduktion der Wasserverfügbarkeit und sofort eine gesteigerte Temperatur (Templer et al. 2017). Die Messungen der Bodenfeuchte im RGH deuten darauf hin, dass die Wasserverfügbarkeit über einen größeren Zeitraum graduell abnahm (Abbildung 7) und die Temperatur regelmäßigen Schwankungen unterlag (Abbildung 8). Im RGH hatten die Pflanzen länger Zeit sich an widrige Wachstumsbedingungen anzupassen. Die Pflanzen im RGH waren demnach anders durch den Stress beeinflusst als die Pflanzen in Klimakammern, was sich auch am γ -Tocopherolgehalt ablesen lässt. γ -Tocopherol ist die Tocochromanolart, deren Gehalt am sensitivsten auf einen stressvermittelten Anstieg der Biosynthese reagierte (s.o.). In den 16 Genotypen, die sowohl von Templer et al. (2017), als auch im RGH analysiert wurden, stieg der γ -Tocopherolgehalt in Klimakammerexperimenten von durchschnittlich 1,02 ng/mgFG auf 9,13 ng/mgFG (Trockenstress) bzw. 22,72 ng/mgFG (Hitze- und Trockenstress), im RGH nur von 0,64 ng/mgFG auf 1,06 ng/mgFG (2016) und von 1,34 ng/mgFG auf 6,36 ng/mgFG (2017). Somit vermittelte das stärkste Stressniveau im RGH einen geringeren Anstieg als

das schwächste Stressniveau in den Klimakammerexperimenten. Der applizierte Stress im RGH könnte nicht stark genug gewesen sein, die positiven Effekte der Tocochromanolakkumulation quantitativ aufzuzeigen. Munné-Bosch (2005) und di Toppi et al. (2012) berichteten außerdem, dass die stressvermittelte Tocopherolakkumulation in zwei Phasen aufgeteilt werden kann, d.h. nach einem initialen Anstieg kann es auch wieder zu einer deutlichen Abnahme im Gehalt kommen, wenn weitere Adaptionsmechanismen aktiviert werden. Demnach könnte ein hoher Tocochromanolgehalt vor allem bei rapide auftretenden Stressszenarien einen Wachstumsvorteil vermitteln und dies insbesondere in Genotypen, die anderweitig weniger gut befähigt sind darauf zu reagieren.

4.1.6. Tocopherolvermittelte Stresstoleranz

Dass Tocochromanole die Stressresistenz verbessern, wird in der Literatur häufig diskutiert (siehe auch Abschnitt 1.5.2). Dabei gilt es jedoch zwischen Berichten zu unterscheiden, die einen stressvermittelten Anstieg im Metabolitgehalt beobachtet haben und deshalb vermuteten, dass dieser für die Adaption relevant sein könnte, und Berichten, die direkt verbesserte Wachstumseigenschaften identifizieren konnten, wenn der Tocochromanolgehalt verändert war.

Über trockenstressvermittelte Anstiege berichteten z.B. Tanaka et al. (1990) und Moran et al. (1994) in Erbsen, Price et al. (1989) und Bartoli et al. (1999) in Weizen und anderen Getreiden, Munné-Bosch et al. (1999) in Rosmarin, Munné-Bosch und Alegre (2001) in Lavendel oder auch Hernández et al. (2004) in Zistrosen (*Cistus clusii* DUNAL) und Cela et al. (2009) in Eiskraut (*Aptenia cordifolia* (L.f.) SCHWANTES). Im Gegensatz dazu konnte in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) unter Trockenstress die Überexpression einer *Tocopherolcyclase* direkt mit einer geringeren Lipidperoxidation, H₂O₂-Akkumulation, einem geringeren Elektrolytverlust und einem erhöhten Chlorophyllgehalt assoziiert werden (Liu et al. 2008). Die Überexpression einer *HPT* vermittelte in Tabak ebenso eine gesteigerte Trockenstresstoleranz (Espinoza et al. 2013). Eine durch *RNA-Silencing* verringerte *HPT*-Aktivität vermittelte hingegen eine verringerte Toleranz gegenüber osmotischem Stress (Abbasi et al. 2007). Brauner Senf (*Brassica juncea* (L.) CZERN.) wies durch eine γ *TMT*-Überexpression erhöhte Resistenz gegenüber Salzstress (Aslam et al. 2010) und osmotischem Stress auf (Kumar et al. 2013). In Reis konnte eine erhöhte bzw. verringerte Salztoleranz für Pflanzen nachgewiesen werden, wenn Gene der Tocopherolbiosynthese überexprimiert bzw. deletiert wurden (Ouyang et al. 2011). Farouk (2011) berichtet von gesteigerter Resistenz von Weizenpflanzen gegenüber Salzstress, wenn Blätter mit α -Tocopherol besprüht wurden.

Berichte über eine gesteigerte Fitness der Pflanzen durch erhöhte Tocochromanolwerte finden sich demnach vor allem dann, wenn Stress rapide und intensiv appliziert wird oder der Tocochromanolgehalt sehr deutlich verändert wurde, z.B. durch Deletion, Repression oder Überexpression von Strukturgenen der Biosynthese. Auch wird vor allem von positiven Einflüssen auf molekulare Eigenschaften, der Pflanzen berichtet und seltener von Einflüssen auf makroskopische Eigenschaften, geschweige denn auf Ertragsparameter. Auch in Gerste konnten Einflüsse auf molekulare Parameter beobachtet werden. In parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Klimakammerexperimenten hatte der Gehalt, und vor allem der stressvermittelte Anstieg der Tocochromanole, einen deutlichen, positiven Einfluss auf den Chlorophyllgehalt und die Membranstabilität (Eydam 2018).

4.1.7. Jenseits der Pflanzenfitness

Per Definition sind Vitamine ein essenzieller Teil der Ernährung. Neben den förderlichen Einflüssen für das Pflanzenwachstum (s.o.), können die gesteigerten Vitamin E Level im grünen Gewebe der Gerstenpflanzen jedoch für die menschliche Ernährung nur schwerlich als relevant eingestuft werden (Schuy et al. 2019). Laut Newman und Newman (2008) und Zhou (2010) werden über 60 % der geernteten Biomasse der Gerste in Form von Heu oder Stroh nach dem Dreschen als Futtermittel eingesetzt. *In vitro* Tests hatten gezeigt, dass die antioxidativen Eigenschaften der verschiedenen Tocochromanolarten vergleichbar sind (Müller et al. 2010). Bei der Aufnahme aus der Nahrung wird die Sekretion der Tocochromanole aus Hepatozyten (Leberepithelzellen) ins Blutplasma von einem als α -Tocopherol-Transferase-Protein designierten Protein vermittelt (Manor & Morley 2007). Es weist gegenüber dem namensgebenden α -Tocopherol die höchste, gegenüber den anderen Tocochromanolarten verringerte Affinitäten auf und bestimmt dadurch die physiologische Vitamin E Aktivität der verschiedenen Arten (siehe Rigotti 2007 für weitere Details zur Affinität und Verteilung der Vitamin E Formen im Säugetiersystem). Demnach können die durch das Morex-*HPT-7H*-Allel vermittelten gesteigerten α -Tocopherollevel in Blättern als Qualitätskriterium der Gerstenpflanzen als Futtermittel angesehen werden.

Auch gesteigerte Vitamin E Level in reifen Körnern stellen ein Qualitätskriterium dar. Sowohl in Reiskörnern (Chen et al. 2016), als auch in Arabidopsissamen (Sattler et al. 2004) wurden nach längeren Lagerungsperioden drastisch verringerte Keimungsraten beobachtet, wenn die Körner frei von Vitamin E waren, und so weniger gegenüber oxidativen Schäden geschützt waren. Hohe Keimungsraten sind für die Bestellung des Ackers von Interesse. Zusätzlich stellen vor allem gleichmäßige Keimungsraten von Gerstenkörnern ein entscheidendes Qualitätskriterium für das Malzen im Brauvorgang dar (Woonton et al. 2005).

Ein hoher Vitamin E Gehalt in Körnern konnte darüber hinaus mit einem hohen Vitamin E Gehalt im prozessierten Malz in Verbindung gebracht werden (Do et al. 2015), der nachweislich die Wachstumseigenschaften der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) während des Fermentationsprozesses begünstigen kann (Zhang et al. 2016). Demnach können vor allem die durch das Morex-*HGGT*-Allel vermittelten, gesteigerten Tocotrienollevel in reifen Körnern ein gesteigertes Qualitätskriterium darstellen.

4.2. Transkriptomanalysen

4.2.1. Nehmen Fahnenblätter -1 Einfluss auf die Kornfüllung?

Pflanzen können mit einem komplexen Netzwerk an Mechanismen auf Trockenstress reagieren (Abschnitt 1.2). Adaptionsmechanismen setzen eine Veränderung des Metabolismus voraus, dies wiederum einen Umbau der Transkriptomstruktur (Janiak et al. 2018). Transkriptomanalysen können einen Einblick in dieses Netzwerk liefern, weshalb in dieser Arbeit das Blatttranskriptom von Gerstenpflanzen analysiert wurde, die unter Trockenstress aufwuchsen. Über die multiplen Vorteile von Transkriptomanalysen über RNAseq gegenüber anderen Methoden, wie RNA-Microarrays, wird an anderen Stellen diskutiert (z.B. Wang et al. 2009). Hier konnten die über RNAseq bestimmten Transkriptmengen nahezu vollständig über RT-qPCR Analysen verifiziert werden (Abbildung 36). Dies validierte die bioinformatische Datenverarbeitung der Rohdaten (*reads*) zu den genspezifischen normalisierten Expressionsdaten (*ncounts*). Für ein Gen, konnten die Werte nicht validiert werden (Abbildung 36c). Die Anzahl der *Inncounts* verrät, dass sich die Transkriptmenge dieses Gens nur um einen Faktor von 2,03 zwischen der Probe mit den wenigsten und der Probe mit den meisten *Inncounts* unterschied. Die geringere Auflösung der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode in der RT-qPCR Auswertung (Abschnitt 2.10) könnte dafür verantwortlich sein, dass die geringen relativen Unterschiede nicht reproduzierbar nachgestellt werden konnten. Dies unterstrich die hohe Effektivität der RNAseq-Analysen, da auch geringe Veränderungen in der Transkriptmenge detektiert werden konnten.

Unter den Genen, die im Fahnenblatt -1 die höchsten Expressionswerte aufgewiesen hatten (Tabelle 20), fand sich ein *SWEET Zucker-Transporter* (HORVU6Hr1G089600). *SWEETs* (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*) sind membranständige Proteine, die Kohlenhydrate aus den Mesophyllzellen in den Apoplast exportieren können und somit an der apoplastischen Phloembeladung von Saccharose beteiligt sein können (Baker et al. 2012). Für Gerste wird apoplastische und nicht symplastische Phloembeladung angenommen (Evert et al. 1996). Das identifizierte *SWEET*-Protein weist die höchste Sequenzhomologie zum Arabidopsis *SWEET11*-Protein auf (BLAST-Analysen, weitere Details nicht gezeigt), dass neben *AtSWEET12* in Arabidopsis substanziell an der Phloembeladung beteiligt ist (Chen et al. 2012b). Es kann vermutet werden, dass dieses *SWEET* in Gerste an der Phloembeladung beteiligt ist. Interessanterweise ist in Gerste weniger die Rolle der *SWEETs*, sondern vor allem die Rolle der Saccharose- H^+ -Symporter (*SUTs*) studiert, die bei der Beladung des Phloems mit Saccharose aus dem Apoplast beteiligt sind (Sivitz et al. 2005, Xu et al. 2018).

Unter den Genen, die stark aktiv waren, fanden sich des Weiteren viele Gene, die an der Photosynthese und der CO₂-Assimilation beteiligt sind (Tabelle 20). Ohne tieferegehende Analysen wurde deshalb vermutet, dass zum Zeitpunkt des Ährenschiebens das Fahnenblatt -1 Photoassimilate für den Transport durch das Phloem bereitgestellt haben könnte. Die Analyse des Transkriptoms könnte demnach weitere Einblicke in die Adaptionsmechanismen in diesem wichtigen Entwicklungsstadium (siehe Abschnitt 1.4 und 1.7.2) liefern.

Der Vergleich der durch PCAs repräsentierten Transkriptomstruktur (Abbildung 33) und der durch die Populationsstruktur repräsentierten Verwandtschaft der Genotypen (Abbildung 17) zeigte auf, dass die Ausprägung des Transkriptoms stark durch die genetische Variabilität beeinflusst wurde. Die Aktivität vieler Gene wurde demnach potenziell durch distinkte genetische Faktoren reguliert. Dies kann ein entscheidender Faktor sein, wenn die Vererbung von Genen, die auf Grund ihrer transkriptionellen Regulation Einfluss auf morphologische Parameter nehmen können, während züchterischen Bemühungen über markerassistierte Selektion (MAS) kontrolliert werden soll.

Die ermittelten RNAseq Daten wurden unter verschiedensten Gesichtspunkten betrachtet. In den folgenden Absätzen sind einige Beobachtungen dargestellt, die Hinweise darauf liefern können wie die Pflanzen im RGH mit dem applizierten Trockenstress umgegangen sind. Da im Rahmen dieser Arbeit mehrere Genotypen analysiert wurden, wurden primär auch nur Gene betrachtet, die in multiplen Genotypen eine Rolle für die Adaption an den Stress spielen könnten. Da diese Mechanismen von mehreren Genotypen geteilt wurden, wohnt ihnen potenziell eine elementare Bedeutung für die Adaption an den Trockenstress inne. Die Rolle der individuellen Reaktionen einzelner Genotypen birgt selbstverständlich auch großes Potential, die Aufschlüsselung würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

4.2.2. Im RGH wurde kein Trockenschock appliziert

Trockenstress löst in vielen Genen eine transkriptionelle Induktion aus (siehe diverse zitierte Studien zum Transkriptom unter Trockenstress). Ein Gen, das diesbezüglich häufig als Stressmarker betrachtet wird, ist die Δ -Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (*P5CS*). Die *P5CS*-Aktivität beeinflusst die Rate der Umsetzung von Glutamat zu Prolin, das in Pflanzen unter osmotischem Stress als molekulares Chaperon und Osmolyt akkumuliert (Turchetto-Zolet et al. 2009), auch um eine gesteigerte Toleranz gegenüber Dehydrierung zu vermitteln (Abschnitt 1.2). Im RGH konnte kein allgemeiner (Tabelle 21) oder spezieller (Tabelle 23, Tabelle 25) stressvermittelter Anstieg der Transkriptmenge beider *P5CS*-Gene

nachgewiesen werden, die im MRA annotiert sind (HORVU1Hr1G072780, HORVU3Hr1G085760). Andere Studien hatten dies in Gerste bereits beobachtet (z.B. Talamè et al. 2007). Obwohl keine Induktion der *P5CS* nachgewiesen werden konnte, stieg der Prolingehalt von durchschnittlich 37,24 pmol/mgFG auf 104,64 pmol/mgFG in allen 57 Genotypen im RGH ($p < 0,001$, gemessen nach Abbasi et al. (2007), weitere Details nicht gezeigt, Zugang zu den Daten siehe Anhang 6.2). Ein stressvermittelter Anstieg des Prolingehalts wurde auch in Gerste bereits mit Stressadaptation in Verbindung gebracht (Singh et al. 1972, Szabados & Savouré 2010, Templer et al. 2017).

Bereits Talamè et al. (2007) stellten fest, dass Transkriptomanalysen häufig auf Pflanzen beruhen, die einem sehr starken und abrupt applizierten Trockenstress ausgesetzt waren (Trockenschock) (z.B. in Kawasaki et al. 2001, Kreps et al. 2002, Ozturk et al. 2002, Seki et al. 2002, Rabbani et al. 2003, Atienza et al. 2004, Lan et al. 2005, Rensink & Buell 2005). Wenn die Reaktion von Pflanzen auf Trockenstress im Feld untersucht werden soll, ist die Applikation von graduell appliziertem und langanhaltendem Trockenstress praxisnaher als die Applikation eines Trockenschocks (Talamé et al. 2007, Kebede et al. 2019). Da sich Berichte über solche Studien seltener finden (z.B. in Rizhsky et al. 2002, Giuliani et al. 2005, Hazen et al. 2005, Luo et al. 2005), untersuchten Talamè et al. (2007) sowohl Gerstenpflanzen, die einem Trockenschock ausgesetzt wurden, als auch Pflanzen die in Klimakammern unter graduell abnehmender Wasserverfügbarkeit wuchsen. Talamè et al. (2007) kamen zu dem Schluss, dass unter Trockenschock generell mehr Gene differentiell exprimiert wurden, inklusive des Stressmarkers *P5CS*. Unter graduell abnehmender Wasserverfügbarkeit wurde keine differentielle Expression der *P5CS* detektiert (Talamé et al. 2007). Durch Trockenschock waren die Gene außerdem generell stärker differentiell exprimiert (Talamé et al. 2007). Auch unter Berücksichtigung der bereits in den Abschnitten 4.1.5 und 4.1.6 diskutierten Beobachtungen wurde deshalb vermutet, dass die Pflanzen im RGH einem mildem, dafür andauerndem Stress ausgesetzt waren. Dies hatte offensichtlich zur Folge, dass zum Zeitpunkt der Probennahme keine signifikante Induktion des Stressmarkers *P5CS* beobachtet werden konnte.

Dies könnte auch erklären, warum unter den Genen, die in allen Genotypen in ihrer Expression reprimiert waren (Tabelle 22), keine Komponenten der Photosynthese auftraten. Trockenstress kann den Schluss der Stomata induzieren, wodurch die Rate des Gasaustausches, die Rate des Calvin-Zyklus und so die Rate der Photosynthese sinken kann (Abschnitt 1.2). Um die negativen Effekte einer zu hohen Photosyntheserate zu kompensieren, zählt eine geringere Expression von Genen, die Komponenten der Photosynthese kodieren, zu einer universellen Reaktion von Pflanzen auf Trockenstress (Evers et al. 2010, Kondrák et al. 2012, Zhang et al. 2014, Iovieno et al. 2016).

Die Magnitude des applizierten Trockenstress kann auch erklären, warum der Stress die Transkriptomstruktur weniger stark beeinflusste als die genetische Variabilität (Abbildung 33). Genotypen, deren Transkriptomstruktur durch Stress deutlicher beeinflusst war, wiesen mehr differentiell exprimierte Gene (DEG) auf (Abbildung 34). Dieser anschauliche Zusammenhang unterstützt die Validität der Daten und steht mit den Beobachtungen von Talamé et al. (2007) im Einklang, dass die Stärke des applizierten Stresses die Anzahl der regulierten Gene beeinflussen kann. Warum die analysierten Replikate mancher Genotypen stärker durch den Trockenstress beeinflusst wurden, konnte weder mit den makroskopischen Eigenschaften der Pflanzen noch anderen Eigenschaften der Genotypen in Verbindung gebracht werden.

4.2.3. Potenzieller Einfluss der Synthese und Wahrnehmung von Phytohormonen auf intrazelluläre Signalkaskaden

Für einige Gene, die durch Trockenstress differentiell reguliert wurden (Tabelle 21 bis Tabelle 26), sollten mögliche Funktionen im Kontext der Stressadaptation diskutiert werden.

Gene, die an der Biosynthese und der Signalübertragung von Pflanzenhormonen wie Abscisinsäure (ABA), Auxin, Ethen, Jasmonsäure oder Salicylsäure beteiligt sind, können durch Trockenstress differentiell exprimiert werden (Jakoby et al. 2002, Aimar et al. 2011). Die Expression einer *Beta-Glucosidase* (HORVU1Hr1G058520) war unter Trockenstress in allen acht Genotypen induziert (Tabelle 21). Es konnte gezeigt werden, dass Beta-Glucosidasen ABA aktivieren können, das in Zellen durch Konjugation mit Glukose in inaktivierter Form vorliegt (Lee et al. 2006). ABA ist ein wichtiges Pflanzenhormon, das unter anderem als Reaktion auf Trockenstress gebildet wird und wichtige Adaptionsmechanismen wie die Regulation der Stomata kontrolliert (Schroeder et al. 2001, Chaves et al. 2003, Gonzalez-Guzman et al. 2012). Dabei wird ABA in der Zelle durch *Pyrabactin Resistance* (PYR)-Rezeptoren gebunden (Park et al. 2009). Dies aktiviert auf Proteinebene eine Signalkaskade aus Protein Phosphatasen 2C (PP2C) (Ma et al. 2009), SNF1-related Kinasen (SnRK2) (Melcher et al. 2009) und einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (TF, z.B. ABF (Choi et al. 2000), bZIP (Sahoo et al. 2013), MYB/MYC (Abe et al. 2003), AP2/ERF (Zhan et al. 2009)). Diese TF können anschließend die Aktivität von Genen regulieren, die für die Stressadaptation wichtig sind (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2007). ABA kann in der Pflanze nicht nur dort agieren, wo es gebildet wird, sondern auch als systemisches Stresssignal beispielsweise aus den Wurzeln in die Blätter wandern, um dort drohende Wasserknappheit zu signalisieren (Davies & Zhang 1991, Davies et al. 2002, Dodd 2005, Hey et al. 2010). Neun Gene, die an der ABA-Wahrnehmung beteiligt sind, waren unter

Trockenstress differentiell exprimiert (Abbildung 42). Die differentielle transkriptionelle Regulation dieser Gene könnte eine Folge andauernder systemischer ABA-Signale sein, wodurch in Blättern der Grad der ABA-Wahrnehmung verändert wurde. Zu den durch ABA induzierten Genen, gehören beispielsweise auch Dehydrine (Robertson 2003). Ein Dehydrin (HORVU6Hr1G084070) wurde in allen Genotypen durch Stress induziert (Tabelle 21). Dehydrine konnten in Gerste bereits mit Resistenz gegen Wasserstress in Verbindung gebracht werden (Suprunova et al. 2004).

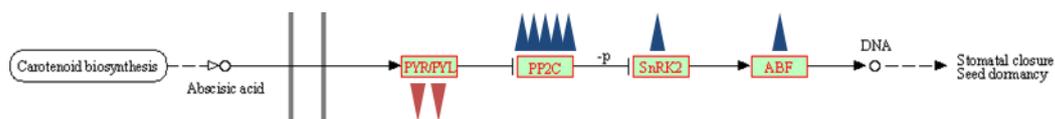


Abbildung 42: Durch Trockenstress regulierte Gene, die an der Perzeption von ABA beteiligt sind. Gezeigt ist ein Ausschnitt der KEGG-Karte ko04075 (*Plant Hormone Signal Transduction*) (näheres siehe Abschnitt 2.21). Die Karte stellt bekannte molekulare Interaktionen zwischen Genen und Proteinen schematisch dar. Zwei PYR/PYL-Rezeptoren (KEGG-Kategorie K14496, HORVU1Hr1G054020, HORVU4Hr1G055220) wiesen unter Trockenstress eine geringere Transkriptmenge auf (Tabelle 22) (Rote Pfeile). Fünf PP2C (K14497, HORVU3Hr1G050340, HORVU3Hr1G059170, HORVU3Hr1G067380, HORVU3Hr1G085930, HORVU4Hr1G060370), eine SnRK2 (K14498, HORVU2Hr1G110230) und ein ABF-TF (K14432, HORVU3Hr1G083250) wiesen unter Trockenstress eine höhere Transkriptmenge auf (Tabelle 21) (Blaue Pfeile).

Darüber hinaus waren zwei *Lipoxygenasen* (HORVU7Hr1G050670, HORVU7Hr1G050680), eine *12-Oxophytodienoat-Reduktase* (HORVU2Hr1G004230) und eine *Benzylalkohol O-Benzoyltransferase* (HORVU1Hr1G045690) durch Trockenstress reprimiert (Tabelle 22). Sie sind am α -Linolensäure-Metabolismus beteiligt, dessen mögliches Endprodukt das Pflanzenhormon Jasmonsäure (JA) ist (Abbildung 43). Auch ein TF, der laut Annotation an der durch Ethen ausgelösten Regulation beteiligt ist (HORVU6Hr1G062380) und ein TF, der mit Auxin in Verbindung steht (HORVU3Hr1G010140), waren unter Trockenstress in allen Genotypen in der Expression reprimiert (Tabelle 22).

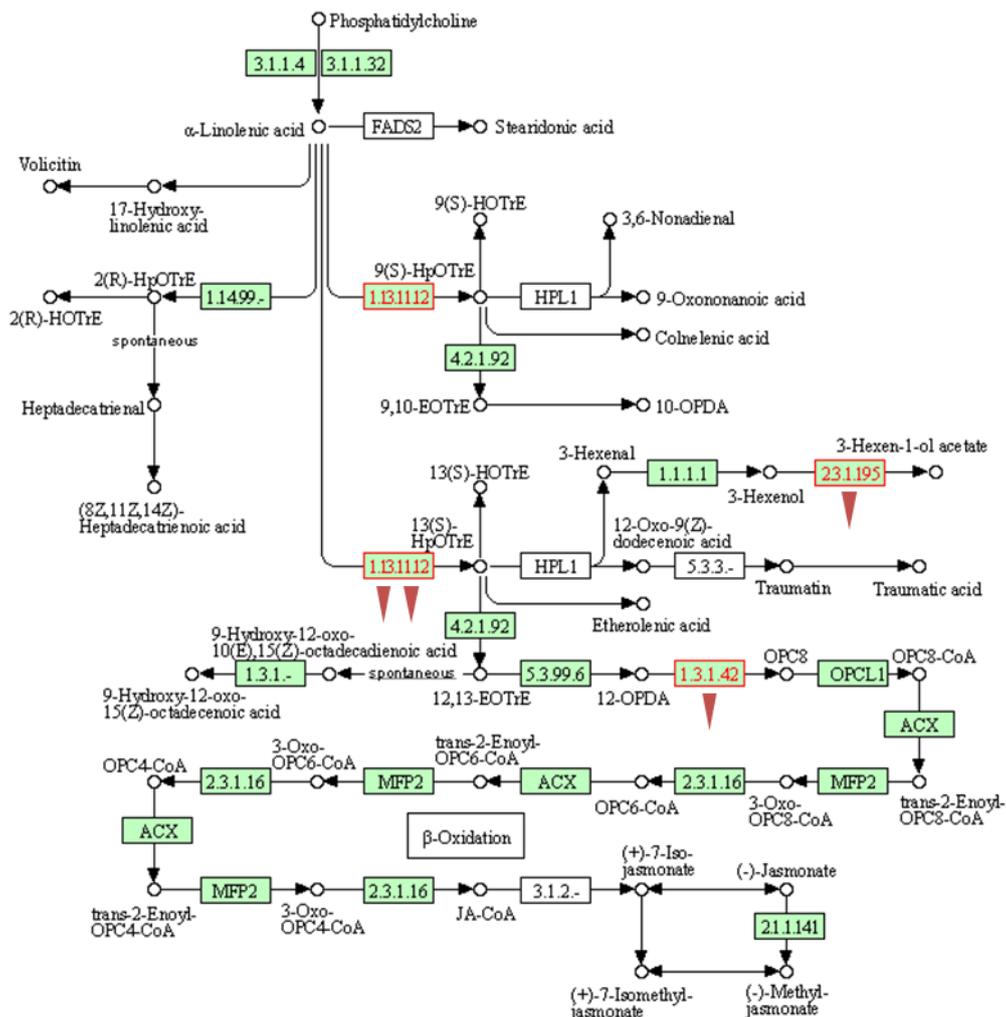


Abbildung 43: Durch Trockenstress regulierte Gene, die an der Biosynthese von Jasmonsäure beteiligt sind. Gezeigt ist die KEGG-Karte ko00592 (*α-Linolenic Acid Metabolism*). Die Karte stellt schematisch einen Biosyntheseweg dar. Kreise: chemische Verbindungen; Kästchen: von Enzymen vermittelte Schritte (inklusive EC-Nummer). Vier Gene, die potenziell auf die Biosynthese von Jasmonsäure einwirken können, wiesen unter Trockenstress eine geringere Transkriptmenge auf (Tabelle 22) (Rote Pfeile).

Zwei Gene der *NRT1/PTR FAMILY* (HORVU1Hr1G054020, HORVU4Hr1G004460) waren ebenso durch Trockenstress reprimiert (Tabelle 22). *NRT1/PTR*-Transportproteine sind am Stickstoff-Transport beteiligt (Parker & Newstead 2013). Für einige Formen dieser großen Proteinfamilie konnte auch ein Transport von Pflanzenhormonen nachgewiesen werden (Chiba et al. 2015). Die große Anzahl der DEG, die an der Biosynthese oder der Signalwahrnehmung von Pflanzenhormonen beteiligt sind, deutet darauf hin, dass die Pflanzen spezifisch das Gleichgewicht und die Verteilung der Pflanzenhormone als Reaktion auf den Wasserentzug regulierten. Da der Gehalt der Phytohormone im Blattgewebe nicht

bestimmt wurde, sollte jedoch über die möglichen Dynamiken der Pflanzenhormone zueinander nicht weiter spekuliert werden.

Es wurden auch neun *Rezeptorkinasen* (HORVU1Hr1G092250, HORVU1Hr1G092300, HORVU2Hr1G098390, HORVU5Hr1G084880, HORVU5Hr1G098640, HORVU5Hr1G123550, HORVU6Hr1G083680, HORVU6Hr1G084370, HORVU6Hr1G088980), drei *Rezeptor-like Kinasen* (HORVU4Hr1G059150, HORVU5Hr1G102900, HORVU7Hr1G043620) und zwei *WRKY-Transkriptionsfaktoren* (HORVU4Hr1G002390, HORVU7Hr1G083270) identifiziert, die eine geringere Expression unter Trockenstress aufwiesen (Tabelle 22). Membranständige Rezeptorkinasen und lösliche Rezeptor-like Kinasen können intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen (Liang & Zhou 2018). Die Regulation von *WRKY-TF* wird oft im Kontext von abiotischem Stress diskutiert (Chen et al. 2012a). Es kann spekuliert werden, dass diese Kinasen und TF im Zusammenspiel mit den DEG, die an der Biosynthese und Signalwahrnehmung von Phytohormonen beteiligt sind, in den Pflanzen eine veränderte Regulation von anderen Genen auslösten, die eine Adaption an den Trockenstress ermöglichten.

4.2.4. Regulation der Stickstoff- und Kohlenstoff-Verteilung

Sowohl der Gehalt als auch der Transport von Stickstoffverbindungen aus Blättern in die Speichergewebe kann den Ertrag beeinflussen (Tahir & Nakata 2005, Li et al. 2015). Wie gezeigt, waren zwei *NRT1/PTR-Transporter* in allen acht Genotypen reprimiert (Tabelle 22). *NRT1/PTR-Transporter* können Pflanzenhormone transportieren (Abschnitt 4.2.3), besser studiert ist jedoch der Transport von Nitrat (Chamizo-Ampudia et al. 2017). Die große Anzahl der Nitrat-Transporter (z.B.: Arabidopsis: ~53 (Krapp et al 2014), Gerste: ~101 (MRA)) ermöglicht eine effektive Regulierung der Verteilung der Stickstoffverbindungen innerhalb und zwischen den Pflanzenzellen, erschwert jedoch die Interpretation der spezifischen Funktion jedes einzelnen Gens (Tsay et al. 2007). Die beiden reprimierten *Nitrat-Transporter* könnten darüber hinaus mit einer *Nitrat-Reduktase* (HORVU7Hr1G073640) in Verbindung stehen, die in allen Genotypen durch Trockenstress induziert war (Tabelle 21). Die Nitrat-Reduktase-Aktivität ist elementar und ratenlimitierend bei der photosynthetischen Assimilation von Nitrat (siehe z.B. Crawford 1995, Campbell 2011). Relevant unter Trockenstress könnte bei der Reduzierung von Nitrat zu Nitrit auch der Verbrauch des Elektronenakzeptors NADPH sein, der bei einer sinkenden Rate des Calvin-Zyklus akkumulieren kann (Abschnitt 1.2). Auch eine *Indol-3-Glycerophosphat-Synthase* (HORVU7Hr1G114660), die an der Tryptophan Biosynthese beteiligt ist, sowie eine *Cystein-Synthase* (HORVU2Hr1G000280) und eine *Aspartat-Oxidase* (HORVU6Hr1G017860), die

durch Trockenstress reprimiert wurden (Tabelle 22), könnten die Stickstoffverteilung beeinflussen.

Durch die Umsetzung von L-Aspartat zu Oxalacetat könnte die *Aspartat-Oxidase* zusätzlich Einfluss auf die Kohlenstoffverteilung nehmen. Dies kann auch für eine *Mercaptopyruvat Sulfurtransferase* (HORVU6Hr1G027360) vermutet werden, die beim Abbau von Cystein zu Pyruvat beteiligt ist. Sie war ebenso in allen acht Genotypen reprimiert, wie ein *NAD-abhängiges Malat-Enzym* (HORVU1Hr1G028030) (Tabelle 22), das Malat zu Pyruvat umsetzen kann. Einige dieser Enzyme sind Schlüsselenzyme, die den Substratfluss innerhalb und zwischen dem Aminosäuremetabolismus, dem Citratzyklus, dem Pentosephosphatweg, der Glykolyse und der Gluconeogenese beeinflussen könnten. Die Regulation dieser Gene ermöglichte den Pflanzen womöglich, entscheidend Einfluss auf die Aktivität dieser Stoffwechselwege zu nehmen. Auffällig war, dass unter Trockenstress vor allem der Substratfluss zum Pyruvat beeinträchtigt sein könnte. Da Pyruvat zentraler Bestandteil vieler Biosynthesewege ist, sollte jedoch nur auf Basis der dargestellten Genregulationen nicht weiter über den Substratfluss spekuliert werden.

Durch Trockenstress aktiviert waren eine *Beta-Amylase* (HORVU4Hr1G084390) und eine *Saccharose Synthase* (HORVU4Hr1G049500) (Tabelle 21). Vor allem in der Nacht vermitteln Beta-Amylasen in Blättern die hydrolytische Abspaltung von Maltose-Molekülen von transitorischer Stärke, und stellen so auch die Versorgung der Saccharose-Synthese mit Edukten sicher (Lu & Sharkey 2006, Zanella et al. 2016). Saccharose-Synthasen können sowohl die Synthese als auch die Spaltung von Saccharose vermitteln (Zheng et al. 2011). In Mesophyllzellen sollte vorrangig die Synthese stattfinden, denn wie die meisten Pflanzenarten transportiert auch Gerste überwiegend Saccharose durch das Phloem (Winter et al. 1992). Unter gut bewässerten Bedingungen wurde in allen Genotypen ein durchschnittlicher Saccharose-Gehalt von 44,04 nmol/mgFG gemessen, unter Trockenstress von 82,21 nmol/mgFG ($p < 0,001$, gemessen nach Abbasi et al. (2007), weitere Details nicht gezeigt), Zugang zu den Daten siehe Anhang 6.2). Im RGH könnte die erhöhte Aktivität der *Beta-Amylase* und der *Saccharose Synthase* zum gesteigerten Saccharosegehalt unter Trockenstress beigetragen haben. Ähnlich wie Prolin (Abschnitt 4.2.2) können Zuckermoleküle (z.B. Saccharose, Maltose) als kompatible Osmolyte in Zellen akkumulieren (Toleranz gegenüber Dehydrierung, siehe auch Abschnitt 1.2), was im Kontext eines Hitzeschocks (Kaplan & Guy 2004) und eines Kälteschocks (Kaplan & Guy 2005) bereits mit der Aktivität von *Beta-Amylasen* und dem Abbau von Stärke in Verbindung gebracht wurde.

Zum Zeitpunkt der Probennahme (Blattproben 13:15-19:15 Uhr) betrug der durchschnittliche Stärkegehalt aller Genotypen unter gut bewässerten Bedingungen 12,25 nmol/mgFG und

unter Trockenstress 20,09 nmol/mgFG ($p < 0,001$, gemessen nach Abbasi et al. (2007), weitere Details nicht gezeigt, Zugang zu den Daten siehe Anhang 6.2). Dies kann weder mit vorherigen Beobachtungen in Gerste (Templer et al. 2017) und anderen Pflanzenarten (Krasensky & Jonak 2012) in Verbindung gebracht werden, die Trockenstress erfuhren, noch steht es im Einklang mit der gesteigerten *Beta-Amylase* Aktivität. Im RGH wurde kein Trockenschock appliziert (Abschnitt 4.2.2). Ähnlich wie beim Gehalt von Prolin (Abschnitt 4.2.2) war womöglich eine rapide Akkumulation von Maltose und Saccharose als kompatible Osmolyte nicht nötig, weshalb die gesteigerte *Beta-Amylase*-Aktivität keine Erschöpfung der Stärke am Tag verursachte.

Vielmehr könnten die erhöhten Transkriptmengen der *Beta-Amylase* und die gesteigerte Akkumulation der transitorischen Stärke am Tag mit einer anderen Beobachtung in Verbindung stehen. Im Jahr 2016 wiesen alle Genotypen unter Trockenstress durchschnittlich 2,6 Tage früher ($p < 0,001$) Ährenschieben auf als unter gut bewässerten Bedingungen. Die frühe Reife kann als *Escape*-Phänotyp interpretiert werden (siehe Abschnitt 1.2). Die Pflanzen konnten sich im RGH über einen längeren Zeitraum an den Trockenstress akklimatisieren (Abschnitt 4.2.2). Womöglich erhöhten sie tagsüber die Akkumulation transitorischer Stärke, um auch nachts durch eine erhöhte Abbaurate eine effektivere Versorgung der Körner mit Saccharose zu gewährleisten, um den Trockenstress durch eine frühere Reife zu vermeiden. Da die Regulation von *Beta-Amylasen* sehr komplex ist, da sie unter anderem durch Phytohormone (Wang et al. 1996), abiotische Stressfaktoren (Dreier et al. 1995, Monroe et al. 2014, Kaplan & Guy 2004, Maruyama et al. 2009) und Licht (Datta et al. 1999) reguliert werden, hätten lediglich Messungen zu weiteren Tageszeiten diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern können.

Stress kann Einfluss auf die Bereitstellung und den Transport von Photoassimilaten durch das Phloem nehmen (Savage et al. 2016). In Gerste kann dies die Kornfüllung beeinflussen (Schnyder 1993). Nach dem *Source-Sink*-Konzept (siehe z.B. Fernie et al. 2020) könnte die gesteigerte Saccharose-Akkumulation im Blatt (*Source*) auch ein pleiotroper Effekt eines eingeschränkten Transports durch das Phloem in die Speichergewebe (*Sink*) sein. Unter der Annahme, dass die Saccharose-Akkumulation vorsätzlich von den Pflanzen initiiert war (s.o.), müssten positive Effekte auf das Wachstum der Speichergewebe detektierbar sein. Im Jahr 2016 bildeten sich unter Trockenstress mehr Körner pro Halm (bzw. Ähre) (Abbildung 9c). Das TKG war nicht beeinflusst (Abbildung 9b). Zum Zeitpunkt des Ährenschiebens (=Probennahme) wird in Getreiden vor allem die Anzahl der Körner pro Ähre bestimmt, das Gewicht der einzelnen Körner wird erst während der anschließenden Phase der Kornfüllung beeinflusst (Nese & Schnurbusch 2012). Der erhöhte Saccharose-Gehalt in den Blättern zum

Zeitpunkt des Ährenschieben könnte demnach eine vermehrte Ausbildung von Körnern vermittelt haben, um dem Einbruch des Ertrags (Abbildung 10) teilweise entgegenzuwirken.

Auch die Regulation der übrigen in diesem Kapitel dargestellten Gene könnte mit einer beschleunigten Kornfüllung in Verbindung stehen. Die Mobilisierung von Stickstoff wird, meist im Kontext der Blattseneszenz, oft mit der Aktivität von Glutamin-Synthasen und Glutamat-Dehydrogenasen in Verbindung gebracht (Pageau et al. 2006, Goel et al. 2015, Zhang et al. 2018). Es konnten keine Hinweise gefunden werden, dass Blattseneszenz zum Zeitpunkt der Probennahme eine Rolle spielte. Der Einfluss der hier aufgezählten Gene könnte deshalb vor allem bei der Adaption an Trockenstress eine Rolle spielen, der nicht abrupt auftritt.

4.2.5. Einfluss auf die Regulation der Stomata?

Neben einem möglichen Einfluss auf die Mobilisierung von Photoassimilaten und die Akkumulation von Osmolyten, könnten die *Beta-Amylase*, die *Saccharose-Synthase* und das *Malat-Enzym* auch an der Regulation der Stomata beteiligt sein. Die Regulation der Stomata ist komplex und beruht zu großen Teilen auf der Regulation des Turgordrucks in den Schließzellen (siehe z.B. Hedrich 2012). In Arabidopsis-Deletionsmutanten der *Beta-Amylase 1* konnte mehr Stärke, geschlossene Stomata und eine erhöhte Trockentoleranz nachgewiesen werden (Valerio et al. 2011, Prasch et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Malat entscheidend an der Regulation des osmotischen Potentials der Schließzellen beteiligt ist (Outlaw et al. 1979, Hedrich 2012). Die spezifische Aktivität einer *Saccharose-Synthase* in Schließzellen wurde in Arabidopsis bereits mit der Bewegung der Stomata in Verbindung gebracht (Antunes et al. 2012). Da in dieser Arbeit jedoch das gesamte Blattgewebe analysiert wurde, soll nicht weiter über mögliche Regulationen in Schließ- und Nebenzellen spekuliert werden. Verwiesen wird hier auf die Arbeiten von Schäfer et al. (2018) die spezifisch das Transkriptom von Schließ- und Nebenzellen der Stomata in Gerste untersuchten und auch eine Nitrat-abhängige Regulation beobachteten.

4.2.6. Spezifisch durch Trockenstress reguliert

Nur wenig Gene waren spezifisch in den ertragsstabilen oder ertragsinstabilen Genotypen durch Trockenstress differentiell exprimiert (Tabelle 23 bis Tabelle 26). Bei keinem dieser Gene konnte die Spezifität in der Regulation auf verschiedene Genvarianten zurückgeführt

werden. Weitere *cis*- oder *trans*-regulatorische Elemente müssen dafür verantwortlich gemacht werden.

Spezifisch nur in den ertragsstabilen Genotypen induziert waren ein *Hsp70-Chaperon* und eine *Superoxiddismutase* (Tabelle 23). Hsp70-Proteine sind molekulare Chaperone, die eine Faltung von anderen Proteinen begünstigen können. Sie werden unter Stress induziert und ihre biotechnologische Expression führte bereits erfolgreich zur Steigerung der Pflanzenfitness unter diversen Stressbedingungen, weshalb sie als Adaptionsmechanismus angesehen werden (Sung et al. 2002, Ray et al. 2016). Superoxiddismutasen katalysieren die Disproportionierung von Superoxid (O_2^-), sind also wichtige Komponenten des Antioxidativen-Systems und können die Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhen (Gupta et al. 1993, Bowler et al. 2011).

Spezifisch nur in den ertragsinstabilen Genotypen induziert waren eine *Sulfotransferase* und ein *Wound-induced-Gen* (Tabelle 25). *Sulfotransferasen* sind eine große Genfamilie, deren Einfluss auf das Wachstum von Pflanzen unter verschiedenen Stressszenarien untersucht wurde (Jin et al. 2019). Auch in Gerste wurde ein QTL für Trockenadaptation bereits mit einer *Sulfotransferase* in Verbindung gebracht (Zhang et al. 2017). *Wound-induced-Gene* waren in Pflanzen induziert, die Ozon (Miller et al. 1999) oder Effektoren von Pathogenen ausgesetzt wurden (Keates et al. 2003). Die genauere molekulare Funktion ist nicht bekannt.

Spezifisch nur in den ertragsstabilen Genotypen wiesen sieben Gene unter Trockenstress eine niedrigere Expression auf (Tabelle 24). Das *vacuolar sorting receptor homolog 1* weist die höchste Proteinsequenzhomologie zum Arabidopsis VSR1 auf (BLAST-Analysen, weitere Details nicht gezeigt). Die Rolle von AtVSR1 wird vor allem bei der Beladung des Endosperms von Arabidopsis-Samen mit Proteinen studiert, da es an der Steuerung von Vesikeln bei der Sekretion von löslichen Proteinen beteiligt ist (Zouhar et al. 2010). Eine Abnahme der Menge von mitochondrialen Substrat-Carrier-Proteinen wurde in Proteomanalysen bereits spezifisch in kältetoleranten Wintergerstensorten beobachtet (Gołębiowska-Pikania et al. 2017). Dihydroflavonol-4-Reduktasen werden auf Grund ihrer Funktion in der Biosynthese von Anthocyanen eigentlich bei gesteigerter Expression mit Stresstoleranz in Verbindung gebracht (Wang et al. 2013), ebenso wie Acyl-Carrier Proteine auf Grund ihrer Beteiligung an der Fettsäure-Synthese (Klinkenberg et al. 2014). BAG Chaperon Regulatoren können, durch Bindung der ATPase Domäne, Hsp70-Proteine sowohl positiv als auch negativ regulieren (Takayama et al 1997). Von einer veränderten Expression von zwei *BAG-Genen* wurde in Gerste bereits als Reaktion auf Kältestress und Infektion mit Pathogenen berichtet (Kabbage & Dickman 2008). ABC-Transporter vermitteln den Transport von Substraten über Biomembranen und gehören zu einer der größten

Proteinfamilien (Henikoff et al. 1997). Auf Grund der hohen Anzahl der Paralogen kann diese Proteinfamilie den Transport verschiedenster Metabolite vermitteln, inklusive der Ausscheidung von giftigen Metaboliten aus Zellen (Martinoia et al. 2002). Die spezifische Funktion des ABC-Transporters, der in den ertragsstabilen Genotypen reprimiert wurde (Tabelle 24), ist damit ebenso schwer einzuschätzen wie die Funktion der drei ABC-Transporter, die in allen acht Genotypen induziert oder reprimiert wurden (Tabelle 21, Tabelle 22).

Spezifisch in den ertragsinstabilen Genotypen in der Expression reprimiert war eine β -*Tubulin-Komponente* und eine *Saccharose-Synthase* (Tabelle 26). Als Bestandteil des Cytoskeletts sind Tubuline an einer Vielzahl an zellulären Mechanismen beteiligt, und auch ein Einfluss auf die Bewältigung von oxidativem Stress wird intensiv untersucht (Livanos et al. 2014). Wie ausführlich in Abschnitt 4.2.4 diskutiert, können Saccharose Synthasen Einfluss auf den Transport der Photoassimilate nehmen. Speziell diese *Saccharose-Synthase* könnte demnach (mit)verantwortlich dafür sein, dass die ertragsinstabilen Genotypen drastische Ertragseinbußen aufwiesen. Zu erwähnen ist jedoch, dass sich unter beiden Wachstumsbedingungen der Saccharose-Gehalt der vier ertragsstabilen und der vier ertragsinstabilen Genotypen im Blatt nicht signifikant unterschied. Über einen Einfluss auf spätere Entwicklungsstadien (Kornfüllung) könnte nur spekuliert werden.

Die spezifische Rolle differentiell exprimierter Gene für die Adaption an verschiedene Umweltbedingungen zu interpretieren, kann schwierig sein (André et al. 2009). Auch in den hier gezeigten Analysen kann die spezifische Induktion eines *Hsp70* und einer *Superoxiddismutase* in den ertragsstabilen Genotypen, auf Grund der molekularen Funktion, leichter im Kontext der Stressadaption erklärt werden als die Rolle anderer Gene. So wurden beispielsweise zwei Dihydroflavonol-4-Reduktasen spezifisch in den ertragsstabilen Genotypen reprimiert. Auf Grund ihrer Beteiligung an der Biosynthese der Anthocyane hätte jedoch vermutet werden können, dass sie bei gesteigerter Expression mit einer hohen Ertragsstabilität assoziiert sind.

4.2.7. Aktivität assoziiert mit Ertragsstabilität

Nur wenige Gene waren spezifisch in den Gruppen der ertragsstabilen oder ertragsinstabilen Genotypen reguliert (Abschnitt 4.2.6). Es sollten weitere Gene identifiziert werden, die zusätzliche Hinweise darauf liefern können, auf welche Weise die ertragsstabilen Genotypen anders mit dem Trockenstress umgehen können als die ertragsinstabilen Genotypen. Dafür wurden Gene identifiziert, deren Aktivität mit der prozentuellen Ertragsstabilität in Verbindung stand. Es wurden nicht die Replikate unterschiedlicher Wachstumsbedingungen innerhalb

eines Genotyps verglichen, sondern die Proben unterschiedlicher Genotypen innerhalb einer Wachstumsbedingung. Die Identifikation der DEG konnte direkt auf den quantitativen Werten der Ertragsstabilität beruhen und musste nicht auf eine künstliche Klassifizierung bezüglich der Pflanzenfitness zurückgreifen. Die Ertragsstabilität ist das Verhältnis der Ertragsleistung aus beiden Wachstumsbedingungen (Abschnitt 1.7.2). Deshalb wurden primär nur Gene betrachtet, die unter beiden Bedingungen mit der Ertragsstabilität in Verbindung standen. Nachdem ein spezieller Phänotyp ausgeschlossen wurde, der später getrennt betrachtet wird (Abschnitt 4.2.9), verblieben 53 Gene, die positiv (Tabelle 27) und 89 Gene, die negativ mit der Ertragsleistung assoziiert waren (Tabelle 28). Die Analyse der Transkriptomstruktur zeigte, dass die Genotypen entsprechend der Ertragsstabilität gruppierten (Abbildung 33). Es kann vermutet werden, dass die hier identifizierten Gene für das Verhalten der Proben in den PCAs mitverantwortlich waren. Für 45 dieser Gene konnten Allele identifiziert werden, die nur spezifisch in den ertragsstabilen oder ertragsinstabilen Genotypen auftraten (Tabelle 27, Tabelle 28). Ähnlich wie bei der *HPT-7H* (Abbildung 19) beeinflusste der genetische Hintergrund die Expressionshöhe dieser Gene. Keines der 142 Gene fand sich unter den durch Trockenstress DEG (Tabelle 21 bis Tabelle 26). Somit waren diese Gene im Allgemeinen unabhängig von der Wachstumsbedingung aktiv.

Für Gene, die nicht erst als Reaktion auf einen Stress differentiell exprimiert werden, die aber an der Adaption beteiligt sind, wurde der Begriff des *Primings* geprägt (Karlusich et al. 2017). Karlusich et al. (2017) bezogen sich auf die Expression von Genen, die bei der Ausbildung einer Resistenz gegenüber Pathogenbefall beteiligt sind, jedoch bereits ohne den Pathogenbefall das entscheidende Expressionsmuster aufgewiesen hatten, dass die Resistenz vermittelte. Beim Vergleich der Transkriptomstruktur eines stresssensitiven und eines stresstoleranten Gerstengenotyps kamen Janiak et al. (2018) zu einem ähnlichen Fazit. Sie schlussfolgerten, dass Pflanzen „keine Zeit zu verschwenden haben“ wenn es um die Adaption an abiotischen Stress geht (Janiak et al. 2018). Vor allem Gene, die an der Wahrnehmung von Trockenheit und der intra- und interzellulären Weiterleitung von Signalen beteiligt sind, wurden in den Analysen von Janiak et al. (2018) im stresssensitiven Genotyp erst bei auftretendem Trockenstress differentiell exprimiert, waren im stresstoleranten Genotyp jedoch bereits unter Kontrollbedingungen entsprechend aktiv. Diese Gene konnten womöglich eine schnellere Antwort auf den Stress vermitteln (Janiak et al. 2018).

Im RGH war die Aktivität einer *Rezeptorkinase* (HORVU7Hr1G001450), von elf *Rezeptor-like Kinasen* (HORVU1Hr1G002590, HORVU1Hr1G002600, HORVU1Hr1G068380, HORVU1Hr1G094810, HORVU3Hr1G002330, HORVU3Hr1G004130, HORVU3Hr1G098730, HORVU4Hr1G001070, HORVU4Hr1G085990, HORVU7Hr1G001600, HORVU7Hr1G020720) und von zwei TF (HORVU2Hr1G015240, HORVU2Hr1G117380) mit der Ertragsstabilität assoziiert (Tabelle 27, Tabelle 28). Einer der TF wird mit der Auxin-vermittelten Antwort in Verbindung gebracht. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 diskutiert, kann die Aktivität dieser Gene potenziell die Aktivität weiterer Gene beeinflusst haben, die an der Stressadaption beteiligt sein könnten. In Anlehnung an die Beobachtungen von Janiak et al. (2018), könnten diese Gene spezifisch in den ertragsstabilen oder den ertragsinstabilen Genotypen Einfluss auf die Stressadaption genommen haben. Auch die Expression von elf *Disease Resistance (R) Proteinen* war mit der Ertragsstabilität assoziiert (Tabelle 27, Tabelle 28). R-Proteine sind intrazelluläre Rezeptorproteine, die bei der Perzeption von Pathogenbefall eine wichtige Rolle spielen (Karlusich et al. 2017). Das komplexe Zusammenspiel zwischen biotischem und abiotischem Stress auf das Wachstum von Pflanzen wird an anderen Stellen ausführlich diskutiert (Rejeb et al. 2014, Dresselhaus & Hückelhoven 2019). Da diese Gene auch regulatorische Signalkaskaden aktivieren können (Belkhadir et al. 2004), könnten sie auch Einfluss auf die durch Trockenstress aktivierten Regulierungen genommen haben.

Eine höhere Transkriptmenge in den ertragsstabilen Genotypen wiesen ein weiteres *Vacuolar protein sorting-Protein* (HORVU3Hr1G113090, auch in technischer Abbildung 36c und biologischer Validierung Abbildung 40c, Abbildung 41a,b betrachtet), ein *Wound-induced-Protein* (HORVU3Hr1G113120, vergleiche Abschnitt 4.2.6), sowie eine *V-Typ H⁺ ATPase Untereinheit* (HORVU1Hr1G094800) auf (Tabelle 27). Unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch können V-Typ H⁺ ATPasen Protonen gegen ein Konzentrationsgefälle über Biomembranen pumpen (Nishi & Forgac 2002). Das gespeicherte chemische Potential kann anschließend für den Transport anderer Verbindungen über die Membranen genutzt werden und kann auch den pH-Wert und den Turgor von Zellen beeinflussen (Fukuda et al. 2004, Chen et al. 2005). Im Zusammenspiel mit vakuolären Pyrophosphatasen und Na⁺/H⁺ Antiportern werden V-Typ H⁺ ATPasen im Tonoplasten in Pflanzen unter anderem im Kontext der Adaption an Salzstress studiert (Vasekina et al. 2005). Das elektrochemische H⁺ Potential über den Tonoplasten ermöglicht die Akkumulation von Ionen (z.B. Na⁺) und anderer kompatibler Solute in der Vakuole (Sze et al. 1992). So konnten unter Salzstress gesteigerte *V-Typ H⁺ ATPase*-Transkriptmengen unter anderem in Tabak (Narasimhan et al., 1991), Arabidopsis (Perera et al. 1995), Tomate (Binzel & Dunlap 1995), Zuckerrübe (Kirsch et al. 1996, Lehr et al. 1999) und Eiskraut (Tsiantis et al. 1996) beobachtet werden. Auch

gesteigerte Protonen-Transportaktivitäten konnten unter anderem in Tomate (Sanchez-Aguayo et al. 1991), Arabidopsis (Fukuda et al. 1998), Gerste (Ahmed et al. 2013) und Raps (Mohammadi et al. 2013) gemessen werden. In Gerste stieg die Transportaktivität auch unter Trockenstress (Ahmed et al. 2013). Als Reaktion auf Trockenstress konnte in Raps sogar ein spezifischer Anstieg der Transportrate in einem trockentoleranten Genotyp, und eine spezifische Abnahme in einem trockensensitiven Genotyp beobachtet werden (Mohammadi et al. 2013). Gong et al. (2010) berichteten, dass in Hafer eine schnellere *V-Typ H⁺ ATPase* Aktivierung auch mit einer gesteigerten Trockentoleranz in Verbindung stand. Die höhere Aktivität der V-Typ H⁺ ATPase in den ertragsstabilen Sorten (Tabelle 27) könnte demnach im RGH mit einer verbesserten Trockenstressadaption in Verbindung stehen.

4.2.8. Einfluss auf zentrale Energiestoffwechselwege

Trockenstress löste in allen acht Genotypen eine differentielle Regulation einiger Gene aus, die an wichtigen Energiestoffwechselwegen beteiligt sind (Abschnitt 4.2.4). Auch unter den Genen, deren Transkriptmenge mit der Ertragsstabilität in Verbindung stand, fanden sich Gene, für die diesbezüglich ein Einfluss angenommen werden kann. Potenziell vermittelten sie in den ertragsstabilen und ertragsinstabilen Genotypen entscheidende Unterschiede in der Regulation zentraler Stoffwechselwege. Neben einer Untereinheit einer *mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase* (HORVU7Hr1G012370) und einem *mitochondrialen Pyruvat Carrier* (HORVU7Hr1G001560) waren eine *2-Phosphoglycerat Kinase* (HORVU4Hr1G088190) und eine *Pyruvat Kinase* (PK, HORVU4Hr1G003290) positiv mit der Ertragsstabilität assoziiert (Tabelle 27). Negativ mit der Ertragsstabilität assoziiert waren zwei *Phosphoglycerat Mutasen* (HORVU2Hr1G006280, HORVU2Hr1G006320) (Tabelle 28).

Der membranständige Succinat-Dehydrogenasen Komplex ist in den Mitochondrien sowohl am Citratzyklus als auch an der Atmungskette beteiligt. Der mitochondriale Pyruvat Carrier ist an der Translokation von Pyruvat zwischen dem Zytosol und den Mitochondrien beteiligt. Pyruvat ist das Endprodukt der Glykolyse, einem zentralen cytosolischen Stoffwechselweg, der beim Katabolismus von Kohlenhydraten beteiligt ist. Im letzten Schritt der Glykolyse wird Phosphoenolpyruvat (PEP) durch PK unter ATP-Gewinn zu Pyruvat umgesetzt.

In tierischen und bakteriellen Zellen wird die Rate der Glykolyse mit der Aktivität der PK in Verbindung gebracht (Podesta & Plaxton 1991a) und im Allgemeinen wird die Rate der Zellatmung auch vom Pyruvatgehalt beeinflusst (Pilkis & Granner 1992, Teusink et al. 2000). Da Pflanzen Photosynthese betreiben können, sind sie nicht vollständig auf die Zellatmung zur Energiegewinnung angewiesen, wodurch sich einige „faszinierende Aspekte“ der

Zellatmung entwickeln konnten (van Dongen et al. 2011 und Aufführungen darin). So kann es beispielsweise, basierend auf physiologischen und metabolischen Gegebenheiten und auch abhängig vom Lichteinfall und der Sauerstoffsättigung, zu nicht-zyklischen Reaktionen des Citratzyklus kommen (Rocha et al. 2010, Sweetlove et al. 2010). Darüber hinaus steht die Zellatmung auch mit der Lichtatmung (Photorespiration) in Verbindung, für die ein komplexer Metabolitfluss zwischen dem Zytosol, Mitochondrien, peroxisomalen Kompartimenten und den Plastiden entscheidend ist (Sweetlove et al. 2006, Cousins et al. 2008, Roche et al. 2010). Die Rate der Glykolyse wird in Pflanzen auch durch Inhibition der Phosphofruktokinase durch PEP gesteuert und es zeigte sich, dass Pflanzen weitere Enzyme nutzen, die in der „klassischen“ Glykolyse in tierischen Zellen nicht vorhanden sind (Givan 1999). Darunter beispielsweise eine Phosphoenolpyruvat Phosphatase in der Vakuole, PK-Aktivität in Plastiden oder eine Sequenz aus drei Enzymen, die, unabhängig von der PK, Pyruvat aus PEP generieren kann (Givan 1999). Die Unterschiede in der Aktivität der *mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase*, des *mitochondrialen Pyruvat Carriers* und der *Pyruvat Kinase* in den Pflanzen des RGH-Experiments könnten demnach in den ertragsstabilen und ertragsinstabilen Genotypen die Aktivität der Zellatmung entscheidend beeinflusst haben. Laut web-basierten Vorhersage-Programmen (z.B. TargetP-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Armenteros et al. (2019)) ist die identifizierte PK (Tabelle 27) im Zytosol lokalisiert. Für cytosolische PK wurden bereits allosterische Regulationen beschrieben (Plaxton & Podesta 2006).

Das Wachstum von Pflanzen beruht auf dem Gleichgewicht von Gewinn und Verlust von Photoassimilaten durch Photosynthese bzw. Zellatmung (Amthor 1984). Unter Trockenstress kann die Rate der Photosynthese um bis zu 100 % sinken, während die Rate der Zellatmung entweder steigen oder sinken kann (Flexas et al. 2005). Eine steigende Rate der Zellatmung in Pflanzen kann, bei einer sinkenden Photosyntheserate, die Erschöpfung des ATP-Niveaus ausgleichen und wurde bereits mit gesteigerter PK-Aktivität in Verbindung gebracht (Podesta & Plaxton 1991a,b, Turner et al. 2005). Unter Trockenstress wurden in Blättern sowohl erhöhte (Rodrigues et al. 2009, Li et al. 2016) als auch reduzierte PK-Aktivitäten beobachtet (Cramer et al. 2013, Yao & Wu 2016). Dies kann potenziell mit diversen PK-Isozymen in Verbindung gebracht werden, die in unterschiedlichen Pflanzengeweben und Organellen differentiell aktiv sind (Janiak et al. 2018).

Die aufgezählten Gene wurden im RGH im Allgemeinen unter Trockenstress nicht differentiell exprimiert, könnten aber im Kontext des transkriptionellen *Primings* (siehe Abschnitt 4.2.7) entscheidend an der Adaption an den Stress beteiligt sein. Janiak et al. (2018) identifizierten in Gerste eine weitere cytosolische PK, die, vergleichbar zu den Beobachtungen im RGH, in Blättern einer trockenresistenten Gerstensorte unter

Kontrollbedingungen stärker exprimiert war als in Blättern einer trocken sensitiven Sorte und als Reaktion auf Trockenstress stieg (Janiak et al. 2018). Janiak et al. (2018) analysierten und diskutierten, auch im Kontext einer mitochondrialen *PK*, auch die Aktivität und Regulation in Wurzeln, in denen keine Photosynthese stattfindet. Sie identifizierten auch weitere Gene, die an der Glykolyse beteiligt sind und in verschiedenen Genotypen spezifische Aktivitäten aufwiesen, bzw. durch Trockenstress differentiell exprimiert waren (Janiak et al. 2018). Sie schlussfolgerten, dass effektivere Prozesse der Energiegewinnung über Zellatmung unter Trockenstress zu einer gesteigerten Trockentoleranz beitragen können (Janiak et al. 2018). Ähnliches wurde unter anderem auch nach Proteomanalysen in Weinreben (Cramer et al. 2013), Transkriptomanalysen in Weidelgras (Pan et al. 2016) oder Metabolomanalysen in Arabidopsis (Hummel et al. 2010) diskutiert. Wie bereits in Abschnitt 4.2.4 diskutiert, sollte jedoch, ohne Auskunft über den Metabolitgehalt, nicht weiter über den Einfluss der Gene auf den Metabolitfluss spekuliert werden.

Über einen Einfluss auf die Glykolyse durch die beiden *Phosphoglycerat Mutasen* und die *Phosphoglycerat Kinase* könnte auch spekuliert werden. Die *Phosphoglycerat Kinase* könnte an der Umsetzung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat beteiligt sein, während die *Phosphoglycerat Mutasen* an der Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat über das Intermediat 2,3-Bisphosphoglycerat beteiligt sein könnten. Wie auch bei der *Succinat-Dehydrogenase*, dem *mitochondrialen Pyruvat Carrier* und der *Pyruvat Kinase* wurden routinemäßig, basierend auf annotierten Homologen aus anderen Organismen, Sequenzvergleiche durchgeführt. Initiale Analysen offenbarten, dass beide *Phosphoglycerat Mutasen* und das explizit als *2-Phosphoglycerat Kinase* annotierte Gen nur geringe Sequenzhomologien zu „klassischen“ Enzymen aufweisen, die laut Annotationen an der Glykolyse beteiligt sind (Analysen nicht gezeigt). Die drei identifizierten Gene könnten an diversen alternativen Schritten beteiligt sein, die für Pflanzen in der Glykolyse und Zellatmung bekannt sind (Givan 1999, van Dongen et al. 2011). Intensiv studiert sind *2-Phosphoglycerat Kinasen* (nicht *3-Phosphoglycerat Kinasen*) auch in hyperthermophilen Archaeen bezüglich ihrer Beteiligung an der Biosynthese des thermostabilisierenden zyklischen 2,3-Diphosphoglycerats über 2,3-Bisphosphoglycerat (Shima et al. 1998). Zu diesen wies das identifizierte Gen jedoch ebenso nur geringe Sequenzhomologie auf. 2,3-Bisphosphoglycerat spielt auch im Rapoport-Luebering-Zyklus eine wichtige Rolle, einem Nebenweg der Glykolyse in roten Blutkörperchen. In Pflanzen wurden auch bereits Nebenwege des Calvin-Zyklus postuliert, in denen, analog zum Rapoport-Luebering-Zyklus, 2,3-Bisphosphoglycerat eine wichtige Rolle spielt (Livingston et al. 2010). Die beiden *Phosphoglycerat Mutasen* und die *2-Phosphoglycerat Kinase* könnten Einfluss auf den

Gehalt von 2,3-Bisphosphoglycerat nehmen. Ein Einfluss auf einen möglichen Substratfluss zwischen der Glykolyse und dem Calvinzyklus wäre jedoch sehr spekulativ.

4.2.9. Das augenscheinlich auffälligste Expressionsmuster

Bei der Identifikation von Genen, deren Transkriptmenge mit der prozentualen Ertragsstabilität in Verbindung stand, wurden Gene mit einem sehr distinkten Expressionsmuster identifiziert. Die Transkriptmenge dieser Gene stand nicht ansatzweise linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung (wie in Abbildung 35a), sondern war stets in den beiden ertragsstabilen Genotypen Barke und B0004 sehr stark erhöht (wie in Abbildung 35b). In den beiden anderen ertragsstabilen Genotypen Aischa und Romilda war die Transkriptmenge dieser Gene augenscheinlich mit der Transkriptmenge der vier ertragsinstabilen Genotypen vergleichbar. Ein vergleichbar ausgeprägter Phänotyp fand sich unter den Genen, die negativ mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, nicht. Das Expressionsmuster konnte über RT-qPCR-Analysen anhand von zwei ausgesuchten Genen validiert werden (Abbildung 36a,b). Es wurde entschieden, diesen Phänotyp bei der Betrachtung von Genen auszuschließen, die mit der Ertragsstabilität assoziiert waren. Dort sollten nur Gene analysiert werden, deren Aktivität in allen ertragsstabilen Genotypen vergleichbar war. Der Ausschluss erfolgte auf Basis der Identifikation von Genen, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 im Vergleich zu den übrigen sechs Genotypen differentiell exprimiert waren. Unter gut bewässerten Bedingungen waren dies 1867, unter Trockenstress 1999 Gene (Abschnitt 4.2.7). In der Analyse der Transkriptomstruktur wiesen die vier ertragsinstabilen Genotypen ein ähnliches Verhalten auf (Abbildung 33). Die vier ertragsstabilen Genotypen separierten so paarweise von den ertragsinstabilen Genotypen, dass vermutet werden kann, dass die hier identifizierten Gene darauf einen Einfluss hatten.

Anlehnend an das bereits diskutierte Konzept des *Primings* (Abschnitt 4.2.7) sollte ein möglicher Einfluss dieser Gene auf die Fitness der Pflanzen aufgeschlüsselt werden. Für die 1359 DEG in der Überschneidung beider Wachstumsbedingungen wurden unter anderem Genontology (GO)-Kategorien betrachtet (Abschnitt 2.21). Insgesamt 946 Gene konnten mit mindestens einer GO-Kategorie in Verbindung gebracht werden. Im Vergleich zu den 21146 Genen, die im MRA mit mindestens einer GO-Kategorie assoziiert waren, konnten 88 signifikant angereicherte GO-Kategorien identifiziert werden. Innerhalb der GO-Kategorie *molecular_function* (GO:0003674), die selbst nicht angereichert war, war unter anderem die Kategorie *ionotropic glutamate receptor activity* (GO:0004970) angereichert (Abbildung 44). Keine weitere angereicherte Kategorie war so eindeutig mit einer eigenständigen molekularen Funktion assoziiert. Laut GO-Annotationen finden sich im MRA 29 Gene, die mit

dieser molekularen Funktion in Verbindung stehen. Innerhalb der 946 betrachteten Gene fanden sich 10 davon, eine signifikante Anreicherung um einen Faktor von circa 7,71 (Abbildung 44).

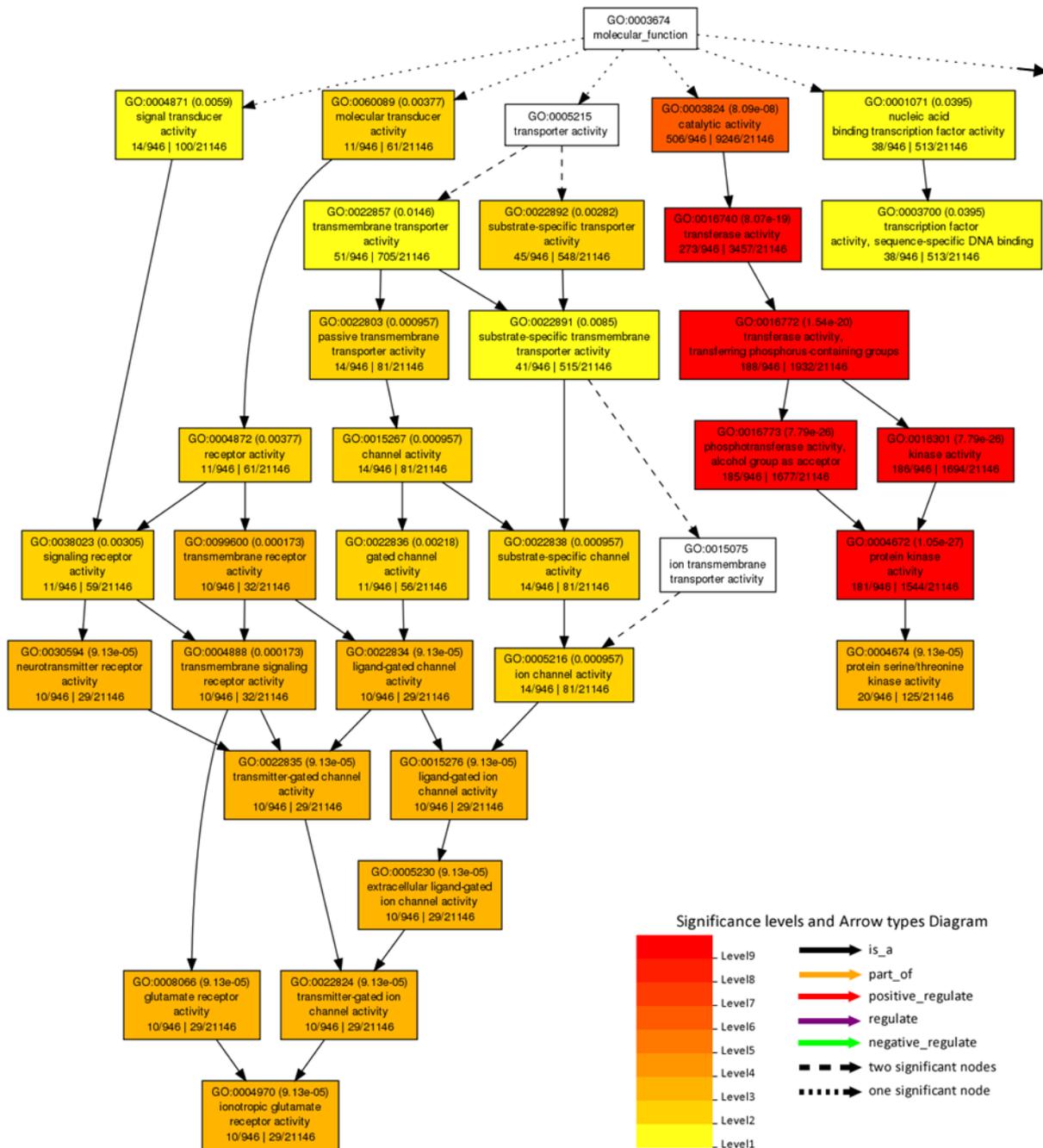


Abbildung 44: Ausschnitt von signifikant angereicherten GO-Kategorien. Für die 1359 Gene, die in den beiden ertragsstabilen Genotypen Barke und B0004 unter beiden Wachstumsbedingungen differenziell exprimiert waren (Zugang zur Liste siehe Anhang 6.2), erfolgte die Analyse der Anreicherung von GO-Kategorien mit der web-basierten Analyseplattform *AgriGOv2* (Tian et al. 2017) (Abschnitt 2.21). Die signifikant angereicherten GO-Kategorien sind farbig markiert. Gezeigt ist nur ein Ausschnitt der Kategorien, die der

Kategorie *molecular_function* (GO:0003674) zugeordnet sind. Ihre Beziehung ist mit Pfeilen dargestellt.

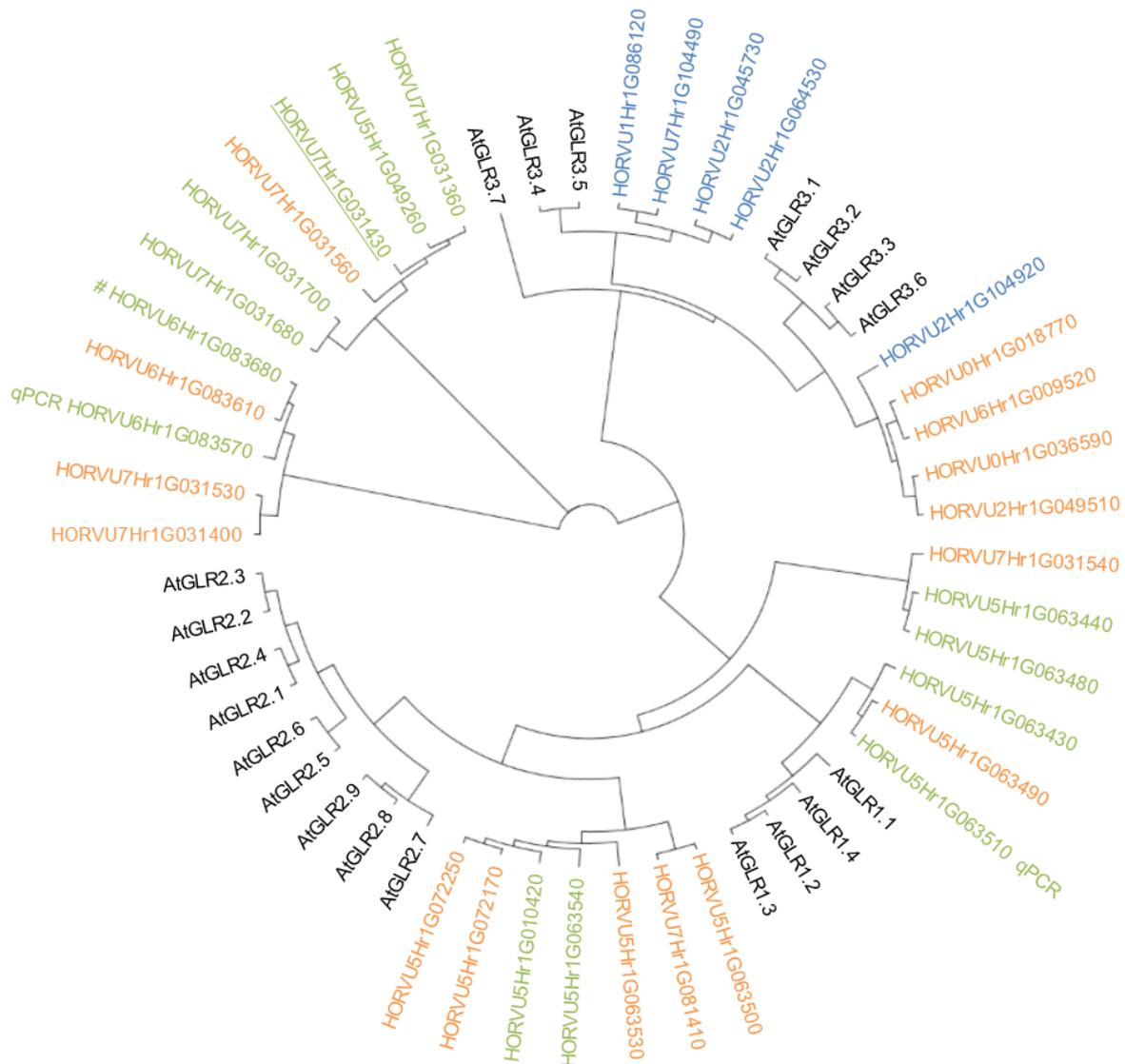
Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) sind primär Glutamat-gesteuerte Membrankanäle, die einen Na^+ und Ca^{2+} Strom über die Membran ermöglichen können (Dingledine et al. 1999). In Tieren sind sie stark an die Entwicklung des zentralen Nervensystems gekoppelt (Jorgensen 2014). Die zu den iGluRs homologen *glutamate receptor-like (GLR) channels* finden sich in Chlorophyten, Moosen, Farnen und Samenpflanzen (De Bortoli et al. 2016). Da sich GLRs nicht in Eubakterien, Archebakterien und Pilzen finden, wird vermutet, dass iGluRs und GLRs in den verschiedenen Reichen der Lebewesen unterschiedliche Rollen einnehmen (Chiu et al. 1999). Da Pflanzen kein zentrales Nervensystem haben, war die Identifikation von pflanzlichen GLRs (Lam et al. 1998) eine „unerwartete Offenbarung“ (Wudick et al. 2018a). Der Identifikation pflanzlicher GLRs ging die Annahme voran, dass Pflanzen einen Mechanismus besitzen könnten, der über die Rate der Stickstoffassimilation Auskunft geben kann, bei der zunächst Glutamin und Glutamat gebildet werden (Lam et al. 1996). Auch die Rolle von Homologen bakterieller N-Sensoren wurde in diesem Kontext untersucht (Hsieh et al. 1998). Im Gegensatz zu den sehr spezialisierten tierischen iGluRs, die primär durch Glutamat aktiviert werden, konnte für verschiedene pflanzliche GLRs bereits eine Aktivierung durch insgesamt 12 proteinogene Aminosäuren und das Tripeptid Glutathion nachgewiesen werden (Tapken et al. 2013, Qi et al. 2006, Stephens et al. 2008, Vincill et al. 2012). Oft können pflanzliche GLRs durch mehrere Aminosäuren aktiviert werden, weshalb sie allgemein auch als Aminosäurerezeptoren angesehen werden (Forde & Roberts 2014). Pflanzliche GLRs wurden bereits in der Plasmamembran (Vincill et al. 2013), in der Hüllmembran der Chloroplasten und Mitochondrien (Teardo et al. 2011 & 2015), und im Tonoplasten lokalisiert (Wudick et al. 2018b). Die Expression der *GLR-Gene* ist sehr dynamisch und kann auf eine Vielzahl von externen und internen Stimuli reagieren (Weiland et al. 2016). Die große Bandbreite in der Regulation, Aktivierung und Lokalisation der verschiedenen GLRs ermöglicht eine „nahezu endlose“ Anzahl an möglichen Stimuli, auf die Pflanzen durch GLR-vermittelte Transportaktivität von hauptsächlich Ca^{2+} reagieren können (Weiland et al. 2016). Ca^{2+} kann als sogenannter *Second Messenger* Kinasen, Enzyme und TF aktivieren und so eine zelluläre und transkriptionelle Antwort auslösen (Dodd et al. 2010). Pflanzliche GLRs wurden unter anderem bereits mit Stomata-Regulation (Cho et al. 2009), Immunantworten (Manzoor et al. 2013, Forde & Roberts 2014), Wurzelgravitropismus (Miller et al. 2010), Pollenschlauchwachstum (Wudick et al. 2018b), ABA-Signalweiterleitung (Kong et al. 2015) und Trockentoleranz (Kang et al. 2004, Lu et al. 2014) in Verbindung gebracht.

In Gerste wurde ein QTL für die Ausprägung der Rhizosphäre mit einem GLR assoziiert (George et al. 2014).

Nach einer erneuten Durchmusterung des MRA fanden sich vier weitere GLRs, also insgesamt 33 GLRs, von denen insgesamt 13 in den beiden ertragsstabilen Genotypen Barke und B0004 differentiell exprimiert waren. Innerhalb der Samenpflanzen werden die GLRs meist in drei Kladen eingeteilt (Price et al. 2012, Weiland et al. 2016). In einer ausführlicheren Betrachtung postulierten De Bortoli et al. (2016) für Landpflanzen vier Kladen. Interessanterweise folgte die Expression der Gerste GLRs im RGH der Aufteilung auf die verschiedenen Kladen, die für die Arabidopsis GLRs postuliert wurden (Abbildung 45). Vor allem auf Basis von Sequenzhomologie zu den menschlichen iGluRs wurden bereits Hypothesen zur möglichen Regulation und Bindeeigenschaften der pflanzlichen GLRs aufgestellt (Wudick et al. 2018a). Über die genaue molekulare Funktion der Gerste GLRs könnte hier jedoch nur spekuliert werden. Für die 13 GLRs, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 im Fahnenblatt -1 zum Zeitpunkt des Ährenschiebens differentiell exprimiert waren, könnte ein Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen durch differentielle Regulation weiterer Gene vermutet werden.

Abbildung 45 (nächste Seite): Phylogenetischer Baum ausgewählter pflanzlicher GLRs.

Annotation und Proteinsequenzen der *Arabidopsis thaliana* GLRs (AtGLR) nach Wudick et al. (2018a). Orange markierte Gerste GLRs: in den Blattproben aus dem RGH nicht exprimiert (durchschnittlich weniger als 10 *Inncounts*). Blau: im RGH exprimiert. Grün: im RGH exprimiert und in den beiden Genotypen Barke und B0004 unter beiden Wachstumsbedingungen differentiell exprimiert. Unterstrichen: nur unter Trockenheit in Barke und B0004 signifikant differentiell exprimiert. #: in allen Genotypen durch Trockenstress reprimiert (Tabelle 22). qPCR: Expressionsmuster über RT-qPCR-Analysen technisch validiert (Abbildung 36a,b). Phylogenetischer Baum erstellt mit der Sequenzdatenbank *Geneious* Version 5.6 (Drummond et al. 2012).



4.2.10. Einschätzungen zur Stabilität der gefundenen Assoziationen

Für eine Auswahl an Genen wurde ein möglicher Einfluss auf die Fitness der Pflanzen unter Trockenstress diskutiert (Abschnitt 4.2.1 bis 4.2.9). Die dargestellten, und weitere Gene und Gengruppen, können ein Ausgangspunkt für zukünftige detailliertere Betrachtungen sein, da im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Analysen zur molekularen Funktion dieser Gene durchgeführt wurden. Getestet wurde lediglich, ob die gefundenen Assoziationen in weiteren Genotypen und in einem unabhängigen Experiment erneut auftraten.

Zunächst wurde die Aktivität der *Pyruvat-Kinase* in weiteren Genotypen des RGH-Experiments des Jahres 2016 getestet, die einen ähnlichen Entwicklungsstand aufgewiesen hatten (Abbildung 11b). Durch ihre zentrale Rolle in einem wichtigen Stoffwechselweg (Abschnitt 4.2.8) wurde vermutet, dass die Aktivität der *PK* auch in weiteren Genotypen

Einfluss auf die Steuerung wichtiger Stoffwechselwege und damit die Fitness der Pflanzen nehmen kann. In den ausgewählten Genotypen konnte unter beiden Wachstumsbedingungen kein streng linearer Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge und der Ertragsstabilität identifiziert werden (Abbildung 39a,b), wie es für die acht RNAseq-Genotypen der Fall war (Abbildung 35a). Die Aktivität der *PK* bildet letztlich einen Baustein im komplexen Geflecht verschiedenster Mechanismen, die Einfluss auf die Fitness der Pflanzen nehmen können, weshalb eine lineare Korrelation in einem Set heterogener Genotypen auch nicht zwangsläufig erwartet wurde. Wurden die Genotypen entsprechend der Aktivität der *PK* in zwei Gruppen eingeteilt, wies die Gruppe mit einer erhöhten *PK*-Aktivität eine signifikant gesteigerte Ertragsstabilität auf (Abbildung 39c). Demnach kann vermutet werden, dass die Aktivität dieser *PK* auch zur Ertragsstabilität in diesen Genotypen beiträgt. Die Aktivität der *PK* stand mit zwei Allelen in Verbindung (Abbildung 38) und kann somit bei der MAS analysiert werden. Die Verteilung der Allele folgte keiner Zugehörigkeit zu den Populationsclustern (Abbildung 17), weshalb eine voreingenommene Struktur in der genetischen Variabilität der Genotypen, während der Einteilung auf Basis der *PK*-Aktivitäten (Abbildung 39c), als gering eingestuft werden kann. Auf Grund der größeren Stichprobenanzahl wurde auch ein trockenstressvermittelter Anstieg in der Aktivität ermittelt (Abbildung 38), der in den RNAseq-Daten zuvor nicht beobachtet wurde. Dies unterstreicht die Relevanz für die Adaption an den Trockenstress.

Die Aktivität mehrerer Gene sollte in einem weiteren RGH-Experiment aus dem Jahr 2018 validiert werden, das, abgeschätzt an den Ertragsdaten (Tabelle 29), ein vergleichbares Wachstum der Pflanzen ermöglichte und potenziell nicht durch Hitzestress beeinflusst war (Abschnitt 1.6 und 3.2.7). Es wurden Gene getestet, die im Jahr 2016 mit der Ertragsstabilität in Verbindung standen. Die Aktivität von vier Genen war im Jahr 2016 und 2018 vergleichbar (Abbildung 40d,e,f,g,h). Für die *PK* traf dies sogar beim Vergleich von 12 Genotypen zu (Abbildung 40h) und nicht nur beim Vergleich der acht RNAseq-Genotypen (Abbildung 40g). Damit ist die Aktivität dieser Gene wahrscheinlich auch im Jahr 2018 weniger von den verschiedenen Wachstumsbedingungen, sondern primär durch genetische Determinanten bestimmt. Das Gen, das im Jahr 2016 geringe Unterschiede in der Transkriptmenge aufgewiesen hatte (Abschnitt 4.2.1), zeigte auch im Jahr 2018 eine geringe Dynamik, wodurch erneut kein linearer Zusammenhang erkennbar war (Abbildung 40c). Getestet wurden auch erneut zwei GLRs (Abbildung 40a,b). Nur für den Genotyp Barke, nicht jedoch für den Genotyp B0004 konnte im Jahr 2018 eine gesteigerte Transkriptmenge gemessen werden. Dies spricht dafür, dass, im Vergleich zu den Genen, die linear mit der Ertragsstabilität assoziiert waren und in beiden Jahren potenziell vor allem auf Grund verschiedener genetischer Hintergründe differentiell exprimiert waren (s.o.), dieses spezielle

Expressionsmuster womöglich deutlicher durch Umweltbedingungen beeinflusst wurde als zuvor vermutet. Detailliertere Interpretationsansätze konnten jedoch nicht gefunden werden.

Die Assoziation zwischen Ertragsstabilität und Genaktivität war im Jahr 2018 nur für die *Pyruvat-Kinase* (Abbildung 41j) und ein weiteres Gen (Abbildung 41f) auffindbar und konnte nicht auf weitere Genotypen ausgeweitet werden (Abbildung 41e, Abbildung 41i). Obwohl die Aktivität einiger Gene in den Jahren 2016 und 2018 vergleichbar war und die Pflanzen in beiden Jahren ähnliche Erträge lieferten (s.o.), kann vermutet werden, dass sich die individuellen Einflüsse der Gene auf die Ertragsleistung von Jahr zu Jahr unterschieden. Assoziationen finden sich womöglich hauptsächlich für Gene, die stets sehr deutlich und unter verschiedensten Wachstumsbedingungen Einfluss auf den Metabolismus der Pflanzen nehmen können. Detailliertere Analysen wären jedoch nötig, um fundiertere Aussagen treffen zu können.

4.2.11. Abschließende Anmerkungen, Fazit und Ausblick

Wie anhand der PCAs abgeschätzt werden konnte, wiesen die vier ertragsinstabilen Genotypen eine ähnlichere Transkriptomstruktur untereinander auf als die vier ertragsstabilen Genotypen (Abbildung 33). Wie diskutiert nahmen die Gene, die mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, darauf mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso einen Einfluss wie die Gene, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 stark exprimiert waren. Die Gene, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 sehr stark exprimiert waren, vermittelten im Jahr 2016 jedoch keine gesteigerte Ertragsstabilität im Vergleich zu den beiden anderen ertragsstabilen Genotypen Romilda und Aischa (Abbildung 11a). Es könnte spekuliert werden, dass die Gene, die in den beiden Genotypen Barke und B0004 stärker aktiv waren, auch pleiotrope Effekte auslösten. Auch ein positiver Effekt unter deutlicheren Stressbedingungen wäre denkbar. In den RGH-Experimenten der Jahre 2017 und 2018 gab es auch keine unumstößlichen Hinweise, dass die beiden Genotypen Barke und B0004 eine deutlich gesteigerte Fitness gegenüber den ertragsstabilen Genotypen Romilda und Aischa unter abiotischem Stress aufwiesen. Wie die Expressionsanalysen im Jahr 2018 zeigten, war dieser Phänotyp auch weniger ausgeprägt als im Jahr 2016. Nur unter sehr speziellen Voraussetzungen könnten diese Gene demnach einen Effekt auf die Ertragsstabilität haben.

Die ertragsstabilen Genotypen wiesen unter Trockenstress einen höheren Ertrag auf als die ertragsinstabilen Genotypen (Abbildung 11c). Die Gene, die positiv mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, waren unter Trockenstress auch überwiegend positiv mit dem Ertrag assoziiert (detaillierte Analysen nicht gezeigt). Die ertragsstabilen Genotypen wiesen unter

gut bewässerten Bedingungen einen geringeren Ertrag auf als die ertragsinstabilen Genotypen (Abbildung 11c). Damit waren die Gene, die positiv mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, unter gut bewässerten Bedingungen überwiegend negativ mit dem Ertrag assoziiert (detaillierte Analysen nicht gezeigt). Für die Gene, die negativ mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, wurden analoge Beobachtungen gemacht (nicht gezeigt). Auf Grund der Verteilung der Ertragsparameter und der daraus resultierenden Ertragsstabilität konnten keine Gene identifiziert werden, deren Aktivität positiv mit der Ertragsstabilität und positiv sowohl mit dem Ertrag unter gut bewässerten Bedingungen als auch unter Trockenstress assoziiert war. Gleiches galt für negative Assoziationen.

Unter dem Konzept des transkriptionellen *Primings* wurde diskutiert, dass Gene, die unter beiden Wachstumsbedingungen mit der Ertragsstabilität assoziiert waren, unabhängig von der Wachstumsbedingung Einfluss auf den Metabolismus und die Physiologie der Pflanzen nehmen konnten (Abschnitt 4.2.7f). Diese Veränderungen erlaubten den ertragsstabilen Genotypen potenziell besser auf den Trockenstress zu reagieren. Ein entscheidender Faktor für die bessere Reaktion könnte die gesteigerte Rate der Zellatmung sein. Die Versorgung von Adaptionsmechanismen mit Energie könnte unter Trockenstress von einer höheren Rate der Zellatmung profitieren (Abschnitt 4.2.8). Das Wachstum von Pflanzen beruht auf einem Gleichgewicht von Gewinn und Verlust von Photoassimilaten durch Photosynthese bzw. Zellatmung (Amthor 1984). Unter idealeren Wachstumsbedingungen könnte eine erhöhte Rate der Zellatmung zu einem unnötigen Verbrauch von Photoassimilaten führen und so die Entwicklung der Speichergewebe beeinträchtigen. Generell könnte die konstitutive Aktivität von Genen, die speziell für die Adaption an den Trockenstress wichtig sind, für die Pflanzen mit einem hohen Energieaufwand in Verbindung stehen, der sich negativ auf den Ertrag unter gut bewässerten Bedingungen auswirken könnte. Solche pleiotropen Effekte wurden bereits beschrieben (siehe Abschnitt 1.2 und 1.7.2).

Sollen neue Genotypen entwickelt werden, muss demnach die Aktivität von Genen, die unter dem Konzept des transkriptionellen *Primings* betrachtet wurden, auch stets im Kontext der generellen Ertragsleistung betrachtet werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht detaillierter dargestellt wurde. Anhand dieser Erkenntnis könnte in künftigen Analysen auch ein stärkerer Fokus auf Gene gelegt werden, deren Aktivität unter idealen Wachstumsbedingungen in allen Genotypen vergleichbar ist und nur unter Trockenstress mit der Ertragsstabilität in Verbindung steht. Zwei dieser Gene wurden in der technischen und biologischen Validierung bereits betrachtet. Ein *Calcyclin-bindendes Protein* (HORVU3Hr1G072900, Abbildung 36f, Abbildung 40f, Abbildung 41g,h) und eine *12-Oxophytodienoat-Reduktase* (HORVU4Hr1G086050, Abbildung 36d, Abbildung 40d, Abbildung 41c,d). Bei der *12-Oxophytodienoat-Reduktase*, die nur unter Trockenstress negativ mit der Ertragsstabilität

assoziiert war, handelt es sich nicht um das Gen, welches in allen acht Genotypen durch Trockenstress reprimiert wurde (Abschnitt 4.2.3), gibt jedoch einen weiteren Hinweis auf eine komplexe Regulation der Phytohormon-Homöostase. Konzeptionell umfassen Gene, die nur unter einer Wachstumsbedingung mit der Ertragsstabilität assoziiert sind auch Gene, die spezifisch in den ertragsstabilen oder ertragsinstabilen Genotypen durch Trockenstress differentiell exprimiert wurden (Abschnitt 4.2.6), oder Gene, die spezifisch stark durch den Trockenstress reguliert wurden. Letzteres wurde im Rahmen der globalen Analysen dieser Arbeit nicht betrachtet. Zusammenfassend wird deutlich, dass der generierte RNAseq-Datensatz noch unter multiplen Aspekten betrachtet werden kann, was weitere Erkenntnisse über die Adaption der Gerstenpflanzen an Trockenstress liefern wird.

5. Verzeichnisse

5.1. Literaturverzeichnis

- Abbasi** AR, et al. (2007) Specific roles of alpha- and gamma-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 143, 1720-1738, DOI: 10.1104/pp.106.094771
- Abe** H, et al. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 15, 63-78, DOI: 10.1105/tpc.006130
- Abebe** T, et al. (2010) Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn and seed. *Funct. Integr. Genomics* 10, 191-205, DOI: 10.1007/s10142-009-0149-4
- Ahmed** IM, et al. (2013) Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry* 63, 49-60, DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.11.004
- Almeida** J, et al. (2011) Genetic dissection of vitamin e biosynthesis in tomato. *J. Exp. Bot.* 62, 3781-3798, DOI: 10.1093/jxb/err055
- Aimar** D, et al. (2011) Drought Tolerance and Stress Hormones: From Model Organisms to Forage Crops. *Intech: From Model Organisms to Forage Crops* 6, DOI: 10.5772/24279
- Ambawat** S, et al. (2013) Myb transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19, 307-321, DOI: 10.1007/s12298-013-0179-1
- Amthor** JS (1984) The role of maintenance respiration in plant growth. *Plant, Cell & Environment* 7, 561-569, DOI: 10.1111/1365-3040.ep11591833
- André** CM, et al. (2009) Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry* 70, 1107-1116, DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.07.008
- Antunes** WC, et al. (2012) Changes in stomatal function and water use efficiency in potato plants with altered sucrolytic activity. *Plant, Cell & Environment* 35, 747-759, DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02448.x
- Armenteros** JJA, et al. (2019) Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life science alliance* 2, DOI: 10.26508/lsa.201900429
- Aslam** M, et al. (2010) Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1797, 1428-1438, DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.002
- Aspinall** D, et al. (1964) The effects of soil moisture stress on the growth of barley: I. Vegetative development and grain yield. *Aust. J. Agr. Res.* 15, 729-745
- Aspinall** D (1965) The effects of soil moisture stress on the growth of barley: II. Grain Growth. *Aust. J. Agr. Res.* 16, 265-275
- Atienza** SG, et al. (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167, 1359-1365, DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.07.006
- Baker** RF, et al. (2012) SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Molecular Plant* 5, 766-768, DOI: 10.1093/mp/sss054
- Barnabas** B, et al. (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 31, 11-38, DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x
- Bartoli** CG, et al. (1999) Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* 50, 375-383, DOI: 10.1093/jxb/50.332.375
- Bedada** G, et al. (2014). Transcriptome sequencing of two wild barley (*Hordeum spontaneum* L.) ecotypes differentially adapted to drought stress reveals ecotype-specific transcripts. *BMC Genomics* 15, 995, DOI: 10.1186/1471-2164-15-995
- Beier** S, et al. (2017) Construction of a map-based reference genome sequence for barley, *hordeum vulgare* L. *Sci. Data* 4, 170044, DOI: 10.1038/sdata.2017.44

- Belkhadir Y, et al. (2004)** Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current opinion in plant biology* 7, 391-399, DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.009
- Bergmeyer HU (1972)** Methoden der enzymatischen Analyse, Ed 2. Verlag Chemie Weinheim, Weinheim
- Binzel ML, Dunlap JR (1995)** Abscisic acid does not mediate NaCl-induced accumulation of 70-kDa subunit tonoplast H⁺-ATPase message in tomato. *Planta* 197, 563-568, DOI: 10.1007/BF00191561
- Blum A (1985)** Photosynthesis and transpiration in leaves and ears of wheat and barley varieties, *J. Exp. Bot.* 36, 432-440, DOI: 10.1093/jxb/36.3.432
- Blum A (2011)** Drought resistance and its improvement. *Plant Breeding for Water-Limited Environments*. 2011, New York: Springer New York, 53-152, DOI: 10.1007/978-1-4419-7491-4_3
- Bort J, et al. (1994)** Role of awns in ear water-use efficiency and grain weight in barley. *Agronomie* 2, 133-139
- Bowler C, et al. (2011)** Superoxide Dismutase in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13, 199-218, DOI: 10.1080/07352689409701914
- Bunyan J, et al. (1961)** Biological potencies of epsilon- and zeta-1-tocopherol and 5-methyltolcol. *Br. J. Nutr.* 15, 253-257, DOI: 10.1079/BJN19610030
- Cahoon EB, et al. (2003)** Metabolic redesign of vitamin e biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat. Biotechnol.* 21, 1082-1087, DOI: 10.1038/nbt853
- Campbell WH (2001)** Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 194-204, DOI: 10.1007/PL00000847
- Cattivelli L, et al. (2008)** Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 105, 1-14, DOI: 10.1016/j.fcr.2007.07.004
- Cela J, et al. (2009)** Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. *Plant Science* 177, 404-410, DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.07.001
- Cela J, et al. (2011)** Accumulation of γ - Rather than α -Tocopherol Alters Ethylene Signaling Gene Expression in the *vte4* Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 52, 1389-1400, DOI: 10.1093/pcp/pcr085
- Chamizo-Ampudia A, et al. (2017)** Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22, 163-174, DOI: 10.1016/j.tplants.2016.12.001
- Chaves MM, et al. (2002)** How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* 89, 907-916, DOI: 10.1093/aob/mcf105
- Chaves MM, et al. (2003)** Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239-264, DOI: 10.1071/FP02076
- Chen KM, et al. (2005)** Regulation of the structure and catalytic properties of plasma membrane H⁺-ATPase involved in adaptation of two reed ecotypes to their different habitats. *Biol. Planta* 49, 513e519, DOI: 10.1007/s10535-005-0044-3
- Chen L, et al. (2012a)** The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 120-128, DOI: 10.1016/j.bbagr.2011.09.002
- Chen LQ, et al. (2012b)** Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* 335, 207-211, DOI: 10.1126/science.1213351
- Chen D, et al. (2016)** Specific roles of tocopherols and tocotrienols in seed longevity and germination tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 244, 31-39, DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.12.005
- Chiba Y, et al. (2015)** Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *J. Plant Res.* 128, 679-686, DOI: 10.1007/s10265-015-0710-2
- Chiu J, et al. (1999)** Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Molecular biology and evolution* 16, 826-838, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026167

- Cho D**, et al. (2009) De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3. 1 impairs long-term Ca²⁺-programmed stomatal closure. *The Plant Journal* 58, 437-449, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03789.x
- Choi H**, et al. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275, 1723-1730, DOI: 10.1074/jbc.275.3.1723
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Choudhury S**, et al. (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* 8, e23681, DOI: 10.4161/psb.23681
- Collakova E, DellaPenna D** (2003) Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in arabidopsis. *Plant Physiol.* 131, 632-642, DOI: 10.1104/pp.015222
- Cousins AB**, et al. (2008) Peroxisomal malate dehydrogenase is not essential for photorespiration in Arabidopsis but its absence causes an increase in the stoichiometry of photorespiratory CO₂ release. *Plant physiology* 148, 786-795, DOI: 10.1104/pp.108.122622
- Cramer GR**, et al. (2013) Proteomic analysis indicates massive changes in metabolism prior to the inhibition of growth and photosynthesis of grapevine (*Vitis vinifera*L.) in response to water deficit. *BMC Plant Biology* 13, 49, DOI: 10.1186/1471-2229-13-49
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* 7, 859, DOI: 10.1105/2Ftpc.7.7.859
- Cruz de Carvalho MH** (2008) Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* 3, 156-165, DOI: 10.4161/psb.3.3.5536
- Czarnocka W, Karpiński S** (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic. Biol. Med.* 122, 4-20, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011
- Daryanto S**, et al. (2016) Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS ONE* 11:e0156362, DOI: 10.1371/journal.pone.0156362
- Datta R**, et al. (1999) Stress-mediated enhancement of β -amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light. *Journal of plant physiology* 154, 657-664, DOI: 10.1016/S0176-1617(99)80241-7
- Davies WJ, Zhang JH** (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 55-76, DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.000415
- Davies WJ**, et al. (2002) Stomatal control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytol.* 153, 449-460, DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00345.x
- De Bortoli S**, et al. (2016) Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms. *Biophysical chemistry* 218, 14-26, DOI: 10.1016/j.bpc.2016.07.004
- Deikman J**, et al. (2012) Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 243-350, DOI: 10.1016/j.copbio.2011.11.003
- DellaPenna D** (2005) Progress in the dissection and manipulation of vitamin e synthesis. *Trends Plant Sci.* 10, 574-579, DOI: 10.1016/j.tplants.2005.10.007
- DellaPenna D, Pogson BJ** (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 711-738, DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301
- Demirevska K**, et al. (2009) Drought stress effects on Rubisco in wheat: changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1129-1138, DOI: 10.1007/s11738-009-0331-2
- di Toppi LS**, et al. (2012) A bifasic response to cadmium stress in carrot: Early acclimatory mechanisms give way to root collapse further to prolonged metal exposure. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 269-279, DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.07.002
- Diab AA**, et al. (2004) Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1417-1425, DOI: 10.1007/s00122-004-1755-0

- Diepenbrock CH, et al. (2017)** Novel loci underlie natural variation in vitamin e levels in maize grain. *Plant Cell* 29, 2374-2392, DOI: 10.1105/tpc.17.00475
- Dingledine R, et al. (1999)** The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51, 7-62
- Do T, et al. (2015)** Effect of malting on antioxidant capacity and vitamin e content in different barley genotypes. *J. Inst. Brew.* 121, 531-540, DOI: 10.1002/jib.271
- Dobrota C (2006)** Energy dependant plant stress acclimation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 5, 243-251, DOI: 0.1007/s11157-006-0012-1
- Dodd IC (2005)** Root-to-shoot signalling: assessing the roles of "up" in the up and down world of long-distance signalling in planta. *Plant Soil* 274, 251-270, DOI: 10.1007/s11104-004-0966-0
- Dodd AN, et al. (2010)** The language of calcium signaling. *Annual review of plant biology* 61, 593-620, DOI: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628
- Dörmann P (2007)** Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta* 225, 269-276, DOI: 10.1007/s00425-006-0438-2
- Dreier W, et al. (1995)** Light-and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: β -amylases are stress-induced proteins. *Journal of plant physiology* 145, 342-348, DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81900-0
- Dresselhaus T, Hückelhoven R (2019)** Biotic and Abiotic Stress Responses in Crop Plants.- Editorial Sonderausgabe *Agronomy* 8, DOI: 10.3390/books978-3-03897-464-2
- Drummond AJ, et al. (2012)** Geneious v5.6 available from <http://www.geneious.com> (2012).
- Ellis RP, et al. (2000)** Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *J. Exp. Bot.* 51, 9-17, DOI: 10.1093/jexbot/51.342.9
- Espinoza A, et al. (2013)** Engineered drought-induced biosynthesis of α -tocopherol alleviates stress-induced leaf damage in tobacco. *Journal of Plant Physiology* 170, 1285-1294, DOI: 10.1016/j.jplph.2013.04.004
- Evanno G, et al. (2005)** Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Evans HM, Bishop KS (1922)** On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 1458, 650-651, DOI: 10.1126/science.56.1458.650
- Evans HM, et al. (1936)** The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin e. *J. Biol. Chem.* 113, 319-332, DOI: 10.1111/j.1753-4887.1974.tb06280.x
- Evers D, et al. (2010)** Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *J. Exp. Bot.* 61, 2327-2343, DOI: 10.1093/jxb/erq060
- Evert RF, et al. (1996)** Distribution and frequency of plasmodesmata in relation to photoassimilate pathways and phloem loading in the barley leaf. *Planta* 198, 572-579, DOI: 10.1007/BF00262644
- Eydam J (2018)** Studien zur Membranstabilität abiotisch gestresster Gerstensorten in Abhängigkeit vom Vitamin E Gehalt. Unveröffentlichte Bachelor-Arbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie (Sonnewald).
- Fahad S, et al. (2017)** Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Front Plant Sci* 8, 1147, DOI: 10.3389/fpls.2017.01147
- Falk J, et al. (2002)** The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J. Plant Physiol.* 159, 1245-1253, DOI: 10.1078/0176-1617-00804
- Falk J, et al. (2004)** Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* 65, 2977-2985, DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.08.047
- Falush D, et al. (2003)** Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587
- Falush D, et al. (2007)** Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7, 574-578, DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x

- Faris** JD, et al. (2000) Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. *Genetics* 154, 823-835
- Farooq** M, et al. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 185-212, DOI: 10.1051/agro:2008021
- Farouk** S (2011) Ascorbic acid and α -tocopherol minimize salt-induced wheat leaf senescence. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7, 58-79
- Fernie** AR, et al. (2020) Synchronization of developmental, molecular and metabolic aspects of source–sink interactions. *Nat. Plants* 6, 55-66, DOI: 10.1038/s41477-020-0590-x
- Fleury** D, et al. (2004) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J Exp Bot.* 61, 3211-3222, DOI: 10.1093/jxb/erq152
- Flexas** J, et al. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol.* 6, 269-279, DOI: 10.1055/s-2004-820867
- Flexas** J, et al. (2005) The effects of drought in plant respiration. In: Lambers H, Ribas-Carbó M (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration 18. Plant Respiration: from Cell to Ecosystem*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 85-94
- Forde** BG, **Roberts** MR (2014) Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000prime reports* 6, DOI: 10.12703%2FP6-37
- Franks** PJ, **Farquhar** GF (2007) The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Phys.* 143, 78-87, DOI: 10.1104/pp.106.089367
- Fritsche** S, et al. (2012) A candidate gene-based association study of tocopherol content and composition in rapeseed (*brassica napus*). *Front. Plant Sci.* 3, 129, DOI: 10.3389/fpls.2012.00129
- Fritsche** S, et al. (2017) Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin e improved crops. *Antioxidants (Basel)* 6, 20-37, DOI: 10.3390/antiox6040099
- Fukuda** A, et al. (1998) Na⁺/H⁺ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. *Plant and Cell Physiology* 39, 196-201, DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029357
- Fukuda** A, et al. (2004) Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany* 55, 585-594, DOI: 10.1093/jxb/erh070
- George** TS, et al. (2014) Understanding the genetic control and physiological traits associated with rhizosheath production by barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 203, 195-205, DOI: 10.1111/nph.12786
- George** TS, et al. (2017) Climate Change and Consequences for Potato Production: a Review of Tolerance to Emerging Abiotic Stress. *Potato Research* 60, 239-268, DOI: 10.1007/s11540-018-9366-3
- Gill** SS, **Tuteja** N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Phys. And Biochem.* 48, 909-930, DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Giuliani** S, et al. (2005) Microarray analysis of backcrossed-derived lines differing for root-ABA1, a major QTL controlling root characteristics and ABA concentration in maize. *From the Green Revolution to the Gene Revolution* 463-490
- Givan** CV (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biological Reviews* 74, 277-309, DOI: 10.1111/j.1469-185X.1999.tb00188.x
- Gliszczynska-Świątło** A, et al. (2007) Tocopherol content in edible plant oils. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57, 157-161
- Goel** P, **Singh** AK (2015) Abiotic stresses downregulate key genes involved in nitrogen uptake and assimilation in brassica juncea l. *PLoS ONE* 10, e0143645, DOI: 10.1371/journal.pone.0143645
- Gołębiewska-Pikania** G, et al. (2017) Changes in protein abundance and activity involved in freezing tolerance acquisition in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Proteomics* 169, 58-72, DOI: 10.1016/j.jprot.2017.08.019

- Gómez R**, et al. (2019) Manipulation of oxidative stress responses as a strategy to generate stress-tolerant crops. From damage to signaling to tolerance. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 693-708, DOI: 10.1080/07388551.2019.1597829
- Gong DS**, et al. (2010) Early activation of plasma membrane H⁺-ATPase and its relation to drought adaptation in two contrasting oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Environmental and experimental botany* 69, 1-8, DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.02.011
- González A**, et al. (1999) Barley yield in water-stress conditions.: The influence of precocity, osmotic adjustment and stomatal conductance. *Field Crop research* 62, 23-34, DOI: 10.1016/S0378-4290(99)00002-7
- Gonzalez-Guzman M**, et al. (2012) Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* 24, 2483-2496, DOI: 10.1105/tpc.112.098574
- Górnaś P**, et al. (2015) Varied composition of tocochromanols in different types of bran: rye, wheat, oat, spelt, buckwheat, corn, and rice. *Int. J. Food Prop.* 19, 1757-1764, DOI: 10.1080/10942912.2015.1107843
- Graebner RC**, et al. (2015) Quantitative trait loci associated with the tocochromanol (vitamin e) pathway in barley. *PLoS One* 10, e0133767, DOI: 10.1371/journal.pone.0133767
- Grimm DG**, et al. (2017) easyGWAS: A Cloud-Based Platform for Comparing the Results of Genome-Wide Association Studies. *The Plant Cell* 29, 5-19, DOI: 10.1105/tpc.16.00551
- Gunasekera D**, et al. (1994) Wild and cultivated barley genotypes demonstrate varying ability to acclimate to plant water deficits. *Plant Science* 99, 125-134, DOI: 10.1016/0168-9452(94)90169-4
- Guo P**, et al. (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *J. Exp. Bot.* 60, 3531-3544, DOI: 10.1093/jxb/erp19
- Gupta AS**, et al. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *PNAS* 15, 1626-1633, DOI: 10.1073/pnas.90.4.1629
- Gutierrez-Gonzalez JJ**, et al. (2013) A developmental profile of tocol accumulation in oat seeds. *J. Cereal Sci.* 57, 79-83, DOI: 10.1016/j.jcs.2012.10.001
- Harlan HV, Martini ML** (1936) Problems and Results in Barley Breeding. Division of Cereal Crops and Diseases, Bureau of Plant Industry
- Harlan JR, Zohary D** (1966) Distribution of wild wheats and barley. *Science* 153, 1074-1080, DOI: 10.1126/science.153.3740.1074
- Hayden B**, et al. (2012) What Was Brewing in the Natufian? An Archaeological Assessment of Brewing Technology in the Epipaleolithic. *J. of Arch. Method and Theory* 20, 102-150, DOI: 10.1007/s10816-011-9127-y
- Hasanuzzaman M**, et al. (2014) Chapter 12 - Role of tocopherol (vitamin e) in plants: abiotic stress tolerance and beyond in Emerging Technologies And Management Of Crop Stress Tolerance (ed. Ahmad P, Rasool S) 267-289, DOI: 10.1016/B978-0-12-800875-1.00012-0
- Hazen SP**, et al. (2005) Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional and Integrative Genomics* 5, 104-116, DOI: 10.1007/s10142-004-0126-x
- Heath RL, Packer L** (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. A. Biophys.* 125, 189-198, DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1
- Hedrich R** (2012) Ion channels in plants. *Physiological reviews*, DOI: 10.1152/physrev.00038.2011
- Henikoff S**, et al. (1997) Genome families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 278, 609-614, DOI: 10.1126/science.278.5338.609
- Hernández I**, et al. (2004) Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology* 24, 1303-1311, DOI: 10.1093/treephys/24.11.1303
- Hey SJ**, et al. (2010).The interface between metabolic and stress signalling. *Ann. Bot.* 105, 197-203, DOI: 10.1093/aob/mcp285

- Hofius D, Sonnewald U (2003)** Vitamin e biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* 8, 6-8, DOI: 10.1016/S1360-1385(02)00002-X
- Honsdorf N, et al. (2014)** High-Throughput Phenotyping to Detect Drought Tolerance QTL in Wild Barley Introgression Lines. *PLoS One* 9, e97047, DOI: 10.1371/journal.pone.0097047
- Hsieh MH, et al. (1998)** A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13965-13970, DOI: 10.1073/pnas.95.23.13965
- Hu H, Xiong L (2014)**. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 715-741, DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040000
- Hubisz MJ, et al. (2009)** Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Notes* 9, 1322-1332, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Hubner S, et al. (2015)** RNA-Seq analysis identifies genes associated with differential reproductive success under drought-stress in accessions of wild barley *Hordeum spontaneum*. *BMC Plant Biol.* 15, 134, DOI: 10.1186/s12870-015-0528-z
- Hummel I, et al. (2010)** Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant physiology* 154, 357-372, DOI: 10.1104/pp.110.157008
- Hussain N, et al. (2013)** Biosynthesis, Structural, and Functional Attributes of Tocopherols in Planta; Past, Present, and Future Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6137-6149, DOI: 10.1021/jf4010302
- IBGSC (2012)** A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711–717, DOI: 10.1038/nature11543
- Iovieno P, et al. (2016)** Transcriptomic changes drive physiological responses to progressive drought stress and rehydration in tomato. *Front. Plant Sci.* 7, 1-14, DOI: 10.3389/fpls.2016.00371
- Jackson RB, et al. (2000)** Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends Plant. Sci.* 5, 482-488, DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01766-0
- Jakoby M, et al. (2002)** bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 7, 106-111, DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02223-3
- Janiak A, et al. (2018)**. No Time to Waste: Transcriptome Study Reveals that Drought Tolerance in Barley May Be Attributed to Stressed-Like Expression Patterns that Exist before the Occurrence of Stress. *Front Plant Sci.* 8, 2212, DOI: 10.3389/fpls.2017.02212
- Jeng TL, et al. (2012)** γ -oryzanol, tocol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1468-1474, DOI: 10.1002/jsfa.4728
- Jiang J, et al. (2016)** Overexpression of medicago sativa tmt elevates the α -tocopherol content in arabidopsis seeds, alfalfa leaves, and delays dark-induced leaf senescence. *Plant Sci.* 249, 93-104, DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.05.004
- Jin L, et al. (2019)** Genome-wide analysis of sulfotransferase genes and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *PLoS ONE* 14, e0221422, DOI: 10.1371/journal.pone.0221422
- Jones HG (2014)** *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*. Cambridge: Cambridge University Press, DOI: 10.1017/CBO9780511845727
- Jorgensen EM (2014)** Animal evolution: looking for the first nervous system. *Current Biology* 24, R655-R658, DOI: 10.1016/j.cub.2014.06.036
- Kabbage M, Dickman MB (2008)** The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 1390-1402, DOI: 10.1007/s00018-008-7535-2
- Kanayama Y, et al. (2013)** Seasonal changes in abiotic stress tolerance and concentrations of tocopherol, sugar, and ascorbic acid in sea buckthorn leaves and stems. *Scientia Horticulturae* 164, 232-237, DOI: 10.1016/j.scienta.2013.09.039
- Kanehisa M, Sato Y (2020)** KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci.* 29, 28-35, DOI: 10.1002/pro.3711

- Kang J, et al. (2004)** The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1. 1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant and Cell Physiology* 45, 1380-1389, DOI: 10.1093/pcp/pch159
- Kaplan F, Guy CL (2004)** β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant physiology* 135, 1674-1684, DOI: 10.1104/pp.104.040808
- Kaplan F, Guy CL (2005)** RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *The Plant Journal* 44, 730-743, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02565.x
- Karamanos AJ, Papatheohari AY (1999)** Assessment of drought resistance of crop genotypes by means of the water potential index. *Crop Sci.* 39, 1792-1797, DOI: 10.2135/cropsci1999.3961792x
- Karlusich JJP, et al. (2017)** Chloroplast Redox Status Modulates Genome-Wide Plant Responses during the Non-host Interaction of Tobacco with the Hemibiotrophic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Front. Plant Sci.* 8, 1158, DOI: 10.3389/fpls.2017.01158
- Karrer P, et al. (1938)** Synthesis of α -tocopherol (vitamin e). *Nature* 141, 1057, DOI: 10.1038/1411057d0
- Kawasaki S, et al. (2001)** Temporal succession of salt stress responses in rice by microarray analysis. *The Plant Cell* 12, 889-906
- Keates SE, et al. (2003)** Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol.* 132, 1610-1622, DOI: 10.1104/pp.102.019836
- Kebede A, et al. (2019)** Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. *Advances in Agronomy* 156, 265-314, DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008
- Keller Y, et al. (1998)** Metabolic compartmentation of plastid prenyl lipid biosynthesis. evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur. J. Biochem.* 251, 413-417, DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510413.x
- Kirsch M, et al. (1996)** Salt stress induces an increased expression of V-type H⁺-ATPase in mature sugar beet leaves. *Plant Molecular Biology* 32, 543-547, DOI: 10.1007/BF00019107
- Klinkenberg J, et al. (2014)** Two Fatty Acid Desaturases, STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN Δ 9-DESATURASE6 and FATTY ACID DESATURASE3, Are Involved in Drought and Hypoxia Stress Signaling in *Arabidopsis* Crown Galls. *Plant Physiology* 164, 570-583, DOI: 10.1104/pp.113.230326
- Kondrák M, et al. (2012)** Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol.* 12, 74, DOI: 10.1186/1471-2229-12-74
- Kong D, et al. (2015)** *Arabidopsis* glutamate receptor homolog3. 5 modulates cytosolic Ca²⁺ level to counteract effect of abscisic acid in seed germination. *Plant physiology* 167, 1630-1642, DOI: 10.1104/pp.114.251298
- Krapp A, et al. (2014)** Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 65, 789-798, DOI: 10.1093/jxb/eru001
- Krasensky J, Jonak C (2012)** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany* 63, 1593-1608, DOI: 10.1093/jxb/err460
- Kreps JA, et al. (2002)** Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130, 2129-2141, DOI: 10.1104/pp.008532
- Kumar S, et al. (2013)** α -Tocopherol Application Modulates the Response of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings to Elevated Temperatures by Mitigation of Stress Injury and Enhancement of Antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation* 32, 307-314, DOI: 10.1007/s00344-012-9299-z
- Kwasniewski M, et al. (2016)** Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water-deficiency conditions. *J. Exp. Bot.* 67, 1079-1094, DOI: 10.1093/jxb/erv498
- Lam HM, et al. (1996)** The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual review of plant biology* 47, 569-593, DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.569

- Lam HM, et al. (1998)** Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396, 125-126, DOI: 10.1038/24066
- Lan L, et al. (2005)** Microarray analysis reveals similarities and variations in genetic programs controlling pollination/fertilization and stress responses in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Molecular Biology* 59, 151-164, DOI: 10.1007/s11103-005-3958-4
- Lancashire PD, et al. (1991)** A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119, 561-601, DOI: 10.1111/j.1744-7348.1991.tb04895.x
- Langridge P, et al. (2006)** Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 4, 343-354, DOI: 10.1093/bfgp/eli005
- Langridge P, Reynolds MP (2015)** Genomic tools to assist breeding for drought tolerance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 130-135, DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.027
- Lee KH, et al. (2006)** Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126, 1109-1120, DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.034
- Lehr A, et al. (1999)** cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Molecular Biology* 39, 463-475, DOI: 10.1023/A:1006158310891
- Lesk C, et al. (2016)**. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature* 529, 84-87, DOI: 10.1038/nature16467
- Li H, et al. (2010)** Identification of qtl underlying vitamin e contents in soybean seed among multiple environments. *Theor. Appl. Genet.* 120, 1405-1413, DOI: 10.1007/s00122-010-1264-2
- Li F, et al. (2015)** Autophagic Recycling Plays a Central Role in Maize Nitrogen Remobilization, *The Plant Cell* 27, 1389-1408, DOI: 10.1105/tpc.15.00158
- Li C, et al. (2016)** Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. *Sci. Rep.* 6, 25698, DOI: 10.1038/srep25698
- Liang X, Zhou JM (2018)** Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69, 267-299, DOI: 10.1146/annurev-arplant-042817-040540
- Lipka AE, et al. (2013)** Genome-wide association study and pathway-level analysis of tocopherol levels in maize grain. *G3-GENES GENOM GENET.* 3, 1287-1299, DOI: 10.1534/g3.113.006148
- Liu X, et al. (2008)** Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters* 30, 1275-1280, DOI: 10.1007/s10529-008-9672-y
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402-408, DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- Livanos P, et al. (2014)** The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant signaling & Behavior* 3, e28069, DOI: 10.4161/psb.28069
- Livingston AK, et al. (2009)** An *Arabidopsis* mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NDH complex. *The Plant Cell* 22, 221-233, DOI: 10.1105/tpc.109.071084
- Livingston AK, et al. (2010)** Regulation of cyclic electron flow in C3 plants: differential effects of limiting photosynthesis at ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant, cell & environment* 33, 1779-1788, DOI: 10.1111/j.1365-3040.2010.02183.x
- Lizarazo K, et al. (2010)** Ageing and irradiance enhance vitamin e content in green edible tissues from crop plants. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1994-1999, DOI: 10.1002/jsfa.4043
- Lobell DB, et al. (2011)** Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333, 616-620, DOI: 10.1126/science.1204531
- Love MI, et al. (2014)** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550, DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8

-
- Lu YAN, Sharkey TD (2006)** The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell & Environment* 29, 353-366, DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01480.x
- Lu G, et al. (2014)** Application of T-DNA activation tagging to identify glutamate receptor-like genes that enhance drought tolerance in plants. *Plant cell reports* 33, 617-631, DOI: 10.1007/s00299-014-1586-7
- Ludlow MM (1989)** Strategies of response to water-stress. In: *Structural and Functional Responses to Environmental Stresses: Water Shortage*. The Hague: SPB Academic Publishing 269-281
- Luo M, et al. (2005)** Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Science* 169, 695-703, DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.05.020
- Ma Y, et al. (2009)** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064-1068, DOI: 10.1126/science.1172408
- Mahan JR, et al. (1995)** Methods for reducing the adverse effects of temperature stress on plants: a review. *Environ. Exp. Bot.* 35, 251-258, DOI: 10.1016/0098-8472(95)00011-6
- Mane SP, et al. (2008)** Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Funct. Plant Biol.* 35, 669-688, DOI: 10.1071/FP07293
- Manor D, Morley S (2007)** The alpha-tocopherol transfer protein. *Vitam. Horm.* 76, 45-65, DOI: 10.1016/S0083-6729(07)76003-X
- Manzoor H, et al. (2013)** Involvement of the glutamate receptor A t GLR 3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *The Plant Journal* 76, 466-480, DOI: 10.1111/tbj.12311
- Martinoia E, et al. (2002)** Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355, DOI: 10.1007/s004250100661
- Maruyama K, et al. (2009)** Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant physiology* 150, 1972-1980, DOI: 10.1104/pp.109.135327
- Marwede V, et al. (2005)** Mapping of qtl controlling tocopherol content in winter oilseed rape. *Plant Breed.* 124, 20-26, DOI: 10.1111/j.1439-0523.2004.01050.x
- Mascher M, et al. (2017)** A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544, 427-433, DOI: 10.1038/nature22043
- Mauricio R (2001)** Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nat. Rev. Genet.* 2, 370-381, DOI: 10.1038/35072085
- Melcher K, et al. (2009)** A gate-latch-lock mechanism for hormone signaling by abscisic acid receptors. *Nature* 462, 602-608, DOI: 10.1038/nature08613
- Michalek W, et al. (2002)** EST analysis in barley defines a unigene set comprising 4,000 genes. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 97-103, DOI: 10.1007/s001220200011
- Mikołajczak K, et al. (2016)** Quantitative Trait Loci for Yield and Yield-Related Traits in Spring Barley Populations Derived from Crosses between European and Syrian Cultivars. *PLoS One* 11, e0155938, DOI: 10.1371/journal.pone.0155938
- Miller JD, et al. (1999)** Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 1015-1024, DOI: 10.1104/pp.120.4.1015
- Miller ND, et al. (2010)** Detection of a gravitropism phenotype in glutamate receptor-like 3.3 mutants of *Arabidopsis thaliana* using machine vision and computation. *Genetics* 186, 585-593, DOI: 10.1534/genetics.110.118711
- Mohammadi PP, et al. (2012)** Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *Amino Acids* 43, 2137-2152, DOI: 10.1007/s00726-012-1299-6
- Monroe JD, et al. (2014)** β -Amylase1 and β -amylase3 are plastidic starch hydrolases in *Arabidopsis* that seem to be adapted for different thermal, pH, and stress conditions. *Plant Physiology* 166, 1748-1763, DOI: 10.1104/pp.114.246421
-

- Moran** JF, et al. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194, 346-352, DOI: 10.1007/BF00197534
- Munné-Bosch** S, et al. (1999) Enhanced Formation of α -Tocopherol and Highly Oxidized Abietane Diterpenes in Water-Stressed Rosemary Plants. *Plant Phys.* 121, 1047-1051, DOI: 10.1104/pp.121.3.1047
- Munné-Bosch** S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743-748, DOI: 10.1016/j.jplph.2005.04.022
- Munné-Bosch** S, **Alegre** L (2013) Drought-Induced Changes in the Redox State of α -Tocopherol, Ascorbate, and the Diterpene Carnosic Acid in Chloroplasts of Labiatae Species Differing in Carnosic Acid Contents. *Plant Physiology* 131, 1816-1825, DOI: 10.1104/pp.102.019265
- Munné-Bosch** S, **Peñuelas** J (2003) Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *pistacia lentiscus* L. grown under mediterranean field conditions. *Ann. Bot.* 92, 385-391, DOI: 10.1093/aob/mcg152
- Muñoz-Amatriáin** M, et al. (2014) The usda barley core collection: genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies. *PLoS One* 9, e94688, DOI: 10.1371/journal.pone.0094688
- Müller** L, et al. (2010) In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 731-742, DOI: 10.1002/mnfr.200900399
- Müller** M, **Munné-Bosch** S (2015) Ethylene response actors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiol.* 169, 32-41, DOI: 10.1104/pp.15.00677
- Nagarajan** R, **Gill** KS (2018) Evolution of Rubisco activase gene in plants. *Plant Mol. Biol.* 96, 69-87, DOI: 10.1007/s11103-017-0680-y
- Narasimhan** ML, et al. (1991) NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiology* 97, 562-568, DOI: 10.1104/pp.97.2.562
- Nese** S, **Schnurbusch** T (2012) A genetic playground for enhancing grain number in cereals. *Trends in plant science* 17, 91-101, DOI: 10.1016/j.tplants.2011.11.003
- Nevo** E (2006) Genome evolution of wild cereal diversity and prospects for crop improvement. *Plant Genetic Resour. Charact. Util.* 4, 1479-2621, DOI: 10.1079/PGR2006108
- Newman** RK, **Newman** CW (2008) Current status of global barley production and utilization in *Barley For Food And Health: Science, Technology, And Products* (ed. Newman RK, Newman CW) 204-209, (John Wiley & Sons, Inc., 2008), DOI: 10.1002/9780470369333.ch9
- Nishi** T, **Forgac** M (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases - nature's most versatile proton pumps. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 94-103, DOI: 10.1038/nrm729
- Norris** SR, et al. (1998) Complementation of the arabidopsis pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* 117, 1317-1323, DOI: 10.1016/j.tplants.2005.10.007
- Nguyen** TTT, et al. (2004) Saturation mapping of QTL regions and identification of putative candidate genes for drought tolerance in rice. *Mol. Genet. Genomics* 272, 35-46, DOI: 10.1007/s00438-004-1025-5
- Outlaw** WH, **Manchester** J (1979) Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology* 64, 79-82, DOI: 10.1104/pp.64.1.79
- Ouyang** SQ, et al. (2011) The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rice (*Oryza sativa*). *Science China Life Sciences* 54, 181-188, DOI: 10.1007/s11427-011-4138-1
- Ozturk** ZN, et al. (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48, 551-573, DOI: 10.1023/A:1014875215580
- Pageau** K, et al. (2006) The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of experimental botany* 57, 547-557, DOI: 10.1093/jxb/erj035

- Pan L, et al. (2016)** Transcriptional profiles of drought-related genes in modulating metabolic processes and antioxidant defenses in *Lolium multiflorum*. *Frontiers in Plant Science* 7, 519, DOI: 10.3389/fpls.2016.00519
- Panfili G, et al. (2003)** Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3940-3944, DOI: 10.1021/jf030009v
- Park SY, et al. (2009)** Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068-1071, DOI: 10.1126/science.1173041
- Parker J, Newstead S (2014)** Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507, 68-72, DOI: 10.1038/nature13116
- Pasam RK, et al. (2012)** Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. *BMC Plant Biol.* 12, 16, DOI: 10.1186/1471-2229-12-16
- Pereral Y, et al. (1995)** Several distinct genes encode nearly identical 16 kDa proteolipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29, 227-244, DOI: 10.1007/bf00043648
- Peterson DM (1995)** Oat tocots: Concentration and stability in oat products and distribution within the kernel. *Cereal Chem.* 72, 21-24
- Pilkis SJ, Granner DK (1992)** Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54, 885-889, DOI: 10.1146/annurev.ph.54.030192.004321
- Plaxton WC, Podesta FE (2006)** The functional organization and control of plant respiration. *Crit Rev Plant Sci* 25, 159-198, DOI: 10.1080/07352680600563876
- Podesta FE, Plaxton WC (1991a)** Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor oil seeds. *Biochem J* 279, 495-501, DOI: 10.1042/bj2790495
- Podesta FE, Plaxton WC (1991b)** Association of phosphoenolpyruvate phosphatase activity with the cytosolic pyruvate kinase of germinating mung beans. *Plant Physiol* 97, 1329-1933, DOI: 10.1104/pp.97.4.1329
- Porfirova S, et al. (2002)** Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12495-12500, DOI: 10.1073/pnas.182330899
- Praba ML, et al. (2009)** Identification of physiological traits underlying cultivar differences in drought tolerance in rice and wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 195, 30-46, DOI: 10.1111/j.1439-037X.2008.00341.x
- Prasch CM, Sonnewald U (2013)** Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant physiology* 162, 1849-1866, DOI: 10.1104/pp.113.221044
- Prasch CM, et al. (2015)** β -amylase1 mutant *Arabidopsis* plants show improved drought tolerance due to reduced starch breakdown in guard cells. *Journal of experimental botany* 66, 6059-6067, DOI: 10.1093/jxb/erv323
- Price AH, et al. (1989)** Plants Under Drought-Stress Generate Activated Oxygen. *Free Radical Research Communications* 8, 61-66, DOI: 10.3109/10715768909087973
- Price MB, et al. (2012)** Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Frontiers in Plant Science* 3, 235, DOI: 10.3389/fpls.2012.00235
- Pritchard JK, et al. (2000)** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959
- Qi Z (2006)** Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant physiology* 142, 963-971, DOI: 10.1104/pp.106.088989
- Quadrana L, et al. (2014)** Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits. *Nat. Commun.* 5, 3027, DOI: 10.1038/ncomms5027
- Rabbani MA, et al. (2003)** Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* 133, 1755-1767, DOI: 10.1104/pp.103.025742

- Ray D**, et al. (2016) Plant Stress Response: Hsp70 in the Spotlight. In: Asea A, Kaur P, Calderwood S (eds) Heat Shock Proteins and Plants. Heat Shock Proteins, 10. Springer Cham., DOI: 10.1007/978-3-319-46340-7_7
- Rejeb IB**, et al. (2014) Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. Plants 3, 458-475, DOI: 10.3390/plants3040458
- Rensink WA**, **Buell CR** (2005) Microarray expression profiling resources for plant genomics. Trends in Plant Science 10, 603-609, DOI: 10.1016/j.tplants.2005.10.003
- Rigotti A** (2007) Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin e. Mol. Aspects Med. 28, 423-436, DOI: 10.1016/j.mam.2007.01.002
- Rise M**, et al. (1989) Accumulation of alpha-tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. Plant Physiol. 89, 1028-1030, DOI: 10.1104/pp.89.4.1028
- Rizhsky L**, et al. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiology 130, 1143-1151, DOI: 10.1104/pp.006858
- Rizhsky L**, et al. (2004) When defense pathways collide: the response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. Plant Physiol. 134, 1683-1696, DOI: 10.1104/pp.103.033431
- Robertson M** (2003) Increased dehydrin promoter activity caused by HvSPY is independent of the ABA response pathway. Plant J. 34, 39-46, DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2003.01697.x
- Rocha M**, et al. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of Lotus japonicus. Plant Physiology 152, 1501-1513, DOI: 10.1104/pp.109.150045
- Rodrigues FA**, et al. (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. Plant Sci. 176, 286-302, DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.11.007
- Romero AP**, et al. (2017) Physiological assessment of water stress in potato using spectral information. Front. Plant Sci. 8, 1608, DOI: 10.3389/fpls.2017.01608
- Rucker KS**, et al. (1995). Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits. Peanut Sci. 24, 14-18, DOI: 10.3146/pnut.22.1.0003
- Sage RF** (2016) A portrait of the C4 photosynthetic family on the 50th anniversary of its discovery: species number, evolutionary lineages, and Hall of Fame. Journal of Experimental Botany 67, 4039-4056, DOI: 10.1093/jxb/erw156
- Sahoo KK**, et al. (2013). Taming drought stress in rice through genetic engineering and transcription factors and protein kinases. Plant Stress 1, 60-72
- Samarah NH** (2005) Effects of drought stress on growth and yield of barley. Agron. Sustain. Dev. 25, 145-149, DOI: 10.1051/agro:2004064
- Sanchez-Aguayo I**, et al. (1991) Cytochemical localization of ATPase activity in salt-treated and salt-free grown Lycopersicon esculentum roots. Plant Physiology 96, 153-158, DOI: 10.1104/pp.96.1.153
- Sánchez-Díaz M**, et al. (2002) Effects of Soil Drought and Atmospheric Humidity on Yield, Gas Exchange, and Stable Carbon Isotope Composition of Barley. Photosynthetica 40, 415-421
- Sandorf I**, **Holländer-Czytko H** (2002) Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Planta 216, 173-179, DOI: 10.1007/s00425-002-0888-0
- Sanmartin M**, et al. (2007) Divergent functions of VTI12 and VTI11 in trafficking to storage and lytic vacuoles in Arabidopsis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 3645-3650, DOI: 10.1073/pnas.0611147104
- Sattler SE**, et al. (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. Plant Physiol. 132, 2184-2195, DOI: 10.1104/pp.103.024257
- Sattler SE**, et al. (2004) Vitamin e is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. Plant Cell 16, 1419-1432, DOI: 10.1105/tpc.021360

- Savage JA, et al. (2016)** Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? *Plant Cell Environment* 39, 709-725, DOI: 10.1111/pce.12602
- Sayed MA, et al. (2012)** AB-QTL analysis reveals new alleles associated to proline accumulation and leaf wilting under drought stress conditions in barley (*Hordeum vulgare*L.) *BMC Genetics* 13, 61, DOI: 10.1186/1471-2156-13-61
- Schapendonk AHCM, et al. (1989)** Effects of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars. *Potato Research* 32, 17-32, DOI: 10.1007/BF02365814
- Schäfer N, et al. (2018)** A tandem amino acid residue motif in guard cell SLAC1 anion channel of grasses allows for the control of stomatal aperture by nitrate. *Current Biology* 28, 1370-1379, DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.027
- Schnyder H (1993)** The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling - a review. *New Phytologist* 123, 133-245, DOI: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03731.x
- Schroeder JI, et al. (2001)** Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410, 327-330, DOI: 10.1038/35066500
- Schulze ED, Hall AE (1982)** Stomatal responses, waterloss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. *Physiological Plant Ecology II*, Berlin, Heidelberg: Springer, 181-230, DOI: 10.1007/978-3-642-68150-9_8
- Schuy C, et al. (2019)** Deciphering the genetic basis for vitamin e accumulation in leaves and grains of different barley accessions. *Scientific Reports* 9, 9470, DOI: 10.1038/s41598-019-45572-7
- Seki M, et al. (2002)** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31, 279-292, DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01359.x
- Sharma P, et al. (2012)** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012, e217037, DOI: 10.1155/2012/217037
- Sharma S, et al. (2013)** Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Front. Plant Sci.* 4, 309, DOI: 10.3389/fpls.2013.00309
- Shima S, et al. (1998)** Activation and thermostabilization effects of cyclic 2, 3-diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Archives of microbiology* 170, 469-472, DOI: 10.1007/s002030050669
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007)** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58, 221-227, DOI: 10.1093/jxb/erl164
- Shintani D, DellaPenna D (1998)** Elevating the vitamin e content of plants through metabolic engineering. *Science* 282, 2098-2100, DOI: 10.1126/science.282.5396.2098
- Shaw EJ, et al. (2010)** Molecular mapping of soybean seed tocopherols in the cross 'oac bayfield' x 'oac shire'. *Plant Breed.* 136, 83-93, DOI: 10.1111/pbr.12437
- Shutu X, et al. (2012)** Dissecting tocopherols content in maize (*zea mays* L.), using two segregating populations and high-density single nucleotide polymorphism markers. *BMC Plant Biol.* 12, 201, DOI: 10.1186/1471-2229-12-201
- Siles L, et al. (2013)** Vitamin e analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the arecaceae family. *Phytochemistry* 95, 207-214, DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.07.008
- Singh TN, et al. (1972)** Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biology* 236, 188-190, DOI: 10.1038/newbio236188a0
- Singh RK, et al. (2011)** Activation of ethylene-responsive p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. *J. Exp. Bot.* 62, 3375-3385, DOI: 10.1093/jxb/err006
- Sivitz AB, et al. (2005)** Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant and Cell Physiology* 46, 1666-1673, DOI: 10.1093/pcp/pci182

- Soll J, et al. (1980)** Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 544-550, DOI: 10.1016/0003-9861(80)90066-1
- Soll J, et al. (1985)** Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 238, 290-299, DOI: 10.1016/0003-9861(85)90167-5
- Sookwong P, et al. (2009)** Cross-fertilization for enhancing tocotrienol biosynthesis in rice plants and qtl analysis of their f2 progenies. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4620-4625, DOI: 10.1021/jf900394t
- Sperry JS, et al. (2017)** Predicting stomatal responses to the environment from the optimization of photosynthetic gain and hydraulic cost. *Plant Cell Environ.* 40, 816-830, DOI: 10.1111/pce.12852
- Spitters CJT, Schapendonk A (1990)** Evaluation of breeding strategies for drought tolerance in potato by means of crop growth simulation. *Plant Soil* 123, 193-203, DOI: 10.1007/BF00011268
- Sreenivasulu N, et al. (2010)** Barley Grain Development: Toward an Integrative View. *International Review of Cell and Molecular Biology* 281, 49-89, DOI: 10.1016/S1937-6448(10)81002-0
- Stephens NR, et al. (2008)** Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the GLR3. 3 and GLR3. 4 genes. *Plant Physiology* 146, 529-538, DOI: 10.1104/pp.107.108134
- Sung DY, et al. (2001)** Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Phys. Plan.* 113, 443-451, DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1130402.x
- Suprunova TT, et al. (2004)** Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant Cell and Env.* 27, 1297-1308, DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01237.x
- Svoboda P, et al. (2016)** Global scale transcriptional profiling of two contrasting barley genotypes exposed to moderate drought conditions: contribution of leaves and crowns to water shortage coping strategies. *Front. Plant Sci.* 7, 1958, DOI: 10.3389/fpls.2016.01958
- Sweetlove LJ, et al. (2006)** Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19587-19592, DOI: 10.1073/pnas.0607751103
- Sweetlove LJ, et al. (2010)** Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science* 15, 462-470, DOI: 10.1016/j.tplants.2010.05.006
- Szabados L, Savouré A (2010)** Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89-97, DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Sze JM, et al. (1992)** Vacuolar H⁺-translocating ATPase from plants: structure, function, and isoforms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24, 371-381, DOI: 10.1007/BF00762530
- Tahir ISA, Nakata N (2005)** Remobilization of Nitrogen and Carbohydrate from Stems of Bread Wheat in Response to Heat Stress during Grain Filling. *Journal of Agronomy and crop Science* 191, 106-115, DOI: 10.1111/j.1439-037X.2004.00127.x
- Takayama S et al. (1997)** BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *The EMBO journal* 16, 4887-4896, DOI: 10.1093/emboj/16.16.4887
- Talamé V, et al. (2007).** Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J. Exp. Bot.* 58, 229-240, DOI: 10.1093/jxb/erl163
- Tanaka R, et al. (1999)** Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol.* 120, 695-704, DOI: 10.1104/pp.120.3.695
- Tapken D, et al. (2013)** A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Science Signaling* 6, ra47-ra47, DOI: 10.1126/scisignal.2003762
- Tardieu F, Simonneau T (1998)** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.* 49, 419-432, DOI: 10.1093/jxb/49.Special_Issue.419
- Teardo E, et al. (2011)** Dual localization of plant glutamate receptor AtGLR3. 4 to plastids and plasmamembrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807, 359-367, DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.11.008

- Teardo E, et al. (2015)** Alternative splicing-mediated targeting of the Arabidopsis GLUTAMATE RECEPTOR3. 5 to mitochondria affects organelle morphology. *Plant Physiology* 167, 216-227, DOI: 10.1104/pp.114.242602
- Templer SE, et al. (2017)** Metabolite profiling of barley flag leaves under drought and combined heat and drought stress reveals metabolic qtls for metabolites associated with antioxidant defense. *J. Exp. Bot.* 68, 1697-1713, DOI: 10.1093/jxb/erx038
- Teusink B, et al. (2000)** Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur. J. Biochem.* 267, 5313-5329, DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01527.x
- Tian T, et al. (2017)** agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res* 45, 122-129, DOI: 10.1093/nar/gkx382
- Tommasini L, et al. (2007)** Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & Integrative Genomics* 8, 387-405, DOI: 10.1007/s10142-008-0081-z
- Tondelli A, et al. (2006)** Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 112, 445-454, DOI: 10.1007/s00122-005-0144-7
- Torres MA (2010)** ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 138, 414-429, DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x
- Tsay YF, et al. (2007)** Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581, 2290-2300, DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.047
- Tsiantis MS, et al. (1996)** Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The Plant Journal* 9, 729-736, DOI: 10.1046/j.1365-313X.1996.9050729.x
- Tsochatzis ED, et al. (2012)** Determination of tocopherol and tocotrienol content of Greek barley varieties under conventional and organic cultivation techniques using validated reverse phase high-performance liquid chromatography method. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1732-1739, DOI: 10.1002/jsfa.5539
- Turchetto-Zolet AC, et al. (2009)** The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Molecular Genetics and Genomics* 281, 87-97, DOI: 10.1007/s00438-008-0396-4
- Turner NC (1986)** Crop water deficits: a decade of progress. *Adv. Agron.* 39, 1-51, DOI: 10.1016/S0065-2113(08)60464-2
- Turner WL, et al. (2005)** Cytosolic pyruvate kinase: subunit composition, activity, and amount in developing castor and soybean seeds, and biochemical characterization of the purified castor seed enzyme. *Planta* 222, 1051-1062, DOI: 10.1007/s00425-005-0044-8
- Umezawa T, et al. (2006)** Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 113-122, DOI: 10.1016/j.copbio.2006.02.002
- Urban L, et al. (2017)** Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence. *Front. Plant Sci.* 8, 2068, DOI: 10.3389/fpls.2017.02068
- Valentin HE, et al. (2006)** The arabidopsis vitamin e pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytyl kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* 18, 212-224, DOI: 10.1105/tpc.105.037077
- Valerio C, et al. (2011)** Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *Journal of experimental botany* 62, 545-555, DOI: 10.1093/jxb/erq288
- van Dongen JT, et al. (2011)** Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *J. Plant Physiol.* 168, 1434-1443, DOI: 10.1016/j.jplph.2010.11.004
- Varshney RK, et al. (2012)** Genome wide association analyses for drought tolerance related traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Field Crops Research* 126, 171-180, DOI: 10.1016/j.fcr.2011.10.008
- Vasekina AV, et al. (2005)** Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from barley: identification and response to salt stress. *Biochemistry (Moscow)* 70, 100-107, DOI: 10.1007/s10541-005-0057-8

- Vasquez-Robinet C, et al. (2008)** Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *J. Exp. Bot.* 59, 2109-2123, DOI: 10.1093/jxb/ern073
- Verslues PE, Juenger TE (2011)** Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 240-245, DOI: 10.1016/j.pbi.2011.04.006
- Vincill ED, et al. (2012)** Ca²⁺ conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant physiology* 159, 40-46, DOI: 10.1104/pp.112.197509
- Vincill ED (2013)** Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 1304-1313, DOI: 10.1105/tpc.113.110668
- Voltas J, et al. (1999)** Integrating statistical and ecophysiological analyses of genotype by environment interaction for grain filling of barley II.: Grain growth. *Field Crops Research* 62, 75-84, DOI: 10.1016/S0378-4290(99)00007-6
- vom Dorp K, et al. (2015)** Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of arabidopsis. *Plant Cell* 27, 2846-2859, DOI: 10.1105/tpc.15.00395
- Wang H, et al. (2013)** Functional Characterization of Dihydroflavonol-4-Reductase in Anthocyanin Biosynthesis of Purple Sweet Potato Underlies the Direct Evidence of Anthocyanins Function against Abiotic Stresses. *PLoS ONE* 8, e78484, DOI: 10.1371/journal.pone.0078484
- Wang H, et al. (2018)** Beyond pathways: genetic dissection of tocopherol content in maize kernels by combining linkage and association analyses. *Plant Biotechnol. J.* 16, 1464-1475, DOI: 10.1111/pbi.12889
- Wang SM, et al. (1996)** Phytohormone-regulated β -amylase gene expression in rice. *Plant molecular biology* 31, 975-982, DOI: 10.1007/BF00040716
- Wang X, et al. (2012)** Unraveling the genetic basis of seed tocopherol content and composition in rapeseed (brassica napus l.). *PLoS One* 7, e50038, DOI: 10.1371/journal.pone.0050038
- Wang XQ, et al. (2015)** Natural variations in osytm1 contribute to diversity of the α -tocopherol content in rice. *Mol. Genet. Genomics.* 290, 2121-2135, DOI: 10.1007/s00438-015-1059-x
- Wang Z, et al. (2009)** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57-63, DOI: 10.1038/nrg2484
- Wehner G, et al. (2016)**. Expression profiling of genes involved in drought stress and leaf senescence in juvenile barley. *BMC Plant Biol.* 16, DOI: 10.1186/s12870-015-0701-4
- Weiland M, et al. (2016)** Signalling via glutamate and GLRs in Arabidopsis thaliana. *Functional Plant Biology* 43, 1-25, DOI: 10.1071/FP15109
- Weisz R, et al. (1994)** Water-Deficit effects on Potato leaf growth and transpiration. Utilizing fraction extractable Soil-Water for comparison with other crops. *Am. Potato J.* 71, 829-840, DOI: 10.1007/BF02849378
- Wells SA, Dubetz S (1966)** Reaction of barley varieties to soil water stress, *Can. J. Plant Sci.* 46, 507-512, DOI: 10.4141/cjps66-085
- Winter H, et al. (1992)** Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiology* 99, 996-1004, DOI: 10.1104/pp.99.3.996
- Woonton BW, et al. (2005)** The influence of barley storage on respiration and glucose-6-phosphate dehydrogenase during malting. *J. Inst. Brew.* 111, 388-395, DOI: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00224.x
- Wudick MM, et al. (2018a)** Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates? *Journal of experimental botany* 69, 4151-4163, DOI: 10.1093/jxb/ery153
- Wudick MM, et al. (2018b)** CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science* 360, 533-536, DOI: 10.1126/science.aar6464
- Xu F, et al. (2009)** Leaf morphology correlates with water and light availability: what consequences for simple and compound leaves? *Prog. Nat. Sci.* 19, 1789-1798, DOI: 10.1016/j.pnsc.2009.10.001
- Xu Q, et al. (2018)** Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. *Plant physiology* 176, 930-945, DOI: 10.1104/pp.17.01088

- Yamauchi R (1997)** Vitamin e: mechanism of its antioxidant activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo* 3, 301-309, DOI: 10.3136/fsti9596t9798.3.301
- Yang W, et al. (2010)** Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *The Plant J.* 65, 206-217, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04417.x
- Yao K, et al. (2016)** Phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to drought and bicarbonate stress at transcriptional and functional levels in mulberry. *Russ. J. Plant Physiol.* 63, 235-242, DOI: 10.1134/S102144371602014X
- Zadoks JC, et al. (1974)** A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research.* 14, 415-421, DOI: 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x
- Zanella M, et al. (2016)** β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. *Journal of experimental botany* 67, 1819-1826, DOI: 10.1093/jxb/erv572
- Zeng X, et al. (2016)**. Transcriptome analysis revealed the drought-responsive genes in Tibetan hulless barley. *BMC Genomics* 17, 386, DOI: 10.1186/s12864-016-2685-3
- Zhang G, et al. (2009)** Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.* 60, 3781-3796, DOI: 10.1093/jxb/erp214
- Zhang N, et al. (2014)** Transcriptome characterization and sequencing-based identification of drought-responsive genes in potato. *Mol. Biol. Rep.* 41, 505-517, DOI: 10.1007/s11033-013-2886-7
- Zhang S, et al. (2016)** The influence of vitamin e supplementation on yeast fermentation. *J. Inst. Brew.* 122, 289-292, DOI: 10.1002/jib.327
- Zhang X, et al. (2017)** Meta-analysis of major QTL for abiotic stress tolerance in barley and implications for barley breeding. *Planta* 245, 283-295, DOI: 10.1007/s00425-016-2605-4
- Zhang C, et al. (2018)** Transcriptomic insight into nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to drought and low nitrogen stresses. *Tree Physiol.* 38, 1672-1684, DOI: 10.1093/treephys/tpy085
- Zheng Y, et al. (2011)** The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications. *J. Biol. Chem.* 286, 36108-36118, DOI: 10.1074/jbc.M111.275974
- Zhou M (2010)** Barley production and consumption in *Genetics And Improvement Of Barley Malt Quality* (ed. Zhang G, Li C) 1-17, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010), DOI: 10.1007/978-3-642-01279-2_1
- Zingaretti SM, et al. (2013)** *Water Stress and Agriculture. In Responses of Organisms to Water Stress; InTech:* London, UK, DOI: 10.5772/53877
- Zouhar J, et al. (2010)** Functional specialization within the vacuolar sorting receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *The Plant Journal* 64, 577-588, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04349.x

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: GWAS zum γ -Tocopherolgehalt	6
Abbildung 2: Zusammenhang zwischen dem Gehalt von γ -Tocopherol und dem TKG	7
Abbildung 3: Chemische Struktur der Tocopherole und Tocotrienole	8
Abbildung 4: Schema Lipidperoxidation	10
Abbildung 5: Tocochromanol-Radikal	10
Abbildung 6: Schema der Tocochromanolbiosynthese	12
Abbildung 7: Bodenfeuchte im Rollgewächshaus	15
Abbildung 8: Temperaturverlauf am RGH im Jahr 2016 und 2017	19
Abbildung 9: Ertragsparameter im RGH durch Trockenstress beeinflusst	20
Abbildung 10: Ertragsparameter im RGH im Vergleich	21
Abbildung 11: Ertragsstabilität im Jahr 2016	24
Abbildung 12: Bestimmung der Anzahl der Populationscluster	33
Abbildung 13: Manhattan-Plot von Chromosom 7H der GWAS zum α -Tocopherolgehalt in Blättern von Pflanzen die im Jahr 2017 unter gut bewässerten Bedingungen gewachsen sind	41
Abbildung 14: Die Gene der Tocochromanolbiosynthese auf den Gerste Chromosomen	44
Abbildung 15: Illustration des <i>HPT-7H</i> -Genorts	46
Abbildung 16: Der α -Tocopherolgehalt von Blättern in Genotypen gruppiert nach <i>HPT-7H</i> -Allelen	49
Abbildung 17: Analyse der Populationsstruktur	51
Abbildung 18: Der α -Tocopherolgehalt in Blättern unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	52
Abbildung 19: Transkriptmenge der <i>HPT-7H</i> in Blättern von Genotypen gruppiert nach Allelen und Wachstumsbedingungen	54
Abbildung 20: Zusammenhang zwischen relativer <i>HPT-7H</i> Transkriptmenge und α -Tocopherolgehalt in Blättern	55
Abbildung 21: Zusammenhang zwischen <i>HPT-7H</i> Transkriptmenge (Inncounts) und α -Tocopherolgehalt in Blättern	56
Abbildung 22: Illustration des <i>HGGT</i> -Genorts	58
Abbildung 23: Der Gesamt-Tocotrienolgehalt in reifen Körnern von Genotypen gruppiert nach <i>HGGT</i> -Allelen ..	60
Abbildung 24: Analysierte Paare unreifer Körner	63
Abbildung 25: Verlauf des Tocotrienolgehalts in unreifen Körnern	65
Abbildung 26: Verlauf des Tocopherolgehalts in unreifen Körnern	67
Abbildung 27: Verlauf der Tocochromanolanteile in unreifen Körnern	68
Abbildung 28: Verlauf der Transkriptmengen in unreifen Körnern	69
Abbildung 29: Zusammenhang zwischen relativer Transkriptmenge und Tocochromanolgehalt in unreifen Körnern	70
Abbildung 30: Zusammenhang zwischen dem TKG und dem γ -Tocopherolgehalt im RGH	72
Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Wachstumsparametern und dem α -Tocopherolgehalt im RGH	73
Abbildung 32: PCAs für 59 RNAseq-Proben	76
Abbildung 33: PCAs für 54 RNAseq-Proben	77
Abbildung 34: Zusammenhang zwischen Transkriptomstruktur und Anzahl der DEG	80
Abbildung 35: Beispiele für betrachtete Expressionsmuster in RNAseq-Analysen	85
Abbildung 36: Technische Validierung der Inncounts von acht ausgewählten Genen	88
Abbildung 37: Biologische Validierung: Einfluss verschiedener Extraktionsvorgänge	90
Abbildung 38: Transkriptmenge der PK in Blättern von Genotypen gruppiert nach Allelen und Wachstumsbedingungen	90
Abbildung 39: Einfluss der PK-Transkriptmenge auf die Ertragsstabilität	91
Abbildung 40: Biologische Validierung der Transkriptmengen von sieben Genen	93
Abbildung 41: Einfluss der Transkriptmenge auf die Ertragsstabilität im Jahr 2018	94
Abbildung 42: Durch Trockenstress regulierte Gene, die an der Perzeption von ABA beteiligt sind	110
Abbildung 43: Durch Trockenstress regulierte Gene, die an der Biosynthese von Jasmonsäure beteiligt sind ..	111
Abbildung 44: Ausschnitt von signifikant angereicherten GO-Kategorien	124
Abbildung 45: Phylogenetischer Baum ausgewählter pflanzlicher GLRs	126

5.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide (Primer)	25
Tabelle 2: Liste der analysierten Gerstengenotypen.....	26
Tabelle 3: qPCR Reaktionsansatz	29
Tabelle 4: qPCR Programm.....	30
Tabelle 5: CAPS-Marker Design.....	31
Tabelle 6: Übersicht über die RNAseq Rohdaten Aufarbeitung.....	36
Tabelle 7: Tocochromanolgehalt in Blättern in RGH-Experimenten.....	38
Tabelle 8: Assoziationen zwischen Tocopherolgehalt in Blättern und Ausprägung von SNP-Markern.....	40
Tabelle 9: Zusammenstellung aller assoziierten SNP-Marker der durchgeführten GWAS für den Tocochromanolgehalt in Blättern.	42
Tabelle 10: Verteilung zwischen Ausprägungen von SNP-Markern und HPT-7H-Allelen.....	47
Tabelle 11: Der Tocochromanolgehalt in Blättern von Genotypen gruppiert nach <i>HPT-7H</i> -Allelen.....	49
Tabelle 12: Der Tocochromanolgehalt in Blättern unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.....	53
Tabelle 13: Lineare Korrelationen zwischen der <i>HPT-7H</i> -Transkriptmenge und dem Gehalt verschiedener Tocochromanolarten in Blättern.....	56
Tabelle 14: Tocochromanolgehalt von reifen Körnern.....	57
Tabelle 15: Verteilung zwischen <i>HGGT</i> -Allelen und <i>HPT-7H</i> -Allelen.....	59
Tabelle 16: Der Tocochromanolgehalt von reifen Körnern von Genotypen gruppiert nach <i>HGGT</i> -Allelen.....	61
Tabelle 17: Der Tocochromanolgehalt von reifen Körnern in Genotypen gruppiert nach <i>HPT-7H</i> -Allelen.....	62
Tabelle 18: Tocochromanolgehalt (Gesamtmasse pro Korn) von unreifen Körnern.....	64
Tabelle 19: Tocochromanolgehalt (Massenanteil am Frischgewicht) von unreifen Körnern.....	64
Tabelle 20: Top 50 exprimierte Gene.....	79
Tabelle 21: Gene, die in allen acht Genotypen unter Trockenstress signifikant höhere Transkriptmengen aufwiesen.....	81
Tabelle 22: Gene, die in allen acht Genotypen unter Trockenstress signifikant niedrigere Transkriptmengen aufwiesen.....	82
Tabelle 23: Gene, die nur in den vier ertragsstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsinstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant höhere Transkriptmengen aufwiesen.....	83
Tabelle 24: Gene, die nur in den vier ertragsstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsinstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant niedrigere Transkriptmengen aufwiesen.....	83
Tabelle 25: Gene, die nur in den vier ertragsinstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant höhere Transkriptmengen aufwiesen.....	83
Tabelle 26: Gene, die nur in den vier ertragsinstabilen Genotypen, aber in keinem ertragsstabilen Genotyp unter Trockenstress signifikant niedrigere Transkriptmengen aufwiesen.....	83
Tabelle 27: Gene, deren Transkriptmenge unter beiden Wachstumsbedingungen positiv linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung steht.....	86
Tabelle 28: Gene, deren Transkriptmenge unter beiden Wachstumsbedingungen negativ linear mit der Ertragsstabilität in Verbindung steht.....	86
Tabelle 29: Vergleich der Ertragsdaten der Jahre 2017 und 2018 zum Jahr 2016.....	92

5.4. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
(v / v)	Volumen pro Volumen (in % oder anteilig)
(w / v)	Gewicht pro Volumen (in % oder anteilig)
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (siehe M)
µm	Mikrometer
ABA	Abscisinsäure
ABC-Transporter	siehe Henikoff et al. 1997
ABF	siehe Choi et al. 2000
ANOVA	Varianzanalyse
AP2/ERF	siehe Zhan et al. 2009
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	siehe Kabbage & Dickman 2008
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bZIP	siehe Sahoo et al. 2013
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Chlorophyll-Dephytylase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DOXP	Methylethylthritolphosphat
DR	Doppelreihe
DXP	Desoxyxylulosephosphat-Synthase
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
EtOH	Ethanol
FAU	Friedrich-Alexander-Universität
FDR	false discovery rate
FG	Frischgewicht
FW	Frischgewicht
g	Gramm
GGK	Geranylgeranyl-Kinase
GGPR	Geranylgeranyl-Dehydrogenase
GISAH	Global Information System on Alcohol and Health
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{bidest}	doppelt sterilisiertes und filtriertes Wasser
HGGT	Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase
HPD	Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPT	Homogentisat-Phytyl-Transferase
HPT-7H	HPT auf Chromosom 7H
Hsp70	heat shock protein 70
HST	Homogentisat-Solanyl-Transferase
IPP	Isopentenyl Diphosphate Isomerase
KASP	Kompetitive allele specific PCR
l	Liter
LfL	Landesanstalt für Landwirtschaft
Abkürzung	Erklärung
M	Stoffmengenkonzentration (Molar)
max.	maximal
MDA	Malondialdehydgehalt
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

Abkürzung	Erklärung
mM	Millimolar (siehe M)
mol	Stoffmenge
MPHQ-MT	Methyl-Phytyl-Benzochinon-Methyltransferase
mU	milli Unit (Einheit der Enzymaktivität)
MYB/MYC	siehe Abe et al. 2003
ng	Nanogramm
P5CS	Δ -Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase
PC	Hauptkomponente
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PhyK	Phytyl-Kinase
PIN	performance index
PK	Pyruvat-Kinase
PK (Kontex: Tcr)	Phytyl-Kinase
PP2C	Protein Phosphatasen 2C
PPK	Phytyl-Phosphat-Kinase
PYR/	Pyrabactin Resistance
qPCR	quantitative PCR
Qrel	relative Quantität
QTL	Quantitative Trait Locus
RGH	Rollgewächshaus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA Sequenzierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sek	Sekunde(n)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SnRK2	SNF1-related Kinasen
SWEET	Sugars Will Eventually be Exported Transporters
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
tBLASTn	siehe BLAST
TC	Tocopherol-Cyclase
Tcr	Tocochromanol
TKG	Tausendkorngewicht
Tph	Tocopherol
Tris HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochloride
Ttr	Tocotrienol
VSR1	vacuolar sorting receptor homolog 1
vte1-6	Vitamin E Mutanten
WGS	Whole genome shotgun sequencing
WHO	Weltgesundheitsorganisation
γ TMT	γ -Tocopherol-Methyltransferase
σ	Standardabweichung

6. Anhang

6.1. Kartierung der Strukturgene

Weitere Details auch in Anhang 6.6 (siehe Abschnitt 6.2).

Gen ID	Name	Abkürzung	Chr..	cM
HORVU1Hr1G015090	Tyrosin-Aminotransferase	TAT	1	47,66
HORVU1Hr1G060090	Tocopherol-Cyklase	TC	1	57,29
HORVU1Hr1G060610	Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase	DXP	1	57,29
HORVU1Hr1G064290	Chlorophyll-Dephytylase	CLD	1	62,32
HORVU1Hr1G071260	Tyrosin-Aminotransferase	TAT	1	80,24
HORVU1Hr1G071260	Tyrosin-Aminotransferase	TAT	1	80,24
MLOC_16149.3	Homogentisat-Solanesyl-Transferase	HST	1	97,95
HORVU1Hr1G084900	Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase	DXP	1	112,25
HORVU2Hr1G117600	Homogentisat-Phytyl-Transferase	HPT	2	132,45
HORVU2Hr1G121250	Phytyl-Kinase	PK	2	141,5
HORVU2Hr1G126150	Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase	DXP	2	149,25
AK366103	Geranylgeranyl-Diphosphate-Reduktase	GGDR	3	51,55
AK367002	Phytyl-Phosphat-Kinase	PPK	3	59,63
HORVU3Hr1G113670	2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzoquinol-Methyltransferase	MPHQ-MT	3	148,16
HORVU4Hr1G002050	2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzoquinol-Methyltransferase	MPHQ-MT	4	3,47
HORVU4Hr1G031510	Tyrosin-Aminotransferase	TAT	4	50,64
HORVU5Hr1G008980	2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzoquinol-Methyltransferase	MPHQ-MT	5	43,76
HORVU6Hr1G027650	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen	HPD	6	52,76
HORVU6Hr1G060690	2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzoquinol-Methyltransferase	MPHQ-MT	6	59,79
HORVU6Hr1G068410	γ -Tocopherol-Methyltransferase	γ TMT	6	64,31
HORVU6Hr1G075900	Geranylgeranyl-Diphosphate-Reduktase	GGDR	6	72,95
HORVU6Hr1G081670	Tyrosin-Aminotransferase	TAT	6	88,74
HORVU7Hr1G082450	Tyrosin-Aminotransferase	TAT	7	75,42
HORVU7Hr1G110990	Homogentisat-Phytyl-Transferase	HPT	7	121,81
HORVU7Hr1G114330	Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase	HGGT	7	126,56

6.2. Auflistung der Anhänge in digitaler Form

Folgende Anhänge finden sich in maschinenlesbarer Form auf dem beigefügten digitalen Datenträger sowie teilweise in Schuy et al. (2019).

Anhang	Inhalt	auch in Schuy et al. (2019)
6.3.	Tensiometerdaten	Ja
6.4.	Umgebungstemperatur	nicht für 2018
6.5.	morphologische und physiologische Parameter der Genotypen	nicht für 2018
6.6.	weitere Details zur Kartierung der Strukturgene	Ja
6.7.	Tocochromanolmessungen Blatt und reife Körner	Ja
6.8.	Tocochromanolmessungen unreife Körner	Ja
6.9.	RT-qPCR Blatt	nur für <i>HPT-7H</i>
6.10.	RT-qPCR unreife Körner	Ja
6.11.	Zuordnung von KAPS- und CAPS-Markern und Allelen nach Sanger-Sequenzierung	nicht für PK
6.12.	ermittelte <i>HPT-7H</i> -Sanger contigs	Ja
6.13.	SNP-Marker verwendet für Analyse der Populationsstruktur	Ja
6.14.	SNP-Marker verwendet für GWAS	Nein
6.15.	Bestimmung von $\ln PR(x K)$ in Analyse der Populationsstruktur	Ja
6.16.	Bestimmung der Zugehörigkeiten der Populationscluster	Ja
6.17.	RNAseq counts 59 Proben	Nein
6.18.	RNAseq <i>Inncounts</i> 54 Proben	Nein
6.19.	DEG durch Trockenheit induziert	Nein
6.20.	DEG durch Trockenheit repräsentiert	Nein
6.21.	DEG mit Ertragsstabilität assoziiert	Nein
6.22.	DEG in Barke und B0004 stärker exprimiert	Nein
6.23.	Gehalt von freien Aminosäuren, Zuckern und Stärke in Blättern	Nein

7. Danksagung

Ich danke allen, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Ich danke allen, die mich in dieser Arbeit unterstützt haben und allen, die mich während dieser Arbeit begleitet haben. Ich danke allen, die Verständnis dafür hatten, dass mich diese Arbeit viel Kraft gekostet hat und vor allem danke ich allen, die mich immer wieder ermutigt haben.

spartans never die