



Universität für Bodenkultur Wien
University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna

Masterarbeit

Verdaulichkeitsstudien von rob1-Gerstenmutanten

verfasst von

Christian EMSENHUBER, BSc

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieur

Ruprechtshofen, Juli 2021

Betreut von:

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Heinrich Grausgruber
Institut für Pflanzenzüchtung, Department für Nutzpflanzenwissenschaften

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Werner Zollitsch
Institut für Nutztierwissenschaften, Department für Nachhaltige Agrarsysteme

Danksagung

Hiermit möchte ich mich besonders bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Herrn Prof. Dr. Heinrich Grausgruber bedanken. Zum einen für die fachliche Unterstützung und besonders dafür, dass er mich immer wieder motiviert hat an meiner Diplomarbeit auch während der Doppelbelastung im Berufsleben weiter zu arbeiten.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Zollitsch, der sich bereiterklärt hat als Zweitbetreuer an meiner Arbeit mitzuwirken, sowie dem Leiter des Instituts für Tierernährung an der Vetmeduni Wien Herrn Prof. Dr. Qendrim Zebeli, wo ich meine Versuche durchführen konnte.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an all jene richten, die mich bei den Arbeiten rund um den Versuch an der Vetmeduni Wien unterstützt haben. Das war allen voran meine Großmutter Ernestine Will, Alexandrus Jovanovic, Andreas Haselmann, Anita Dockner, Fenja Klevenhusen, Karola Pliem, Stefan Kutschka und Wiktorja Tebel.

Meinen Studentenkollegen Georg Führer und Lukas Naderer danke ich recht herzlich für die schöne gemeinsame Zeit während unserer Schulausbildung im Fancisco Josephinum und anschließend bei der universitären Ausbildung in Wien.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Andrea und Rudolf, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mir stets die Freiheiten gaben, die ich für meinen Werdegang brauchte.

Zuletzt möchte mich bei meiner nunmehrigen Ehefrau Christine, die ich während des Studiums in Wien kennenlernen durfte für die Unterstützung und den Ansporn während meines Studiums bedanken.

Erklärung

Ich erkläre hiermit eidesstattlich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe. Es wurden keine als die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Inhalte und Formulierungen sind als solche kenntlich gemacht. Diese schriftliche Arbeit wurde noch an keiner anderen Stelle vorgelegt.

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Erklärung	III
I. Kurzfassung	1
II. Abstract.....	3
1. Einleitung und Fragestellung.....	5
2. Literaturübersicht	7
2.1. Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	7
2.2. Botanik	7
2.3. Ursprung und Herkunft der Gerste	9
2.4. Verwendung von Gerste	10
2.5. Gerste in der Ganzpflanzenfütterung.....	10
3. Material und Methoden	13
3.1. Pflanzenmaterial und Vorbereitungsarbeiten.....	13
3.2. Chemische Analysen.....	14
3.3. RUSITEC-Experiment	15
3.4. Laboranalysen.....	22
3.5. DNA-Extraktion und 16S RNA-Gensequenzierung	23
3.6. Statistik.....	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Nährstoffzusammensetzung und <i>in vitro</i> Nährstoffabbaubarkeit	26
4.2. <i>In vitro</i> Fermentation.....	28
4.3. Mikrobenzusammensetzung im Pansen.....	30
5. Diskussion.....	38
6. Abbildungsverzeichnis	43
7. Tabellenverzeichnis	44
8. Literaturverzeichnis	45
9. Anhang.....	55

I. Kurzfassung

Die Verwendung von Getreideganzpflanzen für Futterzwecke wird durch den hohen Ligningehalt in den Zellwänden und die daraus resultierende schlechtere Nährstoffverdaulichkeit der enthaltenen Nährstoffe eingeschränkt. Durch Mutationszüchtung ist es in den letzten Jahren gelungen die Ligninbildung bei einigen Kulturpflanzen, die zur Ganzpflanzenverfütterung genutzt werden, zu vermindern. Die Untersuchungen dieser Arbeit beschäftigten sich mit dem Einfluss einer Gerstenmutation, des sogenannten *orange lemma* (*rob1*) Allels, die geringere Ligningehalte im Pflanzengewebe bewirkt und so Einfluss auf die Verdaulichkeit nehmen kann. Hierfür wurde ein *in vitro* Pansenfermentationssystem (RUSITEC) verwendet. Getestet wurden die zweizeilige Sommergerste 'Optic' und die durch Ethylmethansulfonat induzierte Mutante derselben Sorte. Das Pflanzenmaterial wurde im Schossen und in der Milchreife geerntet und mittels RUSITEC auf die Verdaulichkeit untersucht. Die Gasausbeute, die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und der Ammonium- und Nährstoffabbau aus der Pflanzentrockenmasse wurden nach jeweils 48 Stunden Fermentation untersucht. Die Mikrobienzusammensetzung wurde mittels MiSeq-System untersucht. Grundsätzlich war der Gehalt an ADL (*acid detergent lignin*) im Pflanzengewebe während der Milchreife höher als zum Zeitpunkt des Schossens. ADL war in der Mutante sowohl im Schossen (13,9% vs. 18,5%) als auch in der Milchreife (26,0% vs. 28,6%) zu geringeren Anteilen in der Trockenmasse vorhanden. Dies spiegelte sich in einer höheren Pansenverdaulichkeit der NDF (*neutral detergent fiber*) (61,7% vs. 53,7%; $p < 0,001$) bei den im Schossen geernteten Proben, nicht jedoch bei untersuchten Proben aus der Milchreife wider. Im Vergleich dazu war die Methanbildung bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp niedriger ($p < 0,002$). Bei den Ernteproben zum Schossen verstärkte sich dieser Effekt nochmals. Keine Unterschiede wurden bezüglich der Proteinverdaulichkeit festgestellt. Das SCFA-Muster im Pansensaft unterschied sich bei den Proben aus dem Schossen nicht zwischen beiden Genotypen, während bei den Milchreife-Proben die Mutante eine höhere Acetatbildung bei gleichzeitig geringerer Butyratbildung aufwies. Die mikrobielle Vielfalt war geringer bei den fermentierten Proben

aus dem Entwicklungsstadium des Schossens im Vergleich zu jenen aus der Milchreife ($p < 0,001$). Auch bei der Mutante war dieser Effekt zu beobachten ($p < 0,026$). Das Aufkommen an Bakterien, Synergisten, und Tenericutes war geringer, wenn die Pflanzen im Stadium der Milchreife fermentiert wurden. Das Aufkommen von *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Eremiobacterota* war jedoch höher ($p < 0,0019$). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die meisten Fermentationsparameter durch das Vegetationsstadium und der damit einhergehend veränderten Nährstoffzusammensetzung beeinflusst wurden. Jedoch gab es auch Effekte durch die unterschiedlichen Gerstengenotypen auf das Pansenmikrobenmilieu, die SCFA-Zusammensetzung und die Methanproduktion.

II. Abstract

The usage of cereals as forage crops is limited by the high lignin content in the cell walls and the resulting lower digestibility of the nutrients they contain. In recent years mutation breeding has made it possible to reduce lignification in forage crops. The investigations of this thesis dealt with the influence of a barley mutation, the so-called *orange lemma* (*rob1*) mutation, which causes lower lignin levels in the plant tissue and this can influence digestibility. The *in vitro* ruminal fermentation system (RUSITEC) was used for the research. Two-rowed spring barley cv. 'Optic' and its ethyl methane sulfonate (EMS) induced *orange lemma* (*rob1*) mutant line were both harvested at the same time during stem elongation and early fruit development and incubated in the RUSITEC system. Gas production, concentrations of short-chain fatty acids (SCFA) and ammonia, and the nutrient degradation of the plants after 48 hours of incubation were investigated. Several samples were analyzed for microbial composition using MiSeq sequencing technology. In general, the proportion of acid detergent lignin (ADL) was higher during the stadium of early grain filling than at stem elongation. Furthermore, at stem elongation (13.9% vs 18.5%) as well as early grain development (26.0% vs 28.6%; dry matter basis), ADL was lower in *rob1* than in the wild type. This was reflected in a higher rumen digestibility of neutral detergent fibre (61.7% vs 53.7%; $p < 0.001$) when harvested at stem elongation, but not at the later development state. In comparison, methane production was lower with *rob1* than 'Optic' ($p = 0.002$), especially when harvested at stem elongation. No differences were found in protein digestibility between the barley genotypes. The fermentation SCFA profile showed no difference between barley genotypes when harvested at stem elongation, but at early fruit development more acetate and less butyrate was produced with *rob1*. The microbial diversity was lower when barley was incubated at stem elongation compared to early fruit development ($p < 0.001$), which was also the case with *rob1* ($p = 0.026$). The occurrence of Bacteroidetes, Synergistetes and Tenericutes was lower when plants harvested at early grain development were incubated compared to the stem elongation stage, whereas the abundance of *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and *Eremiobacterota* was higher

($p < 0.001$). In summary, it can be stated that most of the fermentation parameters were influenced by the vegetation stage and the associated change in nutrient composition. However, the different barley genotypes also had effects on the rumen microbe environment, the SCFA composition and methane production.

1. Einleitung und Fragestellung

Gerste ist eine der bedeutendsten Ackerbaukulturen der Welt mit einer Anbaufläche von 51 Mio. Hektar im Jahr 2019. Im selben Jahr wurden in Österreich 137240 Hektar Gerste angebaut, weshalb sie hierzulande die drittgrößte Ackerbaukultur ist (FAO 2019). Gerste wird global betrachtet hauptsächlich für die Körnernutzung kultiviert (Heuzé *et al.* 2015). Die Nutzung teilt sich zu 60% auf Futterzwecke, zu ca. 30% auf Malzgewinnung und rund 5% für Saatgutgewinnung auf. Der Rest beläuft sich auf menschliche Ernährung (Ullrich 2011). Gerste kann auch als Zweinutzungskultur in Mischbetrieben zum einen für Beweidung im Winter, wenn das Wachstum durch niedrige Temperaturen herabgesetzt ist und zum anderen später als Druschkultur genutzt werden, was zu einer größeren Rentabilität und Flexibilität der Betriebe beiträgt (McCartney *et al.* 2008; Bell *et al.* 2014). Auch andere Formen der Ganzpflanzennutzung wie Heugewinnung oder die Energieerzeugung in Biogasanlagen wäre eine Möglichkeit.

Die in dieser Arbeit untersuchte Gerstenmutante *orange lemma (rob1)* weist eine Veränderung in der CAD (*cinnamyl alcohol dehydrogenase*) auf, welche den letzten Schritt der Ligninbiosynthese katalysiert. Dadurch weist sie einen um bis zu 15% geringeren Gehalt an ADL (*acid detergent lignin*) im Pflanzengewebe auf (Meyer & Zwinger 2006; Meyer *et al.* 2006; Stephens & Halpin 2014).

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass aufgrund des niedrigeren ADL-Gehaltes in Orange-Lemma-Gerste der Nährstoffabbau im Pansen erhöht wird, was wahrscheinlich mit Veränderungen im Pansenmikrobiom verbunden ist, und deshalb der Futterwert des Raufutters für Rinder verbessert wird. Da bekannt ist, dass das Vegetationsstadium den Gehalt an ADL und anderen Nährstoffen stark beeinflusst (Khorasani *et al.* 1997; Wallsten *et al.* 2010), formulierten wir eine zweite Hypothese. Diese lautet, dass die Auswirkungen des Gerstengenotyps noch stärker zu tragen kommen, wenn die Gerste im Schossen sowie in der Milchreife geerntet und anschließend fermentiert wird, was wahrscheinlich wiederum mit Veränderungen der mikrobiellen Populationen im Pansen verbunden ist.

Um die Auswirkungen von *rob1*-Gen-assoziierten Veränderungen des Pflanzennährstoffprofils auf das Pansenmikrobiom und die mikrobielle Nährstoffabbaubarkeit der gesamten Gerstenpflanze zu bewerten, wurde eine *in vitro*-Fermentationsstudie mit der *rob1*-Mutante und dem Wildtyp 'Optic' durchgeführt. Herangezogen wurde dafür eine Pansensimulationstechnik genannt RUSITEC. Das RUSITEC-System ist eine *in vitro*-Pansenfermentationstechnik, mit der die Auswirkung der Ernährung auf die Nährstoffabbaubarkeit, die Gasproduktion und das Mikrobiom im Pansen untersucht werden können (Münnich *et al.* 2018; Wetzels *et al.* 2018).

2. Literaturübersicht

2.1. Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist eine der ersten durch den Menschen domestizierte Ackerbaukultur. Vor über 10000 Jahren wurde sie im Gebiet des fruchtbaren Halbmondes domestiziert (Ullrich 2011). Die weltweite Anbaufläche von Gerste betrug im Jahr 2019 rund 51 Mio. Hektar. Sie erreichte somit die fünftgrößte Flächenausdehnung aller Kulturarten (Tabelle 1). In Österreich wurden im selben Jahr 137240 Hektar angebaut, weshalb sie hierzulande die dritthäufigste Kulturart ist (FAO 2019).

Tabelle 1: Globale Anbaufläche und Produktion der weltweit zehn wichtigsten Kulturarten (FAO 2019)

Kulturart	Anbaufläche (Mio. ha)	Produktion (Mio. t)	Durchschnittsertrag (dt/ha)
Weizen	215	765,8	35,55
Mais	197	1148,5	58,24
Reis	162	755,5	46,61
Sojabohne	120	333,7	27,69
Gerste	51	159,0	31,08
Sorghum	40	57,9	14,45
Baumwolle	39	82,6	21,37
Raps	34	70,5	20,72
Bohne	33	28,9	8,74
Hirse	32	28,3	8,96

2.2. Botanik

Die Gerste gehört so wie alle Getreidearten zum Stamm *Triticeae* und zur Familie der *Poaceae*. Derzeit werden 32 Gerstenarten unterschieden, die alle der Gattung *Hordeum* zugehörig sind. Arten der Gattung *Hordeum* sind entweder diploid ($2n = 2x = 14$), tetraploid ($2n = 4x = 28$) oder hexaploid ($2n = 6x = 42$) mit einer grundsätzlichen Chromosomenzahl von $x = 7$ (von Bothmer *et al.* 1995). Die Chromosomenzahl ist im Vergleich zu anderen Getreidearten etwas kleiner, mit 6 – 8 μm sind diese Chromosomen

aber vergleichsweise groß (Briggs 1978).

Gerste ist einjährig und grundsätzlich selbstbefruchtend, da der Pollen meist schon vor dem Ährenschieben geschüttet wird. Auf diesem Umstand beruht die Tatsache, dass bei der Gerste hauptsächlich Linienzucht betrieben wird. Für gute Kreuzungserfolge braucht es niedrige Temperaturen während des Wachstums und der Ährenentwicklung (Cuesta-Marcos *et al.* 2016)

Wenn auch die Witterung für den Blühzeitpunkt eine Rolle spielt, wird der Blühzeitpunkt letztendlich größtenteils über den Genotyp bestimmt. Heiße und trockene Bedingungen erhöhen den Selbstbefruchtungsgrad, besonders Sommergersten blühen meist geschlossen (kleistogam) ab (Fröier *et al.* 1959).

Die Gerste hat die beste Anpassungsfähigkeit aller Getreidepflanzen an die unterschiedlichsten Klimate. Deshalb ist es möglich diese Kulturart in den vom Norden, z.B. in Skandinavien zirka bis zum 65. Breitengrad, bis in trockene südliche Regionen, z.B. in der Nähe der Sahara zu kultivieren. Ein erfolgreicher Gerstenanbau kann auch auf Grenzstandorten (z.B. Höhenlagen, Trockenstandorte, versalzten Standorte) erfolgen, auf denen andere Getreidearten nicht mehr gedeihen können. Der weltweite Durchschnittsertrag beläuft sich auf rund 25 dt/ha. Zu den Optimalbedingungen zählt das gemäßigte Klima Westeuropas, hier werden Durchschnittserträge von rund 60 dt/ha erzielt. Die große Formenvielfalt der Gerste ist beachtlich. Es gibt zwei- und mehrzeilige Formen, Sommer- und Wintergersten, begrante, unbegrante und Kapuzengersten, Nackt- und Spelzgersten sowie Brau-, Futter-, und Speisegersten (Ullrich 2011).

So wie alle anderen Getreideähren besteht auch die Gerstenähre aus einzelnen Ährchen (Williams-Carrier *et al.* 1997). An den Nodien (Ährenspindelstufen) der Ähre sind auf je einer Seite jeweils drei Ährchen angebracht. Sind alle diese Ährchen fertil, so ist es eine sechszeilige Gerste, sind nur zwei fertil, so ist es eine vierzeilige Gerste. Für den Fall, dass nur ein Ährchen fertil ist, handelt es sich um eine zweizeilige Gerste. Grundsätzlich sind zwei- und mehrzeilige Gersten zu unterscheiden (Steinberger *et al.* 1972).

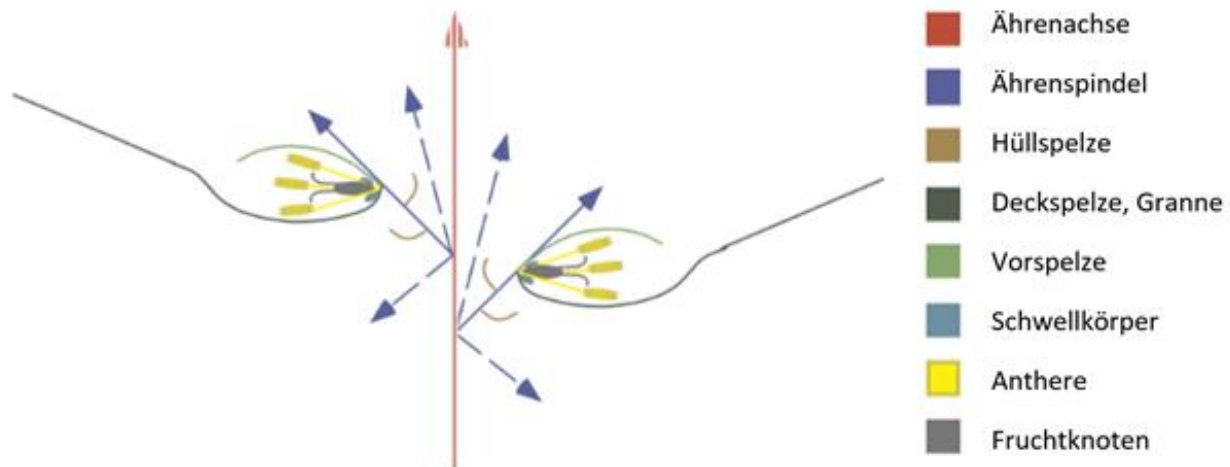


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Gerstenähre (Quelle: modifiziert nach Williams-Carrier *et al.* 1997).

Die Ähre ist der Blütenstand der Gerste. Diese ist unverzweigt, gleichseitig ausgeführt und setzt sich aus den einzelnen Ährchen zusammen. Diese Ährchen sind durch die Ährenachse und die Ährenspindel miteinander verbunden. Die Ährenachse wird in Spindelstufen unterteilt, von denen die einzelnen Ährenspindeln entspringen. Ausgehend von ihrem Ursprung tragen diese zwei Hüllspelzen, gefolgt von einer Deckspelze von der die Granne ausgeht (Abbildung 1). Die Granne wird auch als modifiziertes Blatt bezeichnet. In der Achsel der Deckspelze sitzt eine Blüte, die sich aus drei Antheren und einem Fruchtknoten zusammensetzt (Steinberger 1972).

2.3. Ursprung und Herkunft der Gerste

Als Ursprungszentrum einer Kultur gilt das Gebiet indem die Wildform gemeinsam mit der kultivierten Art vorliegt (Molina-Cano *et al.* 2002). Neben mehreren anderen Getreidearten wurde auch Gerste erstmals im fruchtbaren Halbmond im Nahen Osten bereits vor 10000 bis 11000 Jahren kultiviert. In neolithischen Siedlungen in Tell Abu Hureyra wurden Hinweise darauf gefunden. Man geht aber davon aus, dass an mehreren Orten in dem Gebiet unabhängig voneinander mit Siedlungstätigkeit und auch mit dem Ackerbau und dem Anbau von diversen Getreidearten begonnen wurde. Ein Grund dafür war möglicherweise auch der Beginn einer kühleren und trockeneren Klimaperiode (Lev-

Yadun *et al.* 2000). Aber auch in anderen Regionen der Welt wie im Himalaya und im Mittelmeerraum wurde relativ früh unabhängig davon mit der Kultivierung der Gerste begonnen (Schmid *et al.* 2018).

2.4. Verwendung von Gerste

Gerste wird global betrachtet hauptsächlich für die Körnernutzung kultiviert (Heuzé *et al.* 2015). Die Nutzung teilt sich zu 60% auf Futterzwecke, zu ca. 30% auf Malzgewinnung und rund 5% für Saatgutgewinnung auf. Der Rest beläuft sich auf die menschliche Ernährung (Ullrich 2011). Für diese vielfältigen Zwecke wird Gerste mittlerweile seit Jahrhunderten genutzt, was mitunter auch auf ihre große genetische Variabilität zurückzuführen ist. Sie verfügt auch über die weiteste geografische Ausbreitung aller Getreidepflanzen. Oft wird sie dort kultiviert, wo andere Getreidearten für die klimatischen Verhältnisse nicht mehr geeignet sind (Poehlman *et al.* 1985). Nur in sehr wenigen Regionen der Welt wird Gerste vorwiegend zur menschlichen Ernährung (Eticha *et al.* 2009; Tashi *et al.* 2013), als Futterpflanze für Winterbeweidung oder zur Silage- und Heuproduktion genutzt (Fisher *et al.* 1972; Entz *et al.* 2002; Baron *et al.* 2006; Wallsten *et al.* 2010). Gerste kann auch als Zweinutzungskultur in Mischbetrieben zum einen für Beweidung im Winter, wenn das Wachstum durch niedrige Temperaturen herabgesetzt ist und zum anderen später als Druschkultur genutzt werden, was zu einer größeren Rentabilität und Flexibilität der Betriebe beiträgt (McCartney *et al.* 2008; Bell *et al.* 2014).

2.5. Gerste in der Ganzpflanzenfütterung

Grundsätzlich ist die Zugänglichkeit von Pflanzenzellwandpolysacchariden für die mikrobielle Verdauung im Pansen durch das Vorhandensein von Phenylpropanoid-Polymer-Lignin im Pflanzengewebe begrenzt (Vogel & Jung 2001; Jung *et al.* 2012). Eine Veränderung der Zellwandzusammensetzung von Pflanzen für eine bessere mikrobielle Verdaulichkeit aber auch für eine bessere Verwendung in der Biokraftstoffproduktion wird vorangetrieben. Es wurde jedoch oft eine reduzierte Fitness solcher modifizierten Pflanzen festgestellt, was sich in geringeren Erträgen, schlechterer Trockenheitstoleranz

und höherer Krankheitsanfälligkeit bemerkbar machen kann (Jung *et al.* 2012). Die für gewöhnlich eingesetzten Gerstensorten enthalten in ihrem Gewebe viel Lignin und haben viele Grannen, was ihre Eignung zur Ganzpflanzenverfütterung in der Tierhaltung herabsetzt. Die Grannen und besonders deren Wiederhacken können die Mundschleimhaut und die Augen der Tiere beeinträchtigen. Auch die Arbeit mit begrannter Gerste ist für den Menschen oft unangenehm (Harlan *et al.* 1920). Es sind sogar verringerte Trockenmasseaufnahmen bei der Verfütterung von begrannten Getreidepflanzen im Vergleich zu unbegrannten Pflanzen zu beobachten (Todd *et al.* 2003). Es gibt verschiedene Gerstenmutanten, wie zum Beispiel welche mit weicheren Grannen (*raw 1*, *raw 2*), Kapuzengersten (*Kap1*) oder grannenlose Gersten (*Lka1*) (Lundqvist & Franckowiak *et al.* 2003), die für die Entwicklung neuartiger Gerstenvarietäten zur Ganzpflanzenverfütterung herangezogen werden können (Hadjichristodoulou *et al.* 1979; Todd *et al.* 2003). Lignin sorgt für Struktur sowie Stabilität in der Pflanze und wirkt als Abwehrbarriere gegen äußere Einflüsse. Eine genetische Veränderung von Lignin-Genen kann zu strukturellen und zusammensetzungsbedingten Veränderungen des Lignins führen und es sind Auswirkungen auf die Extrahierbarkeit oder Verdaulichkeit des Lignins möglich. All dies sind wichtige Faktoren für die Ernährung von Nutztieren. In letzter Zeit haben sich die Forschungen auf die Verringerung der Ligningehalte verstärkt (Chapple *et al.* 2007; Chen & Dixon *et al.* 2007; Shen *et al.* 2009), um Getreidestroh besser als Ballaststoff oder für Biokraftstoffe nutzen zu können und die Verdaulichkeit von Raufutter zu erhöhen (Jung *et al.* 2012). Mit dem gleichen Ziel wurden *brown midrib* Mutanten in Mais, Sorghum und Perlhirse entwickelt. Dadurch konnte die Futterverdaulichkeit für Wiederkäuer signifikant erhöht werden (Sattler *et al.* 2010). Die bei Gerste kommerziell noch nicht genutzte Mutante *orange lemma* (*rob1*), bewirkt einen um bis zu 15% verringerten Gehalt an ADL (*acid detergent lignin*) im Pflanzengewebe. Die Mutation führt zu einer Veränderung in der CAD (*cinnamyl alcohol dehydrogenase*), welche den letzten Schritt der Ligninbiosynthese katalysiert (Meyer *et al.* 2006; Stephens & Halpin 2014). Die Mutation befindet sich am Chromosom 6HS. Die Granne, die Vorspelze und die Rachis sind im unreifen Zustand orangefarben (Abbildung 2). Dabei handelt es sich um eine rezessive Mutation, die bereits spontan in der Herkunft Clho 5649 auftrat (Franckowiak *et al.* 1997). Die Mutation im Versuchsmaterial wurde

künstlich durch Mutationszüchtung herbeigerufen. Unter Mutationszüchtung versteht man die Schaffung neuer Sorten durch das Generieren von genetischer Variabilität mittels Mutagenen. Neben Kreuzungszüchtung und Gentechnik stellt die Mutationszüchtung eine von den drei Säulen der modernen Pflanzenzüchtung dar (Shu *et al.* 2012).

Wiederkäuer sind auf Pansenmikroben angewiesen, um für sie unverdauliche Pflanzenpolymere zu nutzbaren Nährstoffen zu fermentieren, die dann auch durch Wiederkäuer weiter metabolisiert werden können. In etwa 70% des Energiebedarfs und 50% des Proteinbedarfs eines Wiederkäuers werden durch den Pansen und die darin vorkommenden Pansenmikroben sichergestellt (Pitta *et al.* 2018). Es wurde gezeigt, dass Änderungen der Nährstoffzusammensetzung im Futter auch die mikrobielle Zusammensetzung und Fermentation des Pansens signifikant verändern (Klevenhusen *et al.* 2017; Belanche *et al.* 2019). Der Gehalt an ADL (*acid detergent lignin*) in der Mutante *orange lemma* ist niedriger als im Wildtyp, was auch zu Veränderungen im Pansenmikrobiom führt und so den Futterwert des Raufutters für Rinder verbessern kann. Es ist jedoch auch bekannt, dass das Vegetationsstadium den Gehalt an ADL (*acid detergent lignin*) und anderen Nährstoffen stark beeinflusst (Khorasani *et al.* 1997; Wallsten *et al.* 2010).



Abbildung 2: Orange gefärbte Pflanzenteile der Mutante *rob1* (*orange lemma*; links) und grün gefärbte Pflanzenteile vom Wildtyp 'Optic' (rechts).00

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenmaterial und Vorbereitungsarbeiten

Für die Verdaulichkeitsstudie wurde die zweizeilige Sommergerste 'Optic' (Wildtyp) und deren Mutante EMS_R0013_33 verwendet. Die Mutation *orange lemma* (*rob1*) wurde durch Ethylenmethansulfonat (EMS) induziert (Caldwell *et al.* 2004). Das Probenmaterial wurde 2016 auf der Versuchsfläche Raasdorf, KG Pysdorf, der BOKU-Versuchsstation Groß Enzersdorf (48°14'10" N, 16°35'36" E) angebaut und geerntet.



Abbildung 3: Luftbild der gelb umrandeten Versuchsfläche in Raasdorf, der rote Punkt kennzeichnet die Lage des nächst gelegenen und beschriebenen Bodenprofils (Quelle: modifiziert nach eBod 2020)

Das für den Anbau genutzte Feld befindet sich auf einer Seehöhe von etwa 154 m im Marchfeld (Abbildung 3). Die Profilbeschreibung von Ebod (BFW, 2020) weist die Bodenart Tschernosem, entstanden aus kalkhaltigem Feinsediment auf Schotter und Sand auf, wobei im Oberboden ein geringer Grobanteil vorhanden ist. Die

Wasserverhältnisse werden als trocken beschrieben (BFW, 2020). Dies unterstreichen auch die Daten der nahegelegenen Wetterstation in Franzensdorf, die einen durchschnittlichen Jahresniederschlag von 545 mm pro m² ausweisen und das bei einer Jahresdurchschnittstemperatur von 10,6 °C (NOEL, 2020).

Die Aussaat erfolgte am 19. März 2016 mit einer Saatstärke von 400 Körnern je m² auf je 12 m² großen Parzellen. Jede der Parzellen wurde dreifach wiederholt. Die erste Ernte erfolgte zum Schossen in BBCH 35 am 73. Tag nach der Aussaat. Die zweite Ernte erfolgte zur Milchreife in BBCH 71-73 am 90. Tag nach der Aussaat. Geerntet wurde per Hand je 1 m² von jeder Parzelle. Die Grünmasse wurde einer Lufttrocknung in den Gewächshäusern der Versuchsanstalt in Groß Enzersdorf unterzogen. Anschließend wurden die Proben mit einer Mühle (PULVERISETTE 19 Universalschneidemühle, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland) durch ein 6 mm Sieb vermahlen.

3.2. Chemische Analysen

Die Analysen von Futter- und Futtermittelrückstandsproben wurden in zweifacher Wiederholung gemäß dem Deutschen Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Analysemethoden (VDLUFA 2012) durchgeführt. Die Trockenmassebestimmung erfolgte in einem Trockenschrank bei 100 °C für 24 Stunden. Die Rohaschegehaltsermittlung erfolgte durch Verbrennen im Muffelofen bei 580 °C über Nacht. Der Rohproteingehalt wurde mittels Kjeldahl-Methode ermittelt. Die Gehalte an NDF (*neutral detergent fiber*), ADF (*acid detergent fiber*) und ADL (*acid detergent lignin*) wurden mit Hilfe des Fiber Therm TT 12 (Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland) ermittelt.

3.3. RUSITEC-Experiment

Die konkrete Untersuchung wurde mittels RUSITEC in einem vollrandomisierten Design durchgeführt. Es wurden 2 Durchläufe mit je 12 Fermentern durchgeführt, was 24 unabhängige Messungen ermöglichte. Insgesamt bedeutet das 6 Messungen für jedes der 4 untersuchten Substrate. Jeder der 12 baugleichen Fermenter hatte ein Volumen von 800 ml (Abbildung 4).



Abbildung 4: Geschlossene und befüllte Fermenter von RUSITEC im temperierten Wasserbad während des Versuchslaufes

Ein Versuchsdurchgang („run“) dauerte 10 Tage. Der notwendige Pansensaft wurde aus dem Pansen fistulierter Kühe am Lehr- und Forschungsgut Kremesberg entnommen und diente als „Impfkultur“ für die Fermenter. Die ersten 5 Tage eines jeden Runs dienten zur Anpassung der Pansenmikroben an die neue Nahrungsgrundlage, in den folgenden 5 Tagen wurden Messungen durchgeführt. Die Fermenter befanden sich in einem Wasserbad mit 39,58 °C was der natürlichen Pansentemperatur entspricht. Mit Hilfe eines speziellen Antriebes wurde der Fermenterinhalt laufend durchgemischt, wodurch die Pansenperistaltik imitiert wurde. Pro Tag wurden 350 ml McDougall-Pufferlösung (Soliva & Hess 2007) über ein automatisches Pumpsystem in die Fermenter eingebracht. Diese 12-teilige peristaltische Pumpe (ISM 932E, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) musste täglich mit frischer Pufferlösung beschickt werden. Diese Pufferlösung soll die Funktionen der Speichelflüssigkeit beim Wiederkäuer übernehmen. Die daraus resultierende überschüssige Pansenflüssigkeit wurde für jeden Fermenter einzeln in eisgekühlten Glasflaschen gesammelt (Abbildung 5). So konnte kontrolliert werden, ob auch wirklich täglich die gewünschte Menge an Pufferflüssigkeit zugeführt worden ist.



Abbildung 5: Sammelbehältnisse für den *Outflow* aus den Fermentern auf Eis gelagert

Für die Beimpfung des RUSITEC-Systems wurde von 3 nichtlaktierenden, fistulierten Kühen nach der morgendlichen Fütterung Pansensaft entnommen (Abbildung 6). Die Kühe wurden nach den österreichischen Tierschutzrichtlinien am Lehr- und Forschungsgut Kremesberg gehalten und mit einer Mischung aus Heu- und Grassilage im Verhältnis 25 zu 75 *ad libitum* gefüttert. Die Pansenflüssigkeit wurde mittels eines Aspirationsrohres (RUMINATOR, T. Geishauser, Wittibreut, Deutschland) aus dem ventralen Pansenabschnitt entnommen. Hierfür musste die oberste Fassermatte im Pansen (10 – 20 cm) manuell durchstoßen werden, um an den tiefer gelegenen Pansensaft zu gelangen (Abbildung 7). Der abgepumpte Pansensaft wurde mit etwas Material der Fassermatte versehen, so dass die Mikroben auch während des Transportes Nahrung vorfinden konnten.



Abbildung 6: Fistulierte Kuh mit verschlossener Pansenfistel vor der Pansensaftentnahme



Abbildung 7: Aufnahme während des Durchstoßens der Fasermatte im Pansen

Die verschlossenen Proben wurden in isolierenden Styroporbehältern, die mit warmem Wasser befüllt waren schnellst möglich zur Veterinärmedizinischen Universität nach Wien gebracht, um dort den eigentlichen Versuch zu starten. Anschließend wurde der gesamte feste und flüssige Panseninhalt durch einen medizinischen Mullverband (Porengröße 1 mm) gefiltert und vermischt. Vor der Beimpfung der Fermenter wurden diese mit 100 ml Versuchspuffer (Soliva & Hess 2007) befüllt. Dann wurden 600 ml der gepoolten und gefilterten Pansenflüssigkeit hinzugegeben. Die Fermenter wurden mit 2 verschlossenen Nylonsäckchen (70×150 mm, Porengröße 150 µm), die mit Futter befüllt waren beschickt. Ein Nylonsäckchen enthielt 9 g Trockenmasse der jeweiligen Gerstenpflanzenproben und ein zweites Säckchen enthielt den festen gepoolten Panseninhalt von den 3 Kühen. Die mit den jeweiligen Gerstenproben befüllten Säckchen wurden in den Wochen vor dem Versuch selbst genäht und auf einer Laborwaage befüllt und eingewogen. Anschließend

wurden sie fest mit einem Kabelbinder verschlossen und beschriftet. Insgesamt waren das 264 Nylonsäckchen für beide Versuchsdurchgänge. Nach 14 Stunden Inkubationszeit wurden die mit dem festen Panseninhalt gefüllten Säckchen durch neue ersetzt, die mit dem jeweiligen „Versuchsfutter“ befüllt waren (Abbildung 8).



Abbildung 8: Geöffneter Fermenter während des Befüllens mit frischen Nylon-Futtersäckchen

Die entnommenen Säckchen wurden mit jeweils 40 ml vorgewärmter McDougall Puffer-Lösung (Soliva & Hess 2007) gespült und per Hand in den Fermenter hinein ausgedrückt. So konnten mikrobielle Zellverluste minimiert werden. Die gesammelten Säckchen aus den letzten 5 Tagen des jeweiligen Runs wurden mit kaltem Wasser abgespült und ausgewaschen, bis das Wasser keine Trübung mehr aufwies (Abbildung 9).



Abbildung 9: Spülvorgang der fertig fermentierten und entnommenen Futtersäckchen

Bis zur weiteren Analyse des erfolgten Nährstoffabbaus der fermentierten Proben wurden diese bei -20 °C gelagert. Nach dem Austausch der Futtersäckchen wurden die Fermenter wieder luftdicht verschlossen und mit gasförmigem Stickstoff für 3 Minuten

gespült, um wieder anaerobe Bedingungen in den Fermentern herzustellen. Eine Herausforderung im Laufe des Versuches war es, konstante Umweltbedingungen für alle Fermenter und die darin lebenden Mikroorganismen sicher zu stellen. So musste penibel darauf geachtet werden, dass kein Sonnenlicht in den Raum mit den Fermentern eindrang und dadurch die Mikroben schädigte. Weiters musste die Temperatur im Wasserbad laufend kontrolliert werden. Jeder Fermenter musste weitgehend luftdicht von der Außenwelt abgeschlossen sein, um anaerobe Bedingungen sicherzustellen. Eine laufende Kontrolle und Betreuung der Gerätschaften war somit unerlässlich für einen erfolgreichen Versuchsverlauf. Vor der täglichen Öffnung der Fermenter zu Fütterungszwecken wurden Proben der Fermenterflüssigkeit für eine pH-Messung und Redoxpotentialmessung entnommen. Diese wurden mit einem pH-Messgerät (SevenExcellence; Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz) gemessen (Abbildung 10).



Abbildung 10: pH-Messung und Redoxpotentialmessung des Fermenterinhalts

Von Tag 6 bis zu Tag 10 wurden zusätzlich 10 ml Flüssigkeit aus jedem Fermenter entnommen. Je 2 ml wurden für die Analysen von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und

Ammoniak entnommen und bei -20 °C gefroren. Für die Analyse des Mikrobenspektrums wurden weitere 2 ml entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur DNA-Analyse im Gefrierschrank gelagert. Das täglich anfallende Gärgas aus den Fermentern wurde in luftdichten Säcken gesammelt (TecoBag 5 l; Tesseraux Container, Bürstadt, Deutschland). Die pro Tag erzeugte Gasmenge wurde anhand der Wasserverdrängungsmethode (Soliva & Hess 2007) und die CH₄ und CO₂ Konzentrationen wurden mit einem Infrarotdetektor (ATEX BiogasMonitor Check BM 2000; Ansyco, Karlsruhe, Deutschland) ermittelt (Abbildung 11). Nach dem Abschluss beider Versuchsdurchläufe wurden die samt Inhalt eingefrorenen fermentierten Nytonsäckchen aufgetaut und getrocknet.



Abbildung 11: Gasvolumenmessung mittels Wasserverdrängungsmethode

3.4. Laboranalysen

Die Analysen von Futter- und Futtermittelrückstandsproben wurden in zweifacher Wiederholung gemäß dem Deutschen Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Analysemethoden (VDLUFA, 2012) durchgeführt. Vor der Analyse der Rückstandsproben

aus den letzten 5 Tagen je Run wurden diese je Fermenter gesammelt und im Trockenschrank bei 65 °C für 48 Stunden getrocknet. Anschließend wurden sie einzeln verwogen, dann gepoolt und durch ein 0,75 mm Sieb vermahlen (Retsch, Haan, Deutschland). Die Trockenmassebestimmung erfolgte in einem Trockenschrank bei 100° C für 24 Stunden. Die Rohaschegehaltsermittlung erfolgte durch Verbrennen im Muffelofen bei 580 °C über Nacht. Der Rohproteingehalt wurde mittels Kjeldahl-Methode ermittelt. Die Gehalte an NDF (*neutral detergent fiber*), ADF (*acid detergent fiber*) und ADL (*acid detergent lignin*) wurden mit Hilfe des Fiber Therm TT 12 (Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland) ermittelt. Hitzestabile α -Amylase, die für die Ermittlung des NDF-Gehaltes verwendet wurde und alle Faserfraktionen wurden ohne Restasche ausgedrückt. Die Konzentration und Zusammensetzung der SCFAs (*Acetat*, *Propionat*, *n-Butyrat*, *Isobutyrat*, *n-Valerat*, *Isovalerat* und *Caproat*) wurden mittels Gaschromatographie, (GC-Modell 8060 MS 172 DPFC, Nr. 950713; Fisons, Rodano, Italien) ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor und einer Kapillarsäule (30 m (L) $\times$ 0,53 mm (ID), df 0,53 mm, Trace TR Wax; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), wie bei Kumar *et al.* (2016) beschrieben, ermittelt.

Die Konzentration von Ammoniak wurde anhand der Indophenol-Reaktion ermittelt (Weatherburn 1967). Die Fermenterflüssigkeitsproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend bei 15 °C bei 115 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, um eine Konzentration innerhalb der Standardkalibrierungskurve zu erreichen. Ammoniak und Phenol wurden durch Natriumhydroxid in Gegenwart von Natriumnitroprussid und Dichloroisocyanursäure oxidiert. Die Absorption wurde mit einem Hitachi U-3000 Spektralphotometer (Chiyoda, Tokio, Japan) bei 655 nm nach 90 min Reaktionsdauer gemessen (INULA, Wien, Österreich).

3.5. DNA-Extraktion und 16S RNA-Gensequenzierung

Die gefrorenen Proben wurden auf Eis aufgetaut und danach kurz aufgeschüttelt. Die Proben von Tag 5 bis Tag 10 wurden pro Fermenter und Run auf eine Mischprobe gepoolt. Aus der gepoolten Probe wurde eine 1 ml Stichprobe zur DNA-Isolierung

entnommen. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Die Proben wurden mit 1 ml InhibitEX Puffer aus dem Testkit versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt, um eine ordnungsgemäße Analyse der Bakterien zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben einem zusätzlichen enzymatischen (2,5 U ml⁻¹ Mutanolysin, 100 mg ml⁻¹ Lysozym, 20 mg ml⁻¹ Proteinase K) und mechanischen (0,4 g sterile Keramikperlen, Durchmesser 1,4 mm) Lösungsvorgang unterzogen. Dafür wurde ein BeadBeater verwendet (FastPrep-24 5G; MP Biomedicals, Valiant, CA, USA), der die Bakterienzellen wie beschrieben (Kong *et al.* 2010) zerstörte. Die daraus entstandenen Rückstände wurden in frische Probenröhrchen für eine spaltenbasierte Isolation gegeben. Die DNA wurde in 200 µl dH₂O eluiert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit einem Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und einem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) bestimmt. Für weitere Analysen wurde die DNA bei -20 °C gelagert. 40 µl einer jeden DNA Probe wurden für eine Amplikon-Sequenzierung durch eine MiSeq Illumina-Sequenzierungsplattform, die eine *paired-end* Technologie verwendet, an Microsynth AG (Balach, Schweiz) gesandt und dort analysiert. Die Sequenzierung zielte auf den V3–V5 (eine hypervariable Region des 16S rRNA-Gens) unter Verwendung des Primer-Sets 357F-HMP a (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') und 926R-HMP (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') ab, um eine Amplikongröße von rund 523 bp zu erhalten (Peterson *et al.* 2009). Exakt nach den Empfehlungen des Nextera Herstellers (Illumina, San Diego, CA, USA) wurden *Libraries* durch das Ligieren eines Sequenzierungsadapters und eines Indizes auf gereinigten PCR Produkten (Nextera XT Sample Preparation Kit; Illumina) erstellt. Die äquimolaren Mengen jeder *Library* wurden gepoolt und mit Hilfe eines Illumina MiSeq Personal Sequencer sequenziert. Die daraus entstandenen Doppelenden mit einer durchschnittlichen Länge von 510 Nukleotiden (nt) wurden durch Microsynth in 1,7 Mio. Durchläufen zusammengefügt. Die Qualitätskontrolle der Sequenzierungen wurde mit Hilfe der QIIME-Pipeline (Caporaso *et al.* 2010) durchgeführt. Die Sequenzen wurden zuerst qualitätsgefiltert (Q = 20; Caporaso *et al.* 2010) und anschließend auf Chimären mit USEARCH Version 8.1 und dessen Datenbank (Bokulich *et al.* 2013) gescreent und gefiltert. Das Gruppieren wurde mit Hilfe von UCLUST (Edgar 2010) durchgeführt. Die *operational taxonomic units* (OTUs) wurden mittels PyNAST

(Caporaso *et al.* 2010) und der SILVA-Datenbank (Version 123; <https://www.arb-silva.de>, abgerufen am 19. Juli 2017; Quast *et al.* 2012; Yilmaz *et al.* 2014) definiert. Der Grad der Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen wurde mit 97% festgelegt, um OTUs zu erhalten.

Alle OTUs, mit weniger als 10 Lesevorgängen wurden manuell entfernt. Insgesamt wurden 1,24 Mio. Sequenzen (das sind 51591 Sequenzen pro Probe) in 5662 OTUs für die taxonomische Quantifizierung gruppiert. Zur Berechnung und Abschätzung der nichtparametrischen Arten, wurden Chao 1 und die beobachteten OTUs pro Probe verwendet. Die β -Diversitäts-Analyse wurde mittels der gewichteten UniFrac-Abstandsmetrik und der *Principal Coordinates Analysis* (PCoA) unter Verdünnung an 34000 Sequenzen durchgeführt.

3.6. Statistik

Die Mittelwerte der letzten 5 Tage von jedem Run wurden einer gemischt linearen Varianzanalyse unter Anwendung der Prozedur MIXED (SAS 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA) unterzogen. Hierbei wurden die unterschiedlichen Faktoren (der gegenseitige Einfluss von Genotyp, und Erntezeitpunkt) als fixe Effekte angenommen. Der experimentelle Lauf (Run) an sich wurde als zufälliger Effekt betrachtet. Die Mittelwertsvergleiche wurden mittels Tukey Test durchgeführt. Die Unterschiede waren bei einer zweiseitigen Varianzanalyse mit $p \leq 0,05$ signifikant. Der Annahmebereich wurde mit $0,05 < p \leq 0,1$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Nährstoffzusammensetzung und *in vitro* Nährstoffabbaubarkeit

Die Nährstoffzusammensetzung und die Ergebnisse der Nährstoffabbaubarkeit sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Unterschiede im Gehalt der organischen Substanz zwischen dem Wildtyp 'Optic' (WT) und der mutierten Variante *rob1* waren klein. Die Ernte in einem früheren Entwicklungsstadium führte jedoch zu einem höheren Gehalt an organischer Masse als bei einem Erntetermin zum Schossen. Bei *rob1* war der Rohproteingehalt insgesamt höher als bei WT. Der spätere Erntetermin führte zu niedrigeren Rohproteingehalten im Vergleich zum früheren Erntetermin. Der niedrigere ADL-Gehalt bei *rob1* im Vergleich zu WT wurde auch durch die Analyse der Faserfraktion bestätigt. NDF und ADF waren jedoch in *rob1* höher als bei WT, wenn zu einem frühen Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung geerntet wird, was auf größere Zelluloseanteile in *rob1* schließen lässt. Die Nährstoffabbaubarkeit unterschied sich zwischen den beiden Erntezeitpunkten ($p \leq 0,001$ für Abbaubarkeit von Trockenmasse, organischer Masse, Rohprotein, NDF und ADF; $p = 0,074$ für die ADL-Abbaubarkeit).

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Erntezeitpunkt, dem Gerstengenotyp und der Abbaubarkeit von Trockenmasse, organischer Masse und NDF festgestellt werden. Zusätzlich gab es eine Tendenz zu einem Zusammenhang zwischen Erntezeitpunkt, Gerstengenotyp und Rohproteinabbaubarkeit. Dementsprechend sank die Nährstoffabbaubarkeit mit dem späteren Erntezeitpunkt, sowohl bei WT als auch bei *rob1*, mit einem stärkeren Effekt bei *rob1* für DM, OM und NDF. Nur der ADL-Abbau war sowohl bei WT als auch in *rob1* höher, wenn zu einer früheren Phase der Pflanzenentwicklung geerntet wurde. Der Tukey HSD-Test ergab, dass der NDF-Abbau bei *rob1* geerntet im Schossen am höchsten war.

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des Probenmaterials
Mittelwerte mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich laut Tukey-Test nicht signifikant ($p=0,05$) voneinander.

Genotyp	Optic				SEM	p-Wert		
	BBCH 35	BBCH73	BBCH 35	BBCH73		Genotyp	Ernte	GxE
Erntezeitpunkt								
Chemische Zusammensetzung der Ganzpflanzen (g/kg TM)								
Organische Substanz (OM)	897	945	880	920				
Rohprotein (XP)	169	101	207	133				
Rohfett (XL)	22,5	13,2	15,7	10,6				
Stärke	5,0	187	4,2	74,6				
Neutral detergent fibre (NDF)	548	507	506	554				
Acid detergent fibre (ADF)	301	260	297	308				
Acid detergent lignin (ADL)	18,5	28,6	13,9	26,0				
ADL,% von NDF	3,38	5,64	2,74	4,69				
ADL,% von ADF	6,15	11,0	4,68	8,44				
Nährstoffabbaubarkeit (%)								
Trockenmasse	65,8 ^a	60,5 ^b	67,8 ^a	56,7 ^c	1,07	0,267	<0,001	0,008
OM	64,7 ^{ab}	61,0 ^b	66,6 ^a	55,4 ^c	1,07	0,103	<0,001	0,003
XP	75,6 ^a	51,5 ^b	74,3 ^a	57,8 ^b	3,49	0,234	<0,001	0,081
NDF	53,7 ^b	42,8 ^c	61,7 ^a	39,6 ^c	2,07	0,242	<0,001	0,011
ADF	51,6 ^a	38,7 ^b	59,0 ^a	39,2 ^b	2,14	0,079	<0,001	0,123
ADL	23,2	27,2	16,7	25,8	9,96	0,272	0,074	0,479

4.2. *In vitro* Fermentation

Trotz gleicher Pufferbedingungen konnte ein Effekt durch die Erntezeitpunkte und Gerstengenotypen auf den pH-Wert im Fermenter festgestellt werden. Die pH-Werte im Fermenter waren bei *rob1* höher und beim späteren Erntezeitpunkt in der Milchreife waren die pH-Werte niedriger (Tabelle 3).

Der Erntezeitpunkt hat auch das Redoxpotential in der Fermenterflüssigkeit beeinflusst. Die Werte waren in den Fermentern, welche Gerste aus der Milchreife enthielten deutlich höher ($p < 0,001$). Die SCFA-Konzentrationen zeigten zwischen den Gerstengenotypen keinen Unterschied, sie waren jedoch zum späteren Erntezeitpunkt niedriger ($p = 0,03$). Mehrere Auswirkungen vom Gerstengenotyp und Erntezeitpunkt auf die SCFA-Zusammensetzung wurden festgestellt (Tabelle 3). Die Acetatkonzentrationen waren im Fermenter höher, wenn Gerste im Schossen geerntet wurde im Vergleich zu Gerste aus der Milchreife ($p < 0,001$). Dieser Effekt war beim Wildtyp stärker ausgeprägt als bei *rob1* (Erntezeit-Genotyp-Interaktion $p < 0,001$). Die Propionat-Gehalte waren niedriger, wenn Gerste aus dem Schossen inkubiert wurde ($p < 0,001$). Daraus ergab sich, dass das Verhältnis von Acetat zu Propionat niedriger war, wenn Gerste in der Milchreife geerntet wurde ($p < 0,001$). Der Anteil von n-Butyrat war am höchsten, wenn WT im Schossen geerntet wurde ($p < 0,001$). Der Anteil an Isobutyrat war im Allgemeinen höher, wenn *rob1* inkubiert wurde ($p < 0,001$) und bei beiden Genotypen niedriger, wenn sie zum späteren Termin geerntet wurden ($p < 0,001$). Der gleiche Effekt des Erntedatums wurde für Isovalerat festgestellt ($p < 0,001$), während der Caproatgehalt höher war, wenn Gerste zum Schossen inkubiert wurde ($p < 0,001$).

Die Ammoniakkonzentration spiegelt die Rohproteinkonzentration der verfütterten Proben wieder und war in der Fermenterflüssigkeit deutlich niedriger, wenn milchreife Gerste inkubiert wurde ($p < 0,001$). Bei *rob1* war die Ammoniakkonzentration generell höher ($p < 0,001$).

Tabelle 3: Fermenterflüssigkeitsparameter von kurzkettigen Fettsäuren und die Gasproduktion

Mittelwerte mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich laut Tukey-Test nicht signifikant ($p=0,05$) voneinander.

Gerstengenotyp	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)				p-Wert	
	Optic		SEM			
Erntezeitpunkt	BBCH35	BBCH73	BBCH35	BBCH73	Genotyp	GxE
pH-Wert	6,79 ^a	6,65 ^b	6,84 ^a	6,76 ^a	0,002	<0,001
Redox potential (mV)	-291 ^a	-208 ^b	-296 ^a	-223 ^b	0,059	<0,001
Gesamt SCFA (mmol/L)	102 ^a	98,6 ^{ab}	103 ^a	90,1 ^b	0,103	0,003
<i>Molare Anteile (%)</i>						
Acetat	56,3 ^{ab}	52,0 ^c	56,7 ^a	55,5 ^b	<0,001	<0,001
Propionat	27,1 ^{ab}	27,6 ^a	26,2 ^b	27,9 ^a	0,226	<0,001
<i>n</i> -Butyrat	10,1 ^b	13,5 ^a	10,4 ^b	10,2 ^b	<0,001	<0,001
<i>iso</i> -Butyrat	0,828 ^b	0,562 ^c	1,034 ^a	0,603 ^c	<0,001	<0,001
<i>n</i> -Valerat	3,33 ^a	2,86 ^b	3,11 ^{ab}	2,76 ^b	0,162	0,001
<i>iso</i> -Valerat	1,65 ^d	2,12 ^b	1,95 ^c	2,28 ^a	<0,001	<0,001
Caproat	0,701 ^b	1,30 ^a	0,662 ^b	0,837 ^b	<0,001	<0,001
Acetate:Propionat	2,08 ^{ab}	1,89 ^c	2,17 ^a	1,99 ^{bc}	0,001	<0,001
Ammonium (mmol/l)	11,89 ^b	2,66 ^d	17,94 ^a	4,53 ^c	<0,001	<0,001
<i>Gasproduktion (ml/Tag)</i>						
Methan	102 ^a	108 ^a	72,2 ^b	91,4 ^{ab}	0,002	0,055
Kohlendioxid	533	528	461	496	0,131	0,639
						0,540

Die Methanbildung war niedriger, wenn *rob1* inkubiert wurde, im Vergleich zu WT ($p=0,002$). Hierbei gab es eine Tendenz zu einer geringeren Methanproduktion bei Proben aus dem Schossen ($p=0,055$). Es konnten keine Auswirkungen auf die CO₂-Bildung ausgehend vom Gerstengenotyp oder Erntestadium festgestellt werden.

4.3. Mikrobenzusammensetzung im Pansen

Die Diversitätsindizes und die Unterschiede in der Individuenzahl einzelner Mikrobenarten zueinander wurden sowohl durch den Genotyp als auch den Erntezeitpunkt beeinflusst (Tabelle 4).

Der Artenreichtum und die Anzahl der beobachteten OTUs war niedriger, wenn Gerste im Schossen inkubiert wurde ($p<0,001$ und $p=0,002$). Besonders ausgeprägt war dies bei *rob1* ($p=0,026$ und $p=0,067$). Ähnlich war es auch bei der Artenvielfalt, die niedriger war bei Proben aus dem Schossen. Dies zeigten sowohl der Simpson-Index als auch der Shannon-Index auf ($p<0,001$ und $p=0,031$), was sich bei inkubierten Proben von *rob1* zusätzlich verstärkte ($p=0,01$). Die *Principal Coordinates Analysis* (PCoA) ergab eine deutliche Clusterbildung zwischen den verschiedenen Erntezeitpunkten und auch zwischen den beiden Gerstenarten (Abbildung 12). Die am häufigsten vorkommenden Phyla (Tabelle 4) waren *Bacteroidetes* mit einem durchschnittlichen Aufkommen von 48%, gefolgt von *Firmicutes* (33%), *Fibrobacteres* (5,6%), *Spirochaetes* (4%), *Tenericutes* (3%) und *Lentisphaerae* (1,6%). *Bacteroidetes* und *Lentisphaerae* unterschieden sich nach den Genotypen ($p=0,015$ und $p<0,001$). Das Aufkommen von *Bacteroidetes* war höher, wenn *rob1* inkubiert wurde, das Gegenteil war der Fall für *Lentisphaerae*.

Die meisten Phyla waren vom Erntezeitpunkt beeinflusst. Das Aufkommen von *Bacteroidetes*, *Synergistetes* und *Tenericutes* war niedriger, wenn Gerste in der frühen Milchreife geerntet und inkubiert wurde, zugleich erhöhte sich aber die Fülle von *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Eremiobacterota* ($p<0,001$).

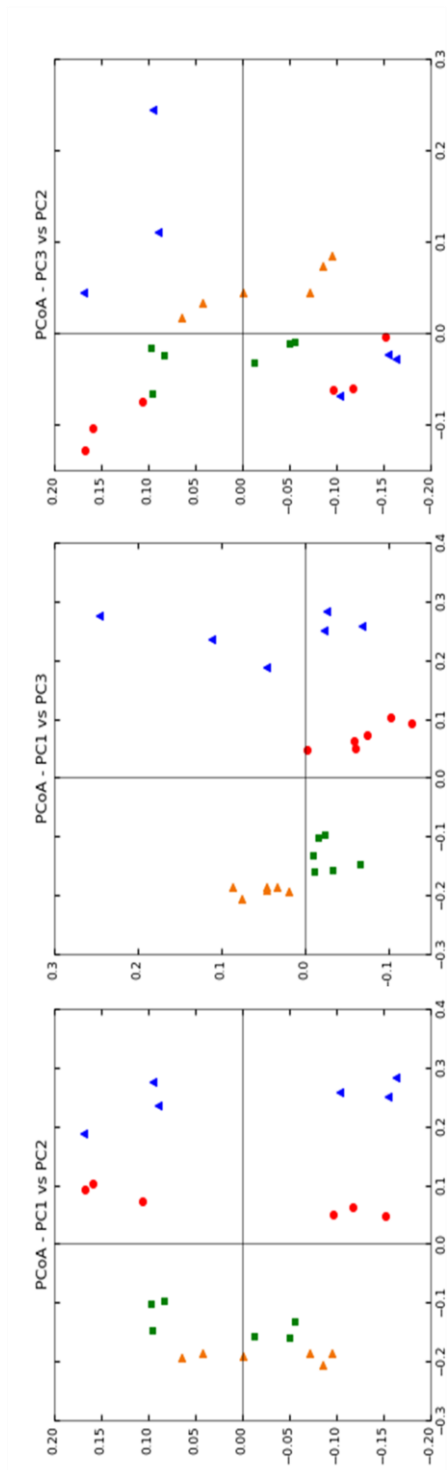


Abbildung 12: Hauptkoordinatenanalysen der β -Diversität zwischen Pansenbakteriengemeinschaften, die mit der Gerstensorte 'Optic', im Stadium des Schossens (rot) oder in der Milchreife (gelb) inkubiert wurden.

Die rob1 Mutante wurde in den gleichen Entwicklungsstadien inkubiert (blau und grün)

(a) Hauptkomponente (PC) 1 (x-Achse) gegenüber PC2 (y-Achse);

(b) PC1 (x-Achse) gegenüber PC3 (y-Achse);

(c) PC2 (x-Achse) gegenüber PC3 (y-Achse).

PC1: 43,3%; PC2: 16,2 %; PC3: 8,5%.

Tabelle 4: Artenreichtum der Pansenbakterien während der Fermentation von Probenmaterial der Sorte 'Optic' und der Mutante rob1
Laut Tukey Test unterschieden sich jene Werte einer Zeile, denen die gleichen Buchstaben (a,b) folgen nicht signifikant
p=0,05

Gerstengenotyp	Optic		EMS_R0013_33 (Optic rob1)		SEM		p-Wert	
	Schossen (BBCH35)	Milchreife (BBCH 73)	Schossen (BBCH35)	Milchreife (BBCH73)	Genotyp (G)	Erntezeitpunkt (E)	G×E	
Chao I	4162 ^a	4392 ^a	3791 ^b	4323 ^a	116,7	0,026	<0,001	0,114
Shannon	8,45 ^b	8,70 ^a	8,08 ^c	8,55 ^{ab}	0,064	<0,001	<0,001	0,090
Simpson	0,989 ^{ab}	0,992 ^a	0,983 ^b	0,988 ^{ab}	0,002	0,010	0,031	0,388
ermittelte OTUs	2950 ^{ab}	3164 ^a	2636 ^b	3111 ^a	132,3	0,067	0,002	0183

Tabelle 5: Prozentuale Häufigkeit der am häufigsten vorkommenden identifizierten Bakterienstämme in der Fermenterflüssigkeit, die von der inkubierten Gerste beeinflusst werden

Laut Tukey Test unterscheiden sich jene Werte einer Zeile, denen die gleichen Buchstaben (a,b,c) folgen nicht signifikant $p=0,05$

Stamm/ Gattung	Optic		EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)		SEM	<i>p</i> -Wert		
	Schossen (BBCH35)	Milchreife (BBCH73)	Schossen (BBCH35)	Milchreife (BBCH73)		Genotyp (G)	Erntezeitpunkt (E)	G×E
Actinobacteria	0,267 ^b	0,381 ^b	1,04 ^a	0,299 ^b	0,051	<0,001	<0,001	<0,001
Bacteroidetes	48,7	46,1	51,4	46,8	1,586	0,015	<0,001	0,158
<i>Bacteroides</i>	0,030 ^b	0,138 ^a	0,025 ^b	0,042 ^b	0,012	<0,001	<0,001	<0,001
BF311	0,315	0,363	0,455	0,426	0,023	<0,001	0,666	0,107
CF231	1,34 ^a	1,52 ^a	0,580 ^b	1,35 ^a	0,211	<0,001	<0,001	0,002
<i>Paludibacter</i>	<0,001 ^b	0,080 ^a	0,002 ^b	0,016 ^b	0,006	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Prevotella</i>	16,9	17,1	18,9	17,4	1,02	0,033	0,212	0,117
YRC22	0,216 ^b	0,392 ^a	0,161 ^b	0,223 ^b	0,021	<0,001	<0,001	0,004
Chloroflexi	0,044 ^a	0,027 ^{bc}	0,016 ^c	0,033 ^b	0,009	0,011	0,969	<0,001
Cyanobacteria	0,229	0,668	0,062	0,246	0,089	<0,001	<0,001	0,246
Elusimicrobia	0,747 ^c	2,50 ^a	0,304 ^d	1,35 ^b	0,272	<0,001	<0,001	0,004
<i>Elusimicrobium</i>	0,175	0,131	0,201	0,082	0,114	0,721	0,018	0,246
Euryarchaeota	0,005	0,006	0,008	0,004	0,002	0,761	0,341	0,075
Fibrobacteres	6,25 ^{ab}	5,56 ^b	2,93 ^c	7,68 ^a	0,948	0,204	<0,001	<0,001
<i>Fibrobacter</i>	6,25 ^{ab}	5,56 ^b	2,93 ^c	7,68 ^a	0,948	0,204	<0,001	<0,001
Firmicutes	33,2	32,9	32,1	33,1	1,660	0,606	0,696	0,463
<i>Anaerofustis</i>	0,011	0,012	0,016	0,019	0,004	0,064	0,564	0,838
<i>Anaerostipes</i>	0,088 ^{bc}	0,409 ^a	0,014 ^c	0,161 ^b	0,035	<0,001	<0,001	0,024
<i>Anaerovibrio</i>	0,145	0,379	0,182	0,401	0,057	0,399	<0,001	0,832
<i>Anaerovorax</i>	0,055	0,051	0,070	0,064	0,010	0,100	0,553	0,921
<i>Asteroleplasma</i>	0,101 ^{ab}	0,130 ^{ab}	0,160 ^a	0,080 ^b	0,016	0,778	0,117	0,003

<i>Bulleidia</i>	0,024	0,041	0,016	0,027	0,003	0,005	<0,001	0,421
<i>Butyrivibrio</i>	1,54 ^b	0,726 ^c	2,34 ^a	0,673 ^c	0,101	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Catenibacterium</i>	0,120	0,256	0,166	0,270	0,086	0,442	0,005	0,675
<i>Clostridium</i>	0,771	0,719	0,598	0,725	0,050	0,108	0,461	0,087
<i>Coprococcus</i>	0,667	0,335	0,861	0,410	0,073	0,017	<0,001	0,264
<i>Dehalobacterium</i>	0,016	0,024	0,003	0,022	0,004	0,013	<0,001	0,070
<i>Fusibacter</i>	0,024	0,014	0,040	0,031	0,008	0,059	0,238	0,943
L7A-E11	0,054	0,062	0,032	0,064	0,012	0,195	0,021	0,136
<i>Lachnospira</i>	0,040 ^b	<0,001 ^b	0,221 ^a	0,005 ^b	0,018	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Lactobacillus</i>	0,207 ^b	0,369 ^a	0,118 ^b	0,470 ^a	0,041	0,882	<0,001	0,031
<i>Megasphaera</i>	0,026	0,033	0,014	0,029	0,015	0,245	0,110	0,511
<i>Mogibacterium</i>	0,026	0,018	0,019	0,021	0,003	0,621	0,368	0,182
<i>Moryella</i>	0,014 ^a	0,010 ^{ab}	0,004 ^b	0,013 ^{ab}	0,002	0,182	0,288	0,010
<i>Oscillospira</i>	0,144	0,081	0,153	0,081	0,009	0,591	<0,001	0,591
p-75-a5	0,106	0,127	0,075	0,115	0,019	0,018	0,001	0,274
PSB-M-3	0,079 ^a	0,044 ^b	0,050 ^b	0,062 ^{ab}	0,008	0,378	0,084	0,001
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0,828	0,289	1,35	0,478	0,164	<0,001	<0,001	0,070
RFN20	0,419	0,534	0,318	0,526	0,040	0,089	<0,001	0,143
<i>Roseburia</i>	0,013 ^b	0,340 ^a	0,018 ^b	0,082 ^b	0,052	0,023	0,001	0,019
<i>Ruminococcus</i>	0,861	0,638	0,894	0,500	0,045	0,260	<0,001	0,072
<i>Selenomonas</i>	0,335	0,285	0,297	0,259	0,017	0,081	0,022	0,728
<i>Sharpea</i>	0,017	0,049	0,009	0,021	0,020	0,110	0,054	0,375
<i>Shuttleworthia</i>	0,271	0,371	0,259	0,169	0,108	0,099	0,943	0,143
<i>Streptococcus</i>	0,177 ^a	0,085 ^b	0,182 ^a	0,172 ^a	0,026	0,023	0,014	0,043
<i>Succiniclacticum</i>	2,07	2,83	1,88	2,30	0,141	0,018	<0,001	0,250
<i>Fusobacteria</i>	0,006 ^b	0,050 ^a	0,006 ^b	0,011 ^b	0,004	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Fusobacterium</i>	0,006 ^b	0,050 ^a	0,006 ^b	0,011 ^b	0,004	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Lentisphaerae</i>	1,57	1,93	1,07	1,65	0,222	<0,001	<0,001	0,079
<i>Proteobacteria</i>	0,704 ^c	2,22 ^a	1,04 ^c	1,50 ^b	0,110	0,096	<0,001	<0,001

<i>Desulfovibrio</i>	0,010	0,007	0,018	0,009	0,002	0,032	0,009	0,180
<i>Ruminobacter</i>	0,002 ^c	0,172 ^a	0,002 ^c	0,086 ^b	0,023	0,004	<0,001	0,004
<i>Succinivibrio</i>	0,239	0,346	0,501	0,465	0,053	0,002	0,515	0,194
<i>Spirochaetes</i>	3,61	4,36	4,54	3,58	0,377	0,791	0,697	0,005
<i>Sphaerochaeta</i>	1,52	1,40	1,78	1,36	0,103	0,263	0,013	0,134
<i>Treponema</i>	1,66	2,46	2,43	1,73	0,422	0,932	0,797	0,002
<i>Synergistetes</i>	0,555	0,420	0,704	0,457	0,052	0,008	<0,001	0,089
<i>Pyramidobacter</i>	0,527	0,370	0,674	0,419	0,057	0,004	<0,001	0,118
TG5	0,020	0,040	0,019	0,028	0,006	0,030	<0,001	0,070
<i>Tenericutes</i>	3,44	1,93	4,33	2,33	0,616	0,152	<0,001	0,577
<i>Anaeroplasma</i>	1,26	0,561	1,25	0,759	0,086	0,118	<0,001	0,080
TM7	0,321	0,446	0,338	0,393	0,044	0,685	0,051	0,426
<i>Verrucomicrobia</i>	0,255	0,410	0,167	0,327	0,022	<0,001	<0,001	0,910
<i>Eremiobacterota</i>	0,050	0,148	0,021	0,097	0,008	<0,001	<0,001	0,203

Für das Phylum *Fibrobacteres* und die Gattung *Fibrobacter* wurde eine Wechselwirkung zwischen Gerstengenotyp und Erntezeitpunkt festgestellt. Deren Aufkommen war am geringsten, wenn *rob1* im Schossen geerntet und inkubiert wurde. Das Aufkommen von *Fibrobacter* erhöhte sich, wenn *rob1* in der Milchreife geerntet und inkubiert wurde (Ernte×Genotyp Interaktion $p<0,001$). Das Gegenteil wurde für die Gattung *Treponema* festgestellt, deren Aufkommen bei der Beerntung und Inkubierung von 'Optic' in der Milchreife anstieg (Ernte×Genotyp Interaktion $p=0,002$).

Die mit Abstand am häufigsten vorkommende Bakteriengattung war *Prevotella* (Mittelwert 17,5%), deren Überhang noch höher wurde, wenn *rob1* inkubiert wurde ($p=0,033$). Der Erntezeitpunkt hatte darauf aber keinen Einfluss. Das Aufkommen der Gattung *Succiniclacticum* war niedriger wenn *rob1* inkubiert wurde ($p=0,018$) und stieg wenn milchreife Pflanzen inkubiert wurden ($p<0,001$). *Butyrivibrios* wurden sowohl vom Genotyp als auch vom Erntezeitpunkt beeinflusst ($p<0,001$). Deren Häufigkeit in den Fermenter-Flüssigkeitsproben stieg, wenn *rob1* im Stadium des Schossens inkubiert wurde und sank unabhängig vom Genotyp, wenn milchreife Gerstenpflanzen inkubiert wurden. Die Gattung *Sphaerochaeta* wurde nicht vom Gerstengenotyp beeinflusst, aber das Aufkommen war geringer, wenn milchreife Gerstenpflanzen inkubiert wurden ($p=0,013$). Die relative Häufigkeit von *Anaeroplasm*a unterschied sich nicht zwischen den Gersten-Genotypen, fiel aber deutlich ab, wenn Pflanzen aus dem Schossen inkubiert wurden ($p<0,001$). Das Aufkommen der Gattung *Pseudobutyrvibrio* war höher, wenn *rob1* ($p<0,001$) oder Pflanzen aus dem Schossen inkubiert wurden ($p<0,001$). Es wurden mehrere Intergenera-Korrelationen festgestellt, die auf mögliche Abhängigkeiten bei Nährstoffversorgung durch „Cross-Feeding“ hindeuten (Abbildung 13). Es wurden zusätzliche Korrelationen zwischen Gattungen und Fermentationsparametern wie pH-Wert, NH_3 und SCFA Konzentration sowie Nährstoffgehalte im Futtermittel und deren Abbaubarkeit festgestellt.

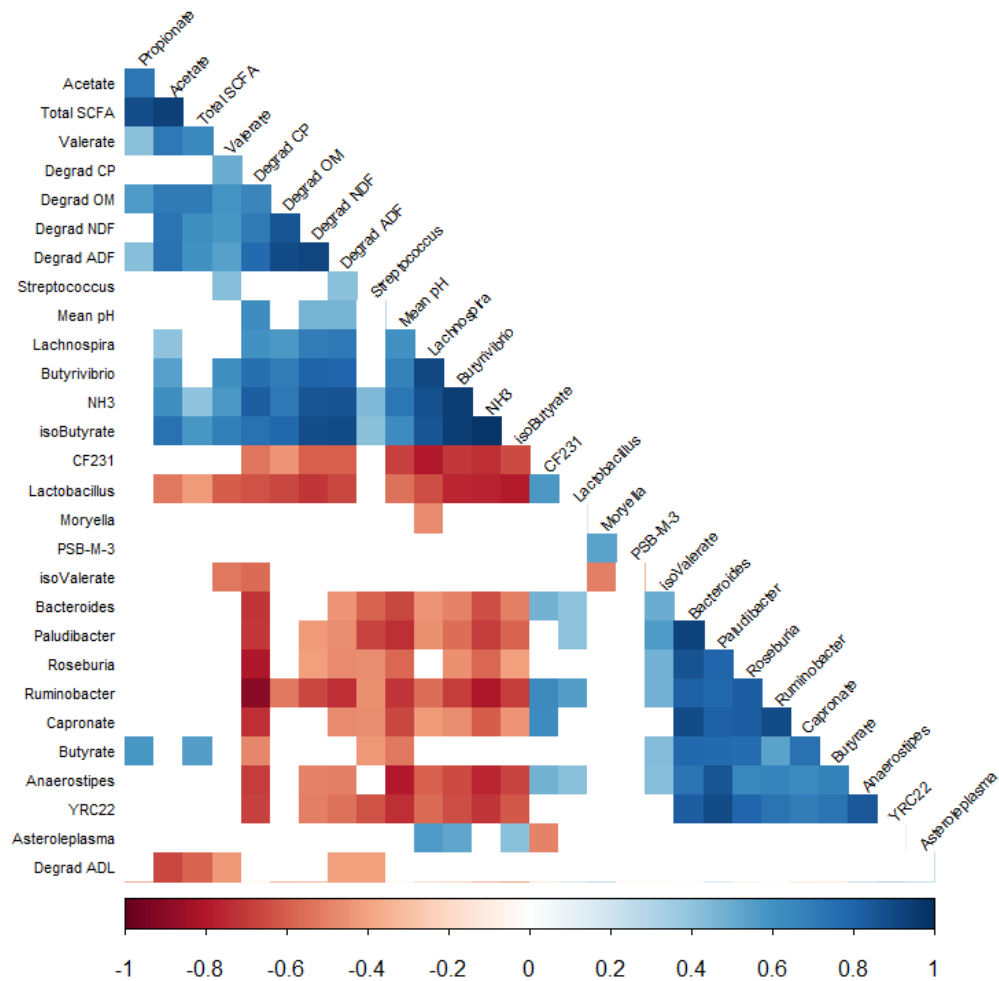


Abbildung 13: Der Einfluss von Cross-Feeding auf die mikrobielle Zusammensetzung in der Fermenterflüssigkeit

5. Diskussion

Das Unterscheidungsmerkmal der *orange lemma* Gerste zum Wildtyp ist eine Mutation im Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD) Gen, welches im finalen Syntheseschritt die Lignin Biosynthese katalysiert. Dementsprechend hatte die Mutation *rob1* einen geringeren ADL Gehalt als der Wildtyp. Zum Schossen (1,39% vs. 1,85% in der Trockenmasse) und früher Milchreife (2,60% vs. 2,86% in der Trockenmasse). Ähnliche Ergebnisse wurden von Meyer & Zwinger (2006) und Meyer *et al.* (2006) für die Sorte 'Bowman' berichtet. Generell wird die Zellwand-Konzentration in der Trockenmasse durch das Vegetationsstadium beeinflusst. Die Ursachen dafür sind pflanzenmorphologische Unterschiede im Blatt-Halm-Verhältnis (Khorasani *et al.* 1997; Vogel & Jung 2001). Speziell bei Getreidepflanzen wird die Nährstoff-Zusammensetzung durch den Reife-Grad der Körner beeinflusst (Khorasani *et al.* 1997; Wallsten *et al.* 2010). Das Reifestadium der Getreidepflanzen hat einen beträchtlichen Effekt auf Stärke- und Proteingehalte der Trockenmasse, wobei in milchreifen Pflanzen der Stärkegehalt steigt und gleichzeitig der Proteingehalt sinkt (Khorasani *et al.* 1997). Laut einer Studie von Mannerkorpi & Taube *et al.* (1995) fällt der Grad der Verdaulichkeit von Rohprotein und organischer Masse deutlich bis zur Kornfüllung ab. Dementsprechend wurde aufgrund eines niedrigeren Rohproteingehaltes im Futter beim späteren Vegetationsstadium weniger Ammoniak frei (Nocek & Russel 1988). Unerwartet war bei der Ernte in der frühen Kornfüllung die Abbaubarkeit der organischen Masse für *rob1* geringer als für den Wildtyp 'Optic', trotz des geringeren ADL-Gehalts. Wahrscheinlich erklärt der höhere Stärkegehalt von 'Optic' die höhere Verdaulichkeit der organischen Masse, weil der Stärkegehalt doppelt so hoch wie bei *rob1* beim späteren Erntetermin war. Es scheint als könnte der niedrigere ADL-Wert von *rob1* den niedrigen Stärkegehalt der frühen Getreideentwicklung, bezüglich OM-Verdaulichkeit, und demnach die Verfügbarkeit von Nährstoffen nicht ausgleichen. Weschke *et al.* (2000) und Radchuk *et al.* (2009) zeigten, dass die Stärke-Biosynthese im Gerstenkorn zwischen Tag 8 und 16 nach der Blüte exponentiell steigt. Daher waren Kornentwicklung und Stärke-Anreicherung von

rob1, die 1 - 2 Tage in der Kornausbildung zurücklag, nicht so weit fortgeschritten im Vergleich zu 'Optic' beim zweiten Erntetermin. Wie schon von Collar *et al.* (2004) erwähnt, sind die negativen Effekte von faserigeren Stängeln und Blättern mit fortgeschrittener Reife höher als der Ausgleich durch die Entwicklung von nichtfasrigen Körnern die mehr Stärke enthalten. Im Pansen wird Stärke schnell zu Propionat fermentiert (Bergman 1990), was den erhöhten Propionatanteil und das verringerte Verhältnis von Acetat zu Propionat bei früher Milchreife aufgrund des erhöhten Stärkegehaltes verursacht.

Ein interessantes Ergebnis der Untersuchungen war die niedrigere Methanbildung beim Inkubieren von *rob1*, insbesondere bei den Proben aus dem Schossen (– 30%). Gleichzeitig kam es zu einer höheren NDF-Abbaubarkeit von *rob1* im Schossen, was so grundsätzlich nicht zu erwarten war. Denn eine erhöhte Faserfermentation kann bekanntermaßen für eine stärkere Methanbildung verantwortlich sein, während die Erhöhung des Stärkegehalts die Methanbildung verringern kann (Hatew *et al.* 2015). Die SCFA-Konzentrationen und -Profile waren jeweils gleich und lieferten somit keine Erklärung für die unterschiedliche Methanproduktion.

Darüber hinaus war die Anzahl an DNA-Sequenzen, die auf den Stamm *Euryarchaeota* zurückzuführen sind, eher untergeordnet. Es gab hierbei auch keine Unterschiede zwischen den Genotypen und Erntezeitpunkten der Proben. Es müssen somit andere Gründe dafür verantwortlich gewesen sein, dass die Methanproduktion bei *rob1* geringer war. Veränderungen der Nährstoffe wirken sich jedenfalls auf Wiederkäuermikroben aus, was sich in Verschiebungen der mikrobiellen Populationen äußerte (de Menezes *et al.* 2011; Petri *et al.* 2013; Klevenhusen *et al.* 2017). Dies war auch in dieser Verdaulichkeitsstudie feststellbar. In den Proben wurde eine klare Clusterbildung von OTUs zwischen den verschiedenen Reifestadien festgestellt, die wahrscheinlich durch die Unterschiede bei den vorhandenen Nährstoffen (Protein vs. Stärke) verursacht wurden.

Der erhöhte Stärkegehalt förderte im konkreten Fall die mikrobielle Vielfalt und den Artenreichtum, was anderen Beobachtungen und Veröffentlichungen widerspricht

(Zened *et al.* 2013). Der Stärkegehalt zur Milchreife in der konkreten Studie kann als niedrig verglichen zu den Proben anderer Verdaulichkeitsstudien eingestuft werden, bei denen die Effekte der Futtergrundlage auf das Pansenmikrobiom bei Milchkühen getestet wurden. Genauso führt auch eine Veränderung des Proteingehaltes zu Auswirkungen auf das Pansenmikrobiom.

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Pansenmikroben aus dem Pansensaft von Milchkühen untersucht, welche vom vorliegenden Faserangebot im Pansen abhängig sind (Klevenhusen *et al.* 2017). Konkret wurden die Auswirkungen auf Grund der veränderten Zellwandzusammensetzung bei *rob1* auf die Pansenbakterien untersucht.

Trotz der Extraktion von ausschließlich flüssigkeitsassoziierten Mikroben wurden starke Effekte auf die faserabbauende Gattung *Fibrobacter* gefunden. Wie durch Shinkai & Kobayashi (2007) festgestellt, zeigt *Fibrobacter succinogenes* eine stärkere metabolische Aktivität auf schwerer verdaulichen Ballaststoffen, wie diese beispielsweise in den Stängelanteilen von Heu vorkommen. Im Gegensatz dazu, ist *Ruminococcus flavefaciens* eher auf leichter verdaulichen Fasern und weniger an Stängelanteilen zu finden. Diese Erkenntnisse können die vorliegenden Ergebnisse der Korrelationsanalysen und die geringere relative Häufigkeit von *Fibrobacter* in den inkubierten Proben von *rob1* aus dem Schossen bei gleichzeitig erhöhtem Aufkommen von *Ruminococcus* erklären. Jüngste Studien mit metatranskriptomischen Analysen bestätigten, dass die wichtigsten Bakteriengattungen, die für den Abbau von Zellwandbestandteilen verantwortlich sind, zu den Gattungen *Ruminococcus*, *Fibrobacter* und *Prevotella* gehören (Dai *et al.* 2015; Comtet-Marre *et al.* 2017). Tatsächlich wurden positive Korrelationen zwischen Zellwandfraktionen und der relativen Häufigkeit der Gattungen *Fibrobacter* und *Ruminococcus* festgestellt. *Fibrobacter* korrelierte mit dem NDF- und ADL-Gehalt im Futter sowie mit der ADL-Abbaubarkeit, während *Ruminococcus* mit NDF-Gehalt und der NDF- und ADF-Abbaubarkeit korrelierte. Keine Korrelation zwischen Zellwandbestandteilen und ihrer Verdaulichkeit wurde für *Prevotella* gefunden. *Prevotella* korrelierte sogar negativ mit der Abbaubarkeit von ADL.

Prevotella war jedoch in allen Proben reichlich vorhanden, was auch die Erkenntnisse

anderer Studien bestätigte, die *Prevotella* eine große Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Substrate unterstellen (Avguštin et al. 1997; Petri et al. 2013).

Neben *Prevotella* wurden auch andere Gattungen wie zum Beispiel *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio* und *Succiniclasicum* durch den Gerstengenotyp beeinflusst. Die Häufigkeit der Gattung *Butyrivibrio* war im Allgemeinen niedriger, wenn Gerste im Stadium der Milchreife inkubiert wurde. Hingegen war das Aufkommen am größten, wenn *rob1* im Schossstadium inkubiert wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse könnten mit dem Rohprotein-Gehalt des Futters zusammenhängen, da einige Stämme von *Butyrivibrio*, die zum Kernmikrobiom gehören (Henderson et al. 2015), dafür bekannt sind, eine wichtige Rolle beim Protein-Abbau zu spielen (Cotta & Hespel 1986). Insofern wurden starke Korrelationen zwischen *Butyrivibrio* und dem Rohprotein-Gehalt, der Rohprotein-Abbaubarkeit und der Konzentration von Isobutyrat, welches ein Fermentationsprodukt aus der oxidativen Desaminierung und Decarboxylierung von verzweigtkettigen Aminosäuren ist (Andries et al. 1987), festgestellt. Wie bei *Butyrivibrio*, war das Aufkommen von *Pseudobutyrvibrio* höher, wenn Gerste im Schossen geerntet und inkubiert wurde. Dieser Effekt verstärkte sich bei *rob1* zusätzlich. Bestimmte Stämme von *Pseudobutyrvibrio* sind bekannt dafür, dass sie Fructan, Inulin, Saccharose, Fructose und Glukose als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können (Van Gylswyk et al. 1996; Kasperowicz et al. 2009). Somit können die Ergebnisse durch die höheren Gehalte an wasserlöslichen Kohlehydraten zu den frühen Ernteterminen von *rob1* hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu war die relative Häufigkeit generell höher, wenn der Wildtyp inkubiert wurde. *Succiniclasicum* ist spezialisiert auf die Fermentierung von Succinat und Umwandlung in Propionat. Es gilt auch als bewiesen, dass *Succiniclasicum* eng an Weizen- und Reisstroh minderer Qualität gebunden ist (Cheng et al. 2018; Jin et al. 2018), weshalb es wahrscheinlich eine wichtige Rolle beim Abbau von Pflanzenfasern spielt. In der vorliegenden Studie gab es jedoch keine Korrelation zwischen *Succiniclasicum* und der Propionatkonzentration im Inkubationsmedium.

Zusammenfassend hatte die *orange lemma* (*rob1*) Mutante niedrigere ADL-Inhalte als

der Wildtyp 'Optic', während der Rohprotein-Gehalt in der Mutante höher war. Die *in vitro* Pansenabbaubarkeit der Faserfraktion NDF war bei *rob1* höher, wenn die Gerste im Schossen geerntet wurde. Es wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt, wenn die Gerste in der Milchreife geerntet wurde. Änderungen im Mikrobiom der Fermenter wurden signifikant im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Nährstoffversorgung auf Grund der jeweiligen Erntezeitpunkte beobachtet.

Eine unerwartete Erkenntnis dieser Untersuchung war die deutlich geringere Stärkemenge in *rob1* im Vergleich zum WT, wenn in der Milchreife geerntet wurde. Dies kann auf eine leichte Entwicklungsverzögerung bei *rob1* zurückgeführt werden. Dementsprechend ist es trotz einer ähnlichen Faserabbaubarkeit zu einem signifikant niedrigeren Abbau der gesamten organischen Masse bei *rob1* im Vergleich zum Wildtyp gekommen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Gerstenähre (Quelle: modifiziert nach Williams-Carrier et al. 1997).

Abbildung 2: Orange gefärbte Pflanzenteile der Mutante *rob1 orange lemma* (links im Bild) und grün gefärbte Pflanzenteile vom Wildtyp 'Optic' (rechts im Bild)

Abbildung 3: Luftbild der gelb umrandeten Versuchsfläche in Raasdorf, der rote Punkt kennzeichnet die Lage des nächst gelegenen und beschriebenen Bodenprofils (Quelle: modifiziert nach eBod 2020).

Abbildung 4: Geschlossene und befüllte Fermenter von RUSITEC im temperierten Wasserbad während des Versuchslaufes

Abbildung 5: Sammelbehältnisse für den Outflow aus den Fermentern auf Eis gelagert

Abbildung 6: Fistulierte Kuh mit bereits geöffneter Pansenfistel kurz vor der Pansensaftentnahme

Abbildung 7: Aufnahme während des Durchstoßens der Fasermatte im Pansen

Abbildung 8: Geöffneter Fermenter während des Befüllens mit frischen Nylon-Futtersäckchen

Abbildung 9: Spülvorgang der fertig fermentierten und entnommenen Futtersäckchen

Abbildung 10: pH-Messung und Redoxpotentialmessung des Fermenterinhalt

Abbildung 11: Gasvolumenmessung mittels Wasserverdrängungsmethode

Abbildung 12: Hauptkoordinatenanalysen der β -Diversität von Pansenbakteriengemeinschaften, die mit der Gerstensorte 'Optic', im Schossen (rot) und in der Milchreife (gelb) inkubiert wurden. Die *rob1* Mutante wurde in den gleichen Stadien inkubiert (blau und grün)

(a) Hauptkomponente (PC) 1 (x-Achse) gegenüber PC2 (y-Achse); (b) PC1 (x-Achse) gegenüber PC3 (y-Achse); (c) PC2 (x-Achse) gegenüber PC3 (y-Achse).
PC1: 43,3%; PC2: 16,2 %; PC3: 8,5%.

Abbildung 13: Der Einfluss von Cross-Feeding auf die mikrobielle Zusammensetzung in der Fermenterflüssigkeit

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Globale Anbaufläche und Produktion der weltweit zehn wichtigsten Kulturarten (FAO 2019)

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des Probenmaterials

Tabelle 3: Fermenterflüssigkeitsparameter von kurzkettigen Fettsäuren und die Gasproduktion

Tabelle 4: Artenreichtum der Pansenbakterien während der Fermentation von Probenmaterial der Sorte 'Optic' und der Mutante rob1

Tabelle 5: Prozentuale Häufigkeit der am häufigsten vorkommenden identifizierten Bakterienstämme in der Fermenterflüssigkeit, die von der inkubierten Gerste beeinflusst werden

8. Literaturverzeichnis

- Andries JI, Buysse FX, De Brabander DL, Cottyn BG (1987) Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances – a review. *Animal Feed Science and Technology* 18, 169–180. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(87\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(87)90069-1)
- Avguštin G, Wallace RJ, Flint HJ (1997) Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella byantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 284–288. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-284>
- Baron VS, Dick AC, McCartney D, Basarab JA, Okine EK (2006) Carrying capacity, utilization, and weathering of swathed whole plant barley. *Agronomy Journal* 98, 714–721. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0171>
- Bell LW, Moore AD, Kirkegaard JA (2014) Evolution in crop–livestock integration systems that improve farm productivity and environmental performance in Australia. *European Journal of Agronomy* 57, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.04.007>
- BFW (2020) ebod - digitale Bodenkarte von Österreich. Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald, Naturgefahren und Landschaft (BFW), Wien. [http://gis.lebensministerium.at/eBOD/frames/index.php?&gui_id=eBOD; besucht am 20. Juni 2020]
- Belanche A, Kingston-Smith AH, Griffith GW, Newbold CJ (2019) A multikingdom study reveals the plasticity of the rumen microbiota in response to a shift from non-grazing to grazing diets in sheep. *Frontiers in Microbiology* 10, 122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00122>
- Bergman EN (1990) Energy contribution of VFA from the gastrointestinal tract in various species. *APS Physiological Reviews* 70, 567–590. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>

- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* 10, 57–66. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Briggs DE (1978) Barley genetics. In: Briggs DE (Ed), *Barley*, pp 419-444. Chapman & Hall, London.
- Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Gonzalez Peña A, Goodrich JK, Godon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Chapple C, Ladisch M, Meilan R (2007) Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nature Biotechnology* 25, 746–748. <https://doi.org/10.1038/nbt0707-746>
- Chen F, Dixon RA (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* 25, 759–761. <https://doi.org/10.1038/nbt1316>
- Cheng Y, Wang Y, Li Y, Zhang Y, Liu T, Wang Y, Sharpton TJ, Zhu W (2018) Progressive colonization of bacteria and degradation of rice straw in the rumen by Illumina Sequencing. *Frontiers in Microbiology* 8, 2165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02165>
- Collar C, Wright S, Robinson P, Putnam D (2004) Effect of harvest timing on yield and quality of small grain forage. *Proceedings of the 34th California Alfalfa and 2004 National Alfalfa Symposium*, 13–15 December, San Diego, CA, pp 141–148. Department of Agronomy and Range Science Extension, University of California, Davis, CA.
- Comtet-Marre S, Parisot N, Lepercq P, Chaucheyras-Durand F, Mosoni P, Peyretailade E, Bayat AR, Shingfield KJ, Peyret P, Forano E (2017) Metatranscriptomics reveals the active bacterial and eukaryotic fibrolytic communities in the rumen of dairy cow fed a mixed diet. *Frontiers in Microbiology* 8, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00067>

- Cotta MA, Hespel RB (1986) Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 51–58.
- Cuesta-Marcos A, Kling JG, Belcher AR, Filichkin T, Fisk SP, Graebner R, Helgerson L, Herb D, Meints B, Ross AS, Hayes PM, Ullrich SE (2016) Barley: Genetics and breeding, In: Wrigley CN, Corke H, Seetharam K, Faubion J (Eds), *Encyclopedia of food grains*, 2nd ed., vol. 4, The production and genetics of food grains, pp 287-289. Academic Press, Cambridge, MA. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00208-4>
- Dai X, Tian Y, Li J, Su X, Wang X, Zhao S, Liu L, Luo Y, Liu D, Zheng H, Wang J, Dong Z, Hu S, Huang L (2015) Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in the cow rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1375–1386. <https://doi.org/10.1128/AEM.03682-14>
- de Menezes AB, Lewis E, O'Donovan M, O'Neill BF, Clipson N, Doyle EM (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x>
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Entz MH, Baron VS, Carr PM, Meyer DW, Smith SR, McCaughey WP (2002) Potential of forages to diversify cropping systems in the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 94, 240–250. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.0240>
- Eticha F, Berghofer E, Grausgruber H (2009) Utilization of barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces in the highlands of West Shewa, Ethiopia. *Plant Genetic Resources* 7, 154–162. <https://doi.org/10.1017/S1479262108123474>
- FAO (2019) FAOSTAT – Food and Agriculture – Data - Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy. [<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>; besucht am 27. Juni 2021]
- Fisher LJ, Lessard JR, Lodge GA (1972) Whole crop barley as conserved forage for lactating cows. *Canadian Journal of Animal Science* 52, 497–504. <https://doi.org/10.4141/cjas72-059>

- Franckowiak JD, Konishi T, Lundqvist U (1997) Stock number: BGS 254. Locus name: Orange lemma. Locus symbol: rob. Barley Genetics Newsletter 26, 235-236. [<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/26/BGS251.html#235>; besucht am 6. Februar 2021]
- Fröier K, Hoffmann W, Sandegren E, Thunaeus H (1959) Gerste (*Hordeum vulgare* L.). In: Kappert H, Rudolf W (Hrsg), Handbuch der Pflanzenzüchtung, Band 2, 288-294. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Hadjichristodoulou A (1979) Sanokrithi 74 – a hooded barley for hay. Technical Bulletin 28, Agricultural Research Institute, Nikosia, Zypern.
- Harlan HV (1920) Smooth-awned barleys. Journal of the American Society of Agronomy 12, 205–208. <https://doi.org/10.2134/agronj1920.00021962001206-70004x>
- Hatew B, Cone JW, Pellikaan WF, Podesta SC, Bannink A, Hendriks WH, Dijkstra J (2015) Relationship between in vitro and in vivo methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. Animal Feed Science and Technology 202, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.012>
- Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH (2015) Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. Scientific Reports 5, 1456. <https://doi.org/10.1038/srep14567>
- Heuzé V, Tran G, Nozière P, Lebas F (2015) Barley forage. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. [<http://www.feedipedia.org/node/432>; besucht am 19. August 2020]
- Jin W, Wang Y, Li Y, Cheng Y, Zhu W (2018) Temporal changes of the bacterial community colonizing wheat straw in the cow rumen. Anaerobe 50, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.004>
- Jung H-JG, Samac DA, Sarath G (2012) Review: modifying crops to increase cell wall digestibility. Plant Science 185-186, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.014>

- Kasperowicz A, Stan-Glasek K, Guczynska W, Piknova M, Pristas P, Nigutova K, Javorsky P, Michalowski T (2009) Sucrose phosphorylase of the rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain A. *Journal of Applied Microbiology* 107, 812–820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04257.x>
- Khorasani GR, Jedel PE, Helm JH, Kennelly JJ (1997) Influence of stage of maturity on yield components and chemical composition of cereal grain silages. *Canadian Journal of Animal Science* 77, 259–267. <https://doi.org/10.4141/A96-034>
- Klevenhusen F, Petri RM, Kleefisch M-T, Khiaosa-ard R, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q (2017) Changes in fibre-adherent and fluid-associated microbial communities and fermentation profiles in the rumen of cattle fed diets differing in hay quality and concentrate amount. *FEMS Microbiology Ecology* 93, fix100. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix100>
- Kong Y, Teather R, Forster R (2010) Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiology Ecology* 74, 612–622. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00977.x>
- NOEL (2020) Wasserstandsnachrichten und Hochwasserprognosen. Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, Sankt Pölten. [<https://www.noel.gv.at/wasserstand/#/de/Messstellen/Details/108969/Niederschlag/Jahr2>; besucht am 1.6.2020].
- Lev-Yadun S, Gopher A, Abbo S (2000) The cradle of agriculture. *Science* 288, 1602–1603. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1602>
- Lundqvist U, Franckowiak JD (2003) Diversity of barley mutants. In: von Bothmer R, van Hintum T, Knüpfner H, Sato K (Eds), *Diversity in barley: Hordeum vulgare*, pp 77–96. Elsevier, Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/s0168-7972\(03\)80007-5](https://doi.org/10.1016/s0168-7972(03)80007-5)
- Mannerkorpi P, Taube F (1995) Feeding value of barley plants as related to stage of maturity 1. Morphological and chemical composition and *in vitro* digestibility. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science* 45, 147–152. <https://doi.org/10.1080/09064709509415845>

- McCartney D, Fraser J, Ohama A (2008) Annual cool season crops for grazing by beef cattle. A Canadian review. *Canadian Journal of Animal Science* 88, 517–533. <https://doi.org/10.4141/CJAS08052>
- Meyer DW, Zwinger SF (2006) Barley hay quality at Carrington. North Dakota State University, Department of Plant Sciences, Forages and Biomass Crop Production, Fargo, ND. [<https://www.ag.ndsu.edu/plantsciences/research/forages/docs/ForageQualityBarleyHay-Carrington2006.pdf>; besucht am 25. Juni 2021]
- Meyer D, Franckowiak J, Nudell R (2006) Forage quality of barley hay. ASA-CSSA-SSSA 2006 International Meetings, 12–16 November 2006, Indianapolis, USA, 266–15. [<https://www.ag.ndsu.edu/plantsciences/research/forages/docs/ForageQualityBarleyHay-Fargo2005-06.pdf>; besucht am 19. Juni 2021]
- Molina-Cano JL, Igartua E, Casas AM, Moralejo M (2002) New views on the origin of cultivated barley. In: Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I (Eds), *Barley science - Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality*, pp 15-31. Food Products Press, New York.
- Münnich M, Khol-Parisini A, Klevenhusen F, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q (2018) Graded replacement of maize grain with molassed sugar beet pulp modulated ruminal microbial community and fermentation profile *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 991–997. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8547>
- Nocek JE, Russell JB (1988) Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science* 71, 2070–2107. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79782-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9)
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer (2009). The NIH human microbiome project. *Genome Research* 19, 2317–2323. <https://doi.org/10.1101/gr.096651.109>

- Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ, McAllister TA (2013) Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3744–3755. <https://doi.org/10.1128/AEM.03983-12>
- Pitta DW, Indugu N, Baker L, Vecchiarelli B, Attwood G (2018) Symposium review: Understanding diet–microbe interactions to enhance productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101, 7661–7679. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13858>
- Poehlman JM (1985) Adaptation and distribution. In: Rasmusson DC (Ed), *Barley*, pp 1–17. *Agronomy Monographs*, vol 26. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr26.c1>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Kumar M, Khiaosa-ard R, Pourazad P, Wetzels SU, Klevenhusen F, Kandler W, Aschenbach JR, Zebeli Q (2016) Evidence of *in vivo* absorption of lactate and modulation of short chain fatty acid absorption from the reticulorumen of non-lactating cattle fed high concentrate diets. *PLoS One*, e0164192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164192>
- Radchuk VV, Borisjuk L, Sreenivasulu N, Merx K, Mock HP, Rolletschek H, Wobus U, Weschke W (2009) Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain. *Plant Physiology* 150, 190–204. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133520>
- Sattler SE, Funnell-Harris DL, Pedersen JF (2010) Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. *Plant Science* 178, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.01.001>
- Schmid K, Kilian B, Russell J (2018) Barley domestication, adaptation and population genomics. In: Stein N, Muehlbacher G (Eds), *The barley genome*, pp 317–336. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92528-8_17

- Shen H, Fu C, Xiao X, Ray T, Tang Y, Wang Z, Chen F (2009) Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency. *Bioenergy Research* 2, 233–245. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9058-6>
- Shinkai T, Kobayashi Y (2007) Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1646–1652. <https://doi.org/10.1128/AEM.01896-06>
- Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (2012) Principles and applications of plant mutation breeding. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (Eds), *Plant mutation breeding and biotechnology*, pp 301–326. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Soliva CR, Hess HD (2007) Measuring methane emission of ruminants by *in vitro* and *in vivo* techniques. In: Makkar HPS, Vercoe PE (Eds), *Measuring methane production from ruminants*, pp 15–31. Springer, Dordrecht.
- Steinberger J (1972) *Jahrbuch 1971*, pp 172–177. Bundesanstalt für Pflanzenbau und Samenprüfung, Wien.
- Stephens J, Halpin C (2014) Barley orange lemma is a mutant in the CAD gene. University of Dundee, Scotland. [http://www.hutton.ac.uk/webfm_send/727; besucht am 6. Februar 2021]
- Tashi N, Yawei T, Xingquan Z (2013) Food preparation from hulless barley in Tibet. In: Zhang G, Li C, Liu X (Eds), *Advance in barley sciences. Proceedings of the 11th International Barley Genetics Symposium*, pp 151–158. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4682-4_13
- Todd AL, Bowman JGP, Surber LMM, Thompson MA, Kincheloe JJ, McDonnell MF, Hensleigh PF (2003) Effect of barley varieties harvested for forage on backgrounding steer performance and diet digestibility. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science* 54, 389–392
- Ullrich SE (2011) Significance, adaptation, production, and trade of barley. In: Ullrich SE (Ed), *Barley: Production, improvement, and uses*, pp 3–13. Wiley-Blackwell, Oxford. <https://doi.org/10.1002/9780470958636.ch1>
-

- Van Gylswyk NO, Hippe H, Rainey FA (1996) *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology 46, 559–563. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-559>
- VDLUFA (2012) Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. III, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Darmstadt.
- Vogel KP, Jung H-JG (2001) Genetic modification of herbaceous plants for feed and fuel. Critical Reviews in Plant Sciences 20, 15–49. <https://doi.org/10.1080/20013591099173>
- von Bothmer R, Jacobsen N, Baden C, Bagger Jørgensen R, Linde-Laursen I (1995) An ecogeographical study of the genus *Hordeum*, 2nd ed. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Wallsten J, Bertilsson J, Nadeau E, Martinsson K (2010) Digestibility of whole-crop barley and oat silages in dairy heifers. Animal 4, 432–438. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991212>
- Weatherburn M (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry 39, 971–974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. The Plant Journal 21, 455–467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00695.x>
- Wetzels SU, Eger M, Burmester M, Kreienbrock L, Abdulmawjood A, Pinior B, Wagner M, Breves G, Mann E (2018) The application of rumen simulation technique (RUSITEC) for studying dynamics of the bacterial community and metabolome in rumen fluid and the effects of a challenge with *Clostridium perfringens*. PLoS One 13, e0192256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192256>

- Williams-Carrier RE, Lie YS, Hake S, Lemaux PG (1997) Ectopic expression of the maize *kn1* gene phenocopies the Hooded mutant of barley. *Development* 124, 3737-3745.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Priesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 42, D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, TroegelerMeynadier A, Enjalbert F (2013) Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 504–514. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12011>

9. Anhang

Klevenhusen F, Emsenhuber C, Grausgruber H, Petri R, Zebeli Q (2019) Effects of the orange lemma (rob1) mutant line of barley cv. 'Optic' compared with its wild-type on the ruminal microbiome and fermentation tested with the rumen simulation technique. *Crop & Pasture Science* 70, 789-799. <https://doi.org/10.1071/CP18288>

Effects of the orange lemma (rob1) mutant line of barley cv. 'Optic' compared with its wild-type on the ruminal microbiome and fermentation tested with the rumen simulation technique

Authors: F. Klevenhusen, C. Emsenhuber, H. Grausgruber, R. M. Petri, and Q. Zebeli

Source: Crop and Pasture Science, 70(9) : 789-799

Published By: CSIRO Publishing

URL: <https://doi.org/10.1071/CP18288>

BioOne Complete (complete.BioOne.org) is a full-text database of 200 subscribed and open-access titles in the biological, ecological, and environmental sciences published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Complete website, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/terms-o-use.

Usage of BioOne Complete content is strictly limited to personal, educational, and non - commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

BioOne sees sustainable scholarly publishing as an inherently collaborative enterprise connecting authors, nonprofit publishers, academic institutions, research libraries, and research funders in the common goal of maximizing access to critical research.

Effects of the orange lemma (*rob1*) mutant line of barley cv. ‘Optic’ compared with its wild-type on the ruminal microbiome and fermentation tested with the rumen simulation technique

F. Klevenhusen^{ID A,C}, C. Emsenhuber^B, H. Grausgruber^{ID B}, R. M. Petri^A, and Q. Zebeli^{A,C}

^AInstitute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria.

^BDepartment of Crop Sciences, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Konrad-Lorenz-Str. 24, 3430 Tulln, Austria.

^CCorresponding authors. Email: fenjaklevenhusen@aol.com; qendrim.zebeli@vetmeduni.ac.at

Abstract. The use of cereals as forage crops is limited due to the high lignin content in the cell walls reducing nutrient digestibility. Recent research has focused on reducing lignification in forage crops through gene mutations. This study investigated the ruminal fermentation characteristics of a barley mutation (orange lemma), which is associated with a lower lignin content, using the *in vitro* ruminal fermentation system (RUSITEC). Two-rowed spring barley cv. ‘Optic’ and its ethyl methane sulfonate (EMS)-induced orange lemma (*rob1*) mutant line were harvested at both stem elongation and early fruit development and incubated in the RUSITEC system. Gas production, concentrations of short-chain fatty acids (SCFA) and ammonia and the nutrient degradation of the plants after 48 h incubation were investigated. Additional samples were analysed for microbial composition using MiSeq sequencing technology. In general, acid detergent lignin (ADL) was higher at early grain filling than stem elongation. ADL was lower in the mutant line than in the wild type at both stem elongation (13.9% vs 18.5%) and early grain development (26.0% vs 28.6%; dry matter basis). This was reflected in increased ruminal degradation of neutral detergent fibre (61.7% vs 53.7%; $P < 0.001$) when harvested at stem elongation, but not at the later stage. In contrast, methane formation was lower with *rob1* than ‘Optic’ ($P = 0.002$), especially when harvested at stem elongation. No difference was seen in protein degradation between the barley genotypes. The fermentation SCFA profile did not differ between barley genotypes when harvested at stem elongation, but at early fruit development more acetate and less butyrate was produced with *rob1*. Microbial species richness was lower when barley was incubated at stem elongation compared to fruit development ($P < 0.001$), which was especially pronounced with *rob1* ($P = 0.026$). The abundance of *Bacteroidetes*, *Synergistetes* and *Tenericutes* was lower when plants harvested at early grain development were incubated compared to the stem elongation stage, whereas the abundance of *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and WPS-2 was higher ($P < 0.001$). In conclusion, most fermentation parameters were affected by vegetation stage and related changes in nutrient composition. However, additional effects of barley genotype were seen on the rumen microbial community structure, SCFA profile and methane production.

Additional keywords: 16S rRNA gene, incubation, methane, rumen microbiota, short-chain fatty acids.

Received 20 June 2018, accepted 22 July 2019, published online 27 September 2019

Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the fourth most important cereal crop in the world after wheat, maize and rice. It has the widest range of production areas in the world and is mainly used as a grain crop for animal feeding and malting (Poehlman 1985). In only a few areas of the world is barley used primarily for either human consumption (Eticha *et al.* 2009; Tashi *et al.* 2013) or as a forage crop for winter grazing or for silage and hay production (Fisher *et al.* 1972; Entz *et al.* 2002; Baron *et al.* 2006; Wallsten *et al.* 2010). However, the use of barley as a dual-purpose crop in

mixed farming systems can provide supplementary grazing during winter when pasture growth is limited by low temperatures, thereby generating income from forage and grain, and increasing the profitability and flexibility of mixed-farming systems (McCartney *et al.* 2008; Bell *et al.* 2014).

In general, the accessibility of plant cell wall polysaccharides to rumen microbial digestion is limited by the presence of phenylpropanoid polymer lignin in vascular tissues and fibres (Vogel and Jung 2001; Jung *et al.* 2012). Commonly used barley varieties are rich in lignin and awns, which limits their use as

whole-plant forage for livestock. The awns of barley, especially the barbs, can injure the eyes and mouths of animals (Harlan 1920). Multiple barley mutants are available, such as smooth-awns (*raw1*, *raw2*), hooded (*Kap1*) or awnless (*Lks1*; Lundqvist and Franckowiak 2003), which can be exploited in the development of specific forage barley varieties (Hadjichristodoulou 1979; Todd *et al.* 2003).

Lignin provides support and structure and acts as a defence barrier against external stresses. Genetic manipulation of lignin genes can lead to structural and compositional changes in lignin, and effects on the extractability or digestibility of the lignin, important factors in livestock nutrition, can be expected. Recent research has focused on exploring means of reducing the lignin content (Chapple *et al.* 2007; Chen and Dixon 2007; Shen *et al.* 2009) in order to increase the utility of cereal straw for roughage or biofuel use, and to increase the digestibility of roughage (for a review, see Jung *et al.* 2012). In line with this, brown midrib mutants have been developed in maize, sorghum and pearl millet that have been shown to have increased forage digestibility for ruminants (for a review, see Sattler *et al.* 2010). In barley, a commercially unexploited mutant is the orange lemma (*rob1*) trait (Supplementary Material fig. S1 available at the journal's website), which is associated with a lower acid detergent lignin (ADL) content (Owings *et al.* 2006). Ruminants depend on the rumen microbiota to ferment indigestible plant polymers into nutrients that can be further metabolised by the animal (Pitta *et al.* 2018), and changes in the dietary nutrient composition have been shown to significantly alter rumen microbial composition and fermentation (Klevenhusen *et al.* 2017; Belanche *et al.* 2019). Thus, we hypothesised that, because of the lower ADL in the barley mutant orange lemma line, nutrient degradation in the rumen will be increased, probably associated with changes in the ruminal microbiome, and hence the feeding value of the roughage for cattle would be improved. Because the vegetation stage is known to strongly affect the content of ADL and other nutrients (Khorasani *et al.* 1997; Wallsten *et al.* 2010), our second hypothesis was that the effects of barley genotype on ruminal degradation would be even more pronounced when plants harvested at the grain development stage are incubated, compared with the stem elongation stage, again likely associated with changes in rumen microbial populations. Thus, in order to evaluate the effects of *rob1* gene-associated changes in the plant nutrient profile on the rumen microbiome and the microbial nutrient degradability of the whole barley plant, an *in vitro* fermentation study was performed with *rob1* mutant and wild-type (WT) cv. 'Optic' using the rumen simulation technique (RUSITEC). The RUSITEC system is a ruminal fermentation technique that enables investigation of dietary effects on nutrient degradability, gas production and the rumen microbial community (Münlich *et al.* 2018; Wetzels *et al.* 2018).

Materials and methods

Plant material and preparation

Two-rowed spring barley cv. 'Optic' (WT) and EMS_R0013_33, the ethyl methane sulfonate (EMS)-induced

orange lemma (*rob1*) mutant line in 'Optic' (Caldwell *et al.* 2004; Supplementary Material fig. S1), were grown in 2016 at the BOKU Experimental Station (Groß-Enzersdorf, Austria; 48°14'10"N, 16°35'36"E). The trial was sown on 19 March 2016 at a density of 400 grains m⁻² in a plot size of 12 m². Three replications were sown for each genotype. At stem elongation (BBCH35; 73 days after sowing) and early grain development (BBCH71-73; 90 days after sowing), plants from a 1-m² area of each replicate were harvested by hand. The plants were transferred to the greenhouse for air drying. Dried plant material from the two cuttings was tested in this experiment. All samples were ground through a 2-mm sieve. The chemical composition of the forage is given in Table 1.

Design of the RUSITEC experiment

In the present RUSITEC experiment, treatments were aligned in a complete randomised design. Two experimental runs with 12 fermenters each were conducted, allowing a total of 24 independent measurements (i.e. six measurements per substrate). Each fermenter had a volume of 800 mL. Each run lasted 10 days, consisting of a 5-day period of adaptation to the diet, followed by a 5-day sampling period. Fermenters were placed in a water bath at a constant temperature of 39.5°C. A total of 350 mL day⁻¹ McDougall buffer solution (Soliva and Hess 2007) was infused continuously.

To inoculate the RUSITEC system, ruminal fluid and solid digesta were obtained ~3 h after the morning feeding through the rumen cannula of three ruminally cannulated non-lactating cows. The cows were kept according to the Austrian guidelines of animal welfare and were fed a mixture of hay and grass silage (25:75) *ad libitum*. Ruminal fluid was collected with an aspiration tube (RUMINATOR; T. Geishauser, Wittibreit, Germany) from the ventral rumen sac, rumen solid digesta was manually taken from a depth of ~10–20 cm of the fibre mat. Solid and fluid ruminal contents of the three cows were pooled and the fluid was further strained through four layers of medical gauze (pore size ~1 mm).

Before inoculation of the RUSITEC system, 100 mL of the respective experimental buffer was added to each fermenter according to methods of Soliva and Hess (2007). Then, 600 mL pooled and strained ruminal fluid was added. Two nylon bags (70 mm × 150 mm, pore size 150 µm) were placed into each fermenter, one filled with the pooled solid digesta, the second containing 12 g dry matter (DM) of the respective forage. After 24 h incubation, bags filled with solid digesta were replaced with bags containing the respective forage. Then, after every 48 h of incubation, the feed bags were replaced by new ones containing the respective forage. Incubated bags were taken out of each fermenter and rinsed with 40 mL prewarmed McDougall buffer (Soliva and Hess 2007) while squeezing the bag above the open fermenter to reduce microbial cell losses. Bags collected on the last 5 days of the experiment were rinsed under cold water until the water ran clear and stored at -20°C until proximate analyses to calculate nutrient degradation of the forages. After exchanging the feed bags, fermenters were closed tightly and flushed with gaseous nitrogen for 3 min to establish an anaerobic environment. From each fermenter, samples for measuring pH and redox potential were collected daily, immediately before the feeding procedure, and values measured using a pH meter

Table 1. Chemical composition and nutrient degradability for the wild-type (WT) 'Optic' and its orange lemma (*rob1*) mutant isoline

Within rows, values followed by different letters indicate significant differences (Tukey's test, $P = 0.05$). G, genotype; E, harvest time; DM, dry matter; NDF, neutral detergent fibre; ADF, acid detergent fibre; ADL, acid detergent lignin

	Harvest time				s.e.m.	P-value		
	Stem elongation (BBCH35)		Fruit development (BBCH73)			G	E	G × E
	WT 'Optic'	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)	WT 'Optic'	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)				
Chemical composition of whole barley plant								
Organic matter (g kg ⁻¹ DM)	897	880	945	920				
Crude protein (g kg ⁻¹ DM)	169	207	101	133				
Ether extract (g kg ⁻¹ DM)	22.5	15.7	13.2	10.6				
Starch (g kg ⁻¹ DM)	5.0	4.2	187	74.6				
NDF (g kg ⁻¹ DM)	548	506	507	554				
ADF (g kg ⁻¹ DM)	301	297	260	308				
ADL (g kg ⁻¹ DM)	18.5	13.9	28.6	26.0				
ADL (% of NDF)	3.38	2.74	5.64	4.69				
ADL (% of ADF)	6.15	4.68	11.0	8.44				
Nutrient degradability (%)								
DM	65.8a	67.8a	60.5b	56.7c	1.07	NS	≤0.001	≤0.05
Organic matter	64.7ab	66.6a	61.0b	55.4c	1.07	NS	≤0.001	≤0.05
Crude protein	75.6	74.3	51.5	57.8	3.49	NS	≤0.001	<0.1
NDF	53.7b	61.7a	42.8c	39.6c	2.07	NS	≤0.001	≤0.05
ADF	51.6	59.0	38.7	39.2	2.14	<0.1	≤0.001	NS
ADL	23.2	16.7	27.2	25.8	9.96	NS	<0.1	NS

(SevenExcellence; Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). From Day 6 to Day 10, before feeding, an additional 10 mL fluid was taken from each fermenter and aliquots (2 mL) for short-chain fatty acid (SCFA) and ammonia analysis were stored at -20°C. Subsamples (2 mL) for microbial analysis were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA extraction.

Fermentation gas was collected over 24 h in air-tight bags (TecoBag 5 L; Tesseraux Container, Bürstadt, Germany). The amount of gas produced per day was determined using the water replacement method (Soliva and Hess 2007) and CH₄ and CO₂ concentrations were analysed using an infrared detector (ATEX Biogas Monitor Check BM 2000; Ansyco, Karlsruhe, Germany).

Laboratory analyses

Analyses of feed and feed residue samples were conducted in duplicate according to the German Handbook of Agricultural Experimental and Analytical Methods (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten; VDLUFA 2012). Prior to analyses, feed residue samples were pooled for each fermenter across the last 5 days of each experimental run, oven dried at 65°C for 48 h, ground and passed through a 0.5-mm screen (Retsch, Haan, Germany). The DM of the feed and predried residue samples was determined by oven drying at 100°C for 24 h. Ash was analysed by combustion of samples at 580°C overnight. The crude protein (CP) content was determined using the Kjeldahl method. The neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents were analysed using the Fibre Therm FT 12 (Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter,

Germany). Heat-stable α -amylase used in the NDF procedure and all fibre fractions were expressed exclusive of residual ash.

The concentration and composition of SCFAs (acetate, propionate, n-butyrate, isobutyrate, n-valerate, isovalerate and caproate) were analysed by gas chromatography (GC Model 8060 MS 172 DPFC, No. 950713; Fisons, Rodano, Italy) equipped with a flame ionisation detector and a capillary column (30 m (L) × 0.53 mm (ID), d_f 0.53 μ m; Trace TR Wax; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), as described previously (Qumar *et al.* 2016).

The concentration of ammonia was determined using the indophenol reaction (Weatherburn 1967). Fermenter fluid samples were thawed at room temperature and subsequently centrifuged at 15 115g for 10 min at room temperature. The clear supernatant was diluted with distilled water to obtain a concentration within the standard calibration curve. Ammonia and phenol were oxidised by sodium hydroxide in the presence of sodium nitroprusside and dichloroisocyanuric acid. Absorbance was measured at 655 nm using a U3000 Spectrophotometer (INULA, Vienna, Austria) after 90 min reaction.

DNA extraction and 16S RNA gene sequencing

Frozen samples were thawed on ice, vortexed briefly to mix the sample and then samples from Day 5 to Day 10 were pooled per fermenter per run. From the pooled sample, a 1-mL subsample was used for DNA isolation. DNA isolation was performed using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and samples were mixed with 1 mL InhibitEX buffer provided in the kit and heated at 95°C for 5 min to ensure proper lysis of bacteria. Then, samples underwent

additional enzymatic (2.5 U μL^{-1} mutanolysin, 100 mg mL^{-1} lysozyme, 20 mg mL^{-1} proteinase K) and mechanical (0.4 g sterile ceramic beads, diameter 1.4 mm) lysis using a BeadBeater (FastPrep-24 5G; MP Biomedicals, Valiant, CA, USA) to disrupt bacterial cells, as per previously published procedures (Kong *et al.* 2010). Supernatants were transferred to fresh tubes for column-based isolation. DNA was eluted in 200 μL dH₂O. The concentration of the isolated DNA was determined using a Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies), and DNA was stored at -20°C until further analysis.

One 40- μL aliquot of each DNA sample was sent for amplicon sequencing using a MiSeq Illumina sequencing platform and paired-end technology to Microsynth AG (Balach, Switzerland). Sequencing targeted the V3–V5 hypervariable region of the 16S rRNA gene using the primer set 357F-HMP (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 926R-HMP (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') to produce an amplicon size of ~523 bp (Peterson *et al.* 2009). Briefly, according to the recommendations of the Nextera manufacturer (Illumina), libraries were constructed by ligating sequencing adapters and indices onto purified PCR products (Nextera XT Sample Preparation Kit; Illumina). Equimolar amounts of each of the libraries were pooled and sequenced on an Illumina MiSeq Personal Sequencer, and the resulting paired ends were stitched together by Microsynth, resulting in 1.7 million unfiltered reads that were, on average, 510 nucleotides (nt) in length. Sequence quality control was performed using the QIIME pipeline (Caporaso *et al.* 2010). Sequences were first quality filtered ($Q = 20$; Caporaso *et al.* 2010) and then screened and filtered for chimeras using USEARCH version 8.1 and its database (Bokulich *et al.* 2013). Clustering and alignment were performed using UCLUST (Edgar 2010) and operational taxonomic units (OTUs) were defined using PyNAST (Caporaso *et al.* 2010) and the SILVA database (version 123; <https://www.arb-silva.de>, accessed 19 July 2017; Quast *et al.* 2012; Yilmaz *et al.* 2014). The degree of similarity between sequences was defined as 97% to obtain OTUs. Any OTUs that clustered with fewer than 10 reads were manually removed. In all, 1.24 million sequences (mean 51591 sequences per sample) clustered into 5662 OTUs used for taxonomic quantification. For calculation of the non-parametric species richness estimators, Chao1 and the observed OTUs per sample were used. β -Diversity analysis was performed using weighted UniFrac dissimilarity metrics and the principal coordinates analysis (PCoA) plotting in QIIME with rarefaction at 34980 sequences. Sequencing data are available in the BioProject SRA database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>, accessed 18 June 2018) under the accession number SRP150850.

Statistical analysis

Mean values of the last 5 days of each experimental run were subjected to a linear mixed-model analysis of variance (ANOVA) using procedure MIXED of SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) with treatments (genotype, harvest time and their two-way interaction) as fixed effects. Experimental run was considered as a random effect. Multiple

comparisons among treatments were evaluated by Tukey's test. Differences were declared significant at two-sided $P \leq 0.05$, and tendencies were defined as $0.05 < P \leq 0.1$.

Results

Nutrient composition and in vitro nutrient degradability

The nutrient composition and results of nutrient degradability are given in Table 1. Differences in organic matter (OM) between wild-type 'Optic' (WT) and the mutant line *rob1* were small, but harvesting at early grain development resulted in higher OM than harvesting at stem elongation. Overall, CP content was higher in *rob1* than WT, and the later harvesting resulted in lower CP contents than in the earlier harvest. Analysis of the fibre fractions confirmed that *rob1* had a lower ADL content than WT. However, NDF and ADF were higher in *rob1* than WT when harvested at early grain development, indicating larger proportions of cellulose in *rob1*. Nutrient degradation differed between the two harvest times ($P < 0.001$ for degradability of DM, OM, CP, NDF and ADF; $P = 0.074$ for ADL degradability) and a significant interaction between time of harvest and barley genotype was found for DM, OM and NDF degradability. In addition, there was a tendency for an effect of the interaction between time of harvest and barley genotype for CP degradability. Accordingly, nutrient degradability was decreased with later harvest in both WT and *rob1*, with a stronger effect in *rob1* for DM, OM and NDF. Only ADL degradability was numerically higher in both WT and *rob1* when harvested at the early grain development stage. Tukey's honestly significant difference (HSD) test revealed that NDF degradation was highest in *rob1* harvested at stem elongation.

In vitro fermentation parameters

Despite equal buffering conditions, an effect on fermenter pH was found for both time of harvest and barley genotype, with higher pH values found when *rob1* was incubated and decreased pH values when barley harvested at early grain filling was incubated (Table 2). Time of harvest also significantly affected the redox potential in the fermenter fluid, with higher values in fermenters containing barley harvested at the early grain filling stage ($P < 0.001$). Total SCFA concentrations did not differ between barley genotypes, but were lower when harvested at the later growth stage ($P = 0.03$). Several effects of barley genotype and time of harvest on the SCFA pattern were found (Table 2). Molar proportions of acetate were higher when barley harvested at stem elongation was incubated compared with incubation of barley harvested at the later harvest time ($P < 0.001$). This effect was more pronounced in WT than *rob1* (harvest time–genotype interaction $P < 0.001$). Molar concentrations of propionate were lower in fermenters incubated with barley harvested at stem elongation ($P < 0.001$), and consequently the acetate:propionate ratio was lower for barley harvested at the early grain development stage ($P < 0.001$). The molar proportion of n-butyrate was highest when WT harvested at early grain development was incubated ($P < 0.001$). The molar proportion of isobutyrate was in general higher when *rob1* was incubated ($P < 0.001$) and lower with both genotypes when harvested at the later growth stage ($P < 0.001$). The same effect of harvest date was found for isovalerate

Table 2. Fermenter fluid traits, concentration of short-chain fatty acids (SCFA) and gas production for the wild-type (WT) 'Optic' and its orange lemma (*rob1*) mutant isolateWithin rows, values followed by different letters indicate significant differences (Tukey's test, $P = 0.05$). G, genotype; E, harvest time

	Harvest time				s.e.m.	P-value		
	Stem elongation (BBCH35)		Fruit development (BBCH73)			G	E	G × E
	WT	EMS_R0013_33	WT	EMS_R0013_33				
	‘Optic’	(Optic <i>rob1</i>)	‘Optic’	(Optic <i>rob1</i>)				
pH	6.79	6.84	6.65	6.76	0.027	≤0.05	≤0.001	NS
Redox potential (mV)	−291	−296	−208	−223	8.42	<0.1	≤0.001	NS
Total SCFA (mM)	102	103	98.6	90.1	4.20	NS	≤0.05	<0.1
Molar proportions (%)								
Acetate	56.3ab	56.7a	52.0c	55.5b	0.620	≤0.001	≤0.001	≤0.001
Propionate	27.1ab	26.2b	27.6a	27.9a	0.617	NS	≤0.001	≤0.05
n-Butyrate	10.1b	10.4b	13.5a	10.2b	0.244	≤0.001	≤0.001	≤0.001
Isobutyrate	0.828b	1.034a	0.562c	0.603c	0.017	≤0.001	≤0.001	≤0.001
n-Valerate	3.33	3.11	2.86	2.76	0.121	NS	≤0.001	NS
Isovalerate	1.65	1.95	2.12	2.28	0.076	≤0.001	≤0.001	<0.1
Caproate	0.701b	0.662b	1.30a	0.837b	0.092	≤0.001	≤0.001	≤0.001
Acetate : propionate	2.08	2.17	1.89	1.99	0.066	≤0.001	≤0.001	NS
Ammonia (mM)	11.89b	17.94a	2.66d	4.53c	0.227	≤0.001	≤0.001	≤0.001
Gas production (mL day ^{−1})								
Methane	102	72.2	108	91.4	10.2	≤0.05	<0.1	NS
Carbon dioxide	533	461	528	496	55.5	NS	NS	NS

Table 3. Species richness, diversity and evenness indices of rumen bacteria incubated with the wild-type (WT) 'Optic' or its orange lemma (*rob1*) mutant isolate

G, genotype; E, harvest time; OTU, operational taxonomic unit

	Harvest time				s.e.m.	<i>P</i> -value		
	Stem elongation (BBCH35)		Fruit development (BBCH73)			G	E	G × E
	WT	EMS_R0013_33	WT	EMS_R0013_33				
	‘Optic’	(Optic <i>robI</i>)	‘Optic’	(Optic <i>robI</i>)				
Chao I	4162	3791	4392	4323	116.7	≤0.05	≤0.001	NS
Shannon	8.45	8.08	8.70	8.55	0.064	≤0.001	≤0.001	<0.1
Simpson	0.989	0.983	0.992	0.988	0.002	≤0.05	≤0.05	NS
No. OTUs observed	2950	2636	3164	3111	132.3	<0.1	≤0.05	NS

($P < 0.001$), whereas caproate was higher when barley at the early grain development stage was incubated ($P < 0.001$).

Ammonia concentration mirrors the CP concentration of the forages and was significantly lower in the fermenter fluid when barley from the second cutting was incubated ($P < 0.001$), with generally higher concentrations for *rob1* ($P < 0.001$). Methane formation was lower when *rob1* was incubated compared with WT ($P = 0.002$), with a tendency for lower methane production at the earlier harvest stage ($P = 0.055$). No effects of barley genotype or harvest stage on CO₂ formation were found.

Effects on the ruminal microbial community structure

Diversity indices and evenness estimators were affected by both barley genotype and time of harvest (Table 3). Species richness and the number of OTUs observed were lower when barley at stem elongation was incubated ($P < 0.001$ and $P = 0.002$), which was especially pronounced with *rob1* ($P = 0.026$ and $P = 0.067$). Similarly, species diversity based on the Simpson and Shannon indices were lower at time of stem elongation ($P < 0.001$ and

$P = 0.031$) and when *rob1* was incubated ($P = 0.01$). PCoA plots revealed distinct clustering between different harvest stages, but also between the two barley types (Fig. 1).

The most abundant phylum (Table 4) was Bacteroidetes, with a mean relative abundance of 48%, followed by Firmicutes (33%), Fibrobacteres (5.6%), Spirochaetes (4%), Tenericutes (3%) and Lentisphaerae (1.6%). Of these, Bacteroidetes and Lentisphaerae differed between genotypes ($P = 0.015$ and $P < 0.001$ respectively). While the abundance of Bacteroidetes was higher when *rob1* was incubated, the opposite was true for Lentisphaerae. Most of the phyla were affected by harvest stage: the abundance of Bacteroidetes, Synergistetes and Tenericutes was lower when plants harvested at the early grain filling stage were incubated, whereas the abundance of Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fusobacteria, Lentisphaerae, Proteobacteria, Verrucomicrobia and WPS-2 was higher when plants harvested at the early grain filling stage were incubated ($P < 0.001$). For the phylum Fibrobacteres and the genus *Fibrobacter*, an interaction between barley genotype and time of harvest was found. The

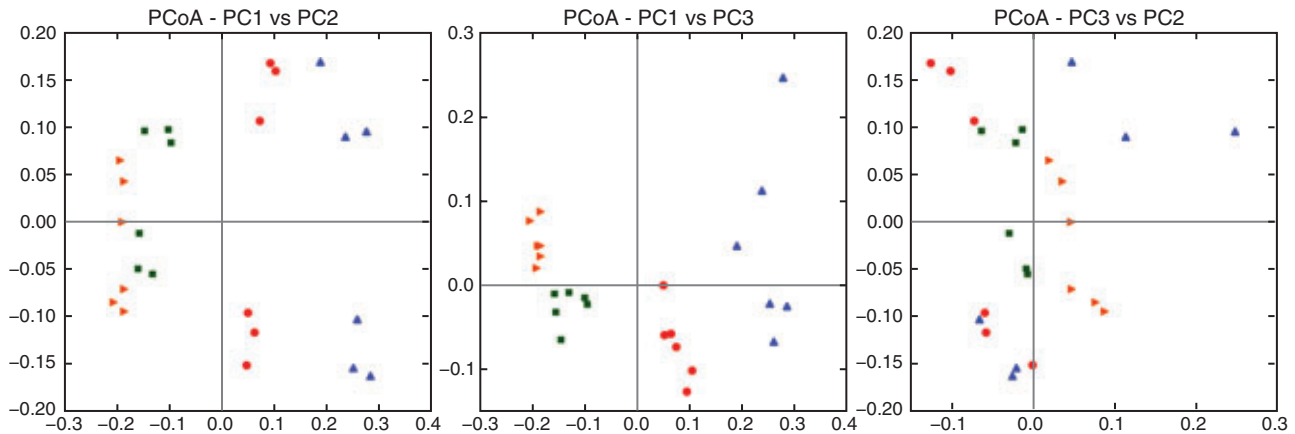


Fig. 1. Principal coordinate analyses of the β -diversity between *in vitro* rumen bacterial community incubated with the barley cultivar 'Optic' cut either at stem elongation (red) or early grain development (yellow) stages or with the mutant *rob1* isolate cut at the two same two growth stages (blue and green respectively). (a) Principal component (PC) 1 (x-axis) versus PC2 (y-axis); (b) PC1 (x-axis) versus PC3 (y-axis); (c) PC2 (x-axis) versus PC3 (y-axis). PC1: 43.3%; PC2: 16.2%; PC3: 8.5%.

Table 4. Percentage abundance of the most abundant taxa identified in the fermenter liquid and effects of incubated barley type

Within rows, values followed by different letters indicate significant differences (Tukey's test, $P = 0.05$). WT, wild-type; G, genotype; E, harvest time

Phylum and genus	Stem elongation (BBCH35)		Fruit development (BBCH73)		s.e.m.	P -value		
	WT 'Optic'	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)	WT 'Optic'	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)		G	E	G $\times$ E
Actinobacteria	0.267b	1.04a	0.381b	0.299b	0.051	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
Bacteroidetes	48.7	51.4	46.1	46.8	1.59	≤ 0.05	≤ 0.001	NS
<i>Bacteroides</i>	0.030b	0.025b	0.138a	0.042b	0.012	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
BF311	0.315	0.455	0.363	0.426	0.023	≤ 0.001	NS	NS
CF231	1.34a	0.580b	1.52a	1.35a	0.211	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.05
<i>Paludibacter</i>	$<0.001b$	0.002b	0.080a	0.016b	0.006	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
<i>Prevotella</i>	16.9	18.9	17.1	17.4	1.02	≤ 0.05	NS	NS
YRC22	0.216b	0.161b	0.392a	0.223b	0.021	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.05
Chloroflexi	0.044a	0.016c	0.027bc	0.033b	0.009	≤ 0.05	NS	≤ 0.001
Cyanobacteria	0.229	0.062	0.668	0.246	0.089	≤ 0.001	≤ 0.001	NS
Elusimicrobia	0.747c	0.304d	2.50a	1.35b	0.272	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.05
<i>Elusimicrobium</i>	0.175	0.201	0.131	0.082	0.114	NS	≤ 0.05	NS
Euryarchaeota	0.005	0.008	0.006	0.004	0.002	NS	NS	<0.1
Fibrobacteres	6.25ab	2.93c	5.56b	7.68a	0.948	NS	≤ 0.001	≤ 0.001
<i>Fibrobacter</i>	6.25ab	2.93c	5.56b	7.68a	0.948	NS	≤ 0.001	≤ 0.001
Firmicutes	33.2	32.1	32.9	33.1	1.66	NS	NS	NS
<i>Anaerofustis</i>	0.011	0.016	0.012	0.019	0.004	<0.1	NS	NS
<i>Anaerostipes</i>	0.088bc	0.014c	0.409a	0.161b	0.035	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.05
<i>Anaerovibrio</i>	0.145	0.182	0.379	0.401	0.057	NS	≤ 0.001	NS
<i>Anaerovorax</i>	0.055	0.070	0.051	0.064	0.010	NS	NS	NS
<i>Asteroleplasma</i>	0.101ab	0.160a	0.130ab	0.080b	0.016	NS	NS	≤ 0.05
<i>Bulleidia</i>	0.024	0.016	0.041	0.027	0.003	≤ 0.05	≤ 0.001	NS
<i>Butyrivibrio</i>	1.54b	2.34a	0.726c	0.673c	0.101	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
<i>Catenibacterium</i>	0.120	0.166	0.256	0.270	0.086	NS	≤ 0.05	NS
<i>Clostridium</i>	0.771	0.598	0.719	0.725	0.050	NS	NS	<0.1
<i>Coprococcus</i>	0.667	0.861	0.335	0.410	0.073	≤ 0.05	≤ 0.001	NS
<i>Dehalobacterium</i>	0.016	0.003	0.024	0.022	0.004	≤ 0.05	≤ 0.001	<0.1
<i>Fusibacter</i>	0.024	0.040	0.014	0.031	0.008	<0.1	NS	NS
L7A-E11	0.054	0.032	0.062	0.064	0.012	NS	≤ 0.05	NS
<i>Lachnospira</i>	0.040b	0.221a	$<0.001b$	0.005b	0.018	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
<i>Lactobacillus</i>	0.207b	0.118b	0.369a	0.470a	0.041	NS	≤ 0.001	≤ 0.05
<i>Megasphaera</i>	0.026	0.014	0.033	0.029	0.015	NS	NS	NS
<i>Mogibacterium</i>	0.026	0.019	0.018	0.021	0.003	NS	NS	NS
<i>Moryella</i>	0.014a	0.004b	0.010ab	0.013ab	0.002	NS	NS	≤ 0.05

(continued next page)

Table 4. (continued)

Phylum and genus	Stem elongation (BBCH35)		Fruit development (BBCH73)		s.e.m.	G	P-value E	G × E
	WT 'Optic'	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)	WT 'Optic'	EMS_R0013_33 (Optic <i>rob1</i>)				
<i>Oscillospira</i>	0.144	0.153	0.081	0.081	0.009	NS	≤0.001	NS
p-75-a5	0.106	0.075	0.127	0.115	0.019	≤0.05	≤0.001	NS
PSB-M-3	0.079a	0.050b	0.044b	0.062ab	0.008	NS	<0.1	≤0.001
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.828	1.35	0.289	0.478	0.164	≤0.001	≤0.001	<0.1
RFN20	0.419	0.318	0.534	0.526	0.040	<0.1	≤0.001	NS
<i>Roseburia</i>	0.013b	0.018b	0.340a	0.082b	0.052	≤0.05	≤0.001	≤0.05
<i>Ruminococcus</i>	0.861	0.894	0.638	0.500	0.045	NS	≤0.001	<0.1
<i>Selenomonas</i>	0.335	0.297	0.285	0.259	0.017	<0.1	≤0.05	NS
<i>Sharpea</i>	0.017	0.009	0.049	0.021	0.020	NS	<0.1	NS
<i>Shuttleworthia</i>	0.271	0.259	0.371	0.169	0.108	<0.1	NS	NS
<i>Streptococcus</i>	0.177a	0.182a	0.085b	0.172a	0.026	≤0.05	≤0.05	≤0.05
<i>Succiniclasicum</i>	2.07	1.88	2.83	2.30	0.141	≤0.05	≤0.001	NS
Fusobacteria	0.006b	0.006b	0.050a	0.011b	0.004	≤0.001	≤0.001	≤0.001
<i>Fusobacterium</i>	0.006b	0.006b	0.050a	0.011b	0.004	≤0.001	≤0.001	≤0.001
Lentisphaerae	1.57	1.07	1.93	1.65	0.222	≤0.001	≤0.001	<0.1
Proteobacteria	0.704c	1.04c	2.22a	1.50b	0.110	<0.1	≤0.001	≤0.001
<i>Desulfovibrio</i>	0.010	0.018	0.007	0.009	0.002	≤0.05	≤0.05	NS
<i>Ruminobacter</i>	0.002c	0.002c	0.172a	0.086b	0.023	≤0.05	≤0.001	≤0.05
<i>Succinivibrio</i>	0.239	0.501	0.346	0.465	0.053	≤0.05	NS	NS
Spirochaetes	3.61	4.54	4.36	3.58	0.377	NS	NS	≤0.05
<i>Sphaerochaeta</i>	1.52	1.78	1.40	1.36	0.103	NS	≤0.05	NS
<i>Treponema</i>	1.66	2.43	2.46	1.73	0.422	NS	NS	≤0.05
Synergistetes	0.555	0.704	0.420	0.457	0.052	≤0.05	≤0.001	<0.1
<i>Pyramidobacter</i>	0.527	0.674	0.370	0.419	0.057	≤0.05	≤0.001	NS
TG5	0.020	0.019	0.040	0.028	0.006	≤0.05	≤0.001	<0.1
Tenericutes	3.44	4.33	1.93	2.33	0.616	NS	≤0.001	NS
<i>Anaeroplasma</i>	1.26	1.25	0.561	0.759	0.086	NS	≤0.001	<0.1
TM7	0.321	0.338	0.446	0.393	0.044	NS	<0.1	NS
Verrucomicrobia	0.255	0.167	0.410	0.327	0.022	≤0.001	≤0.001	NS
WPS-2	0.050	0.021	0.148	0.097	0.008	≤0.001	≤0.001	NS

abundance of both was lowest when *rob1* harvested at stem elongation was incubated, but the abundance of *Fibrobacter* increased markedly when *rob1* harvested at the early grain development stage was incubated (harvest time–genotype interaction $P < 0.001$). The opposite was found for the genus *Treponema*, whose relative abundance increased with the late harvest stage only when WT was incubated (harvest time–genotype interaction $P = 0.002$).

By far the most abundant bacterial genus was *Prevotella* (mean 17.5%; Table 4), the abundance of which was higher when *rob1* was incubated ($P = 0.033$), with no effect of harvest stage. The abundance of the genus *Succiniclasicum* was generally lower when *rob1* was incubated ($P = 0.018$) and higher when plants at the early grain development were incubated ($P < 0.001$). *Butyrivibrio* was affected both by genotype and harvest stage (both $P < 0.001$), because its abundance was higher in fermenter fluid samples when *rob1* at the stem elongation stage was incubated and decreased markedly regardless of genotype when plants harvested at the second cutting were incubated. The genus *Sphaerochaeta* was not affected by barley genotype, but its relative abundance was lower when barley plants from the second cutting were incubated ($P = 0.013$). The relative abundance of *Anaeroplasma* did not differ between barley genotypes, but it decreased markedly when plants harvested at

early grain development were incubated ($P < 0.001$). The abundance of the genus *Pseudobutyrvibrio* was higher when *rob1* was incubated ($P < 0.001$) and when plants were harvested at stem elongation ($P < 0.001$).

Several intergenera correlations were found indicating possible dependencies on nutrient supply via cross-feeding (Fig. 2). Additional correlations were found between genera and fermentation parameters like pH, NH_3 and SCFA concentration, as well as nutrient contents in the diet and their degradability.

Discussion

The barley 'orange lemma' trait is a mutation in the cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) gene, which catalyses the final step in lignin biosynthesis. Accordingly, the mutant *rob1* had lower ADL content than WT 'Optic', both at stem elongation (1.39% vs 1.85% in DM) and at early grain development (2.60% vs 2.86% in DM). Similar findings were reported by Owings *et al.* (2006) for the genetic background of 'Bowman' barley. In general, the cell wall concentration of forages is influenced by maturity-related plant morphological differences in the leaf to stem ratio (Khorasani *et al.* 1997; Vogel and Jung 2001), and in cereal forages the maturity stage of the grains also affects nutrient

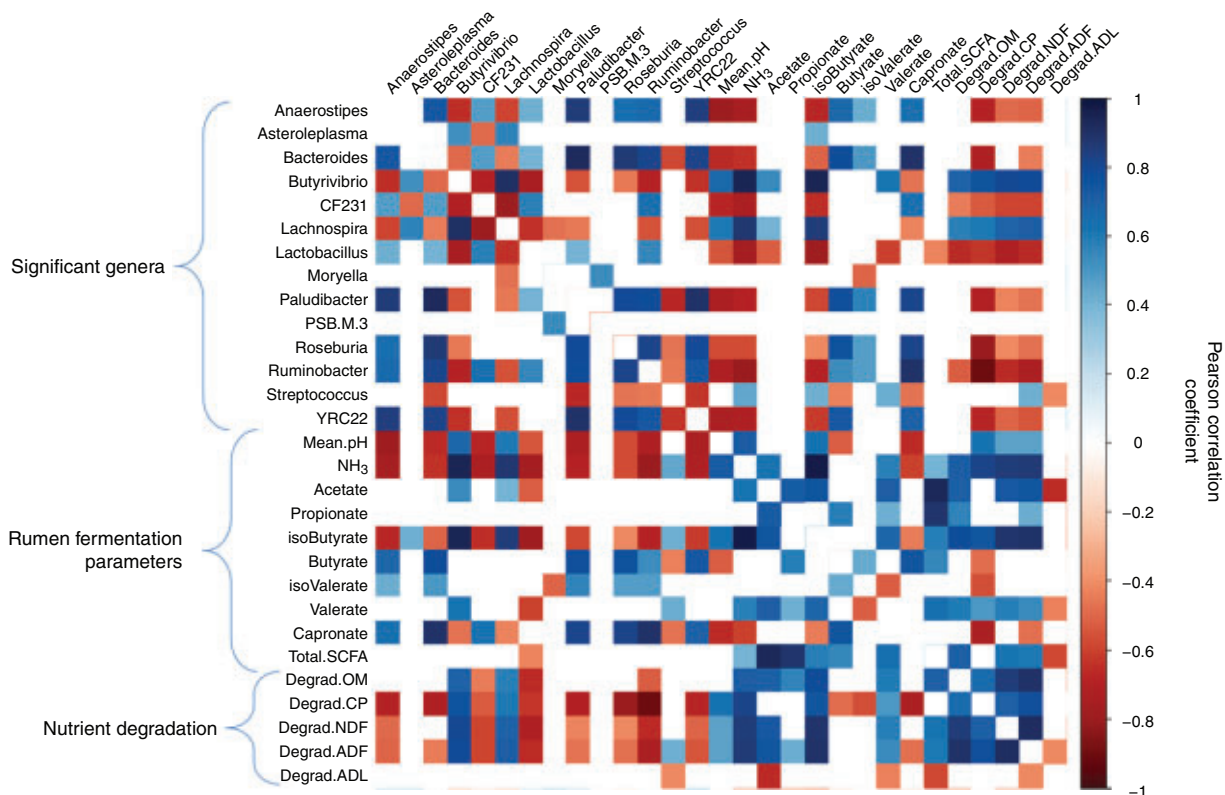


Fig. 2. Correlation matrix between relative percentage abundance of significant genera, rumen fermentation parameters and nutrient degradation. Only significant correlations ($P < 0.05$) are shown in colour. ADF, acid detergent fibre; ADL, acid detergent lignin; CP, crude protein; Degrad., degraded; NDF, neutral detergent fibre; OM, organic matter; SCFA, short-chain fatty acids.

composition (Khorasani *et al.* 1997; Wallsten *et al.* 2010). Grain maturation has a considerable effect on the starch and protein content of a forage, with increased starch content in plants harvested at the milk dough stage and an inverse response in protein content as the plant matures (Khorasani *et al.* 1997). In agreement with Mannerkorpi and Taube (1995), in the present study the degree of CP and OM digestibility decreased considerably until grain filling. Accordingly, less ammonia was released at the later vegetation stage due to a lower CP content in the forage (Nocek and Russell 1988). Unexpectedly, OM degradability was lower for *rob1* than WT when harvested at early grain filling, despite the lower ADL content. Most probably the higher starch content of WT accounted for the higher OM degradability, because the starch content was twice as high in WT compared with *rob1* at the second harvest. It seems that the lower ADL content of *rob1* could not compensate for the lower starch content at early grain development in terms of OM degradability, and thus nutrient availability. Weschke *et al.* (2000) and Radchuk *et al.* (2009) have shown that starch biosynthesis in barley grain increases exponentially between Days 8 and 16 after flowering. Therefore, grain development and starch accumulation of *rob1*, which was evaluated to be 1–2 days later in crop development from heading onwards, was not that advanced compared with WT at the time of the second cutting. As mentioned by Collar *et al.* (2004), the negative effects of more fibrous stems and leaves with progressing maturity are often more than compensated for by the development of the non-fibrous, high energy grain portion,

which was almost true with WT but not with *rob1*. In the rumen, starch is quickly fermented to propionate (Bergman 1990), explaining the increased propionate proportion and decreased acetate : propionate ratio at early grain development due to the increase in available starch.

One interesting finding of this study was the significantly lower CH₄ formation when *rob1* was incubated, especially when harvested at stem elongation (~30%). This result is in contrast with the higher NDF degradability of *rob1* at stem elongation, because fibre fermentation is known to contribute to CH₄ production, whereas increasing the starch content in the diet can decrease CH₄ formation (Hatew *et al.* 2015). However, SCFA concentrations and profiles were similar among incubation treatments, providing no explanation for the observed methane formation. In addition, the abundance of DNA sequences related to the Kingdom Archaea Phylum Euryarchaeota was only minor, likely associated with the chosen sequencing approach, with no differences between genotypes and harvest stages. Thus, other reasons have to be explored as to why methane production was lower with *rob1*.

Changes in nutrients certainly affect ruminal microbes, resulting in shifts of microbial populations in all ruminal niches (de Menezes *et al.* 2011; Petri *et al.* 2013; Klevenhusen *et al.* 2017), which was also true in the present study. In the samples, a clear clustering of OTUs was seen between the different maturity stages, likely reflecting the differences in available nutrients (protein vs starch). The

increased starch supported microbial diversity and species richness, which contradicts the observations reported by others (Zened *et al.* 2013). However, the starch content even in WT at early grain filling can be considered low compared with other studies testing dietary effects on the rumen microbiome in dairy cows, and other nutrients, such as proteins, also have an effect. In the present study, only ruminal microbes in the liquid fraction were investigated, and additional effects on fibre-adherent bacteria would be expected (Klevenhusen *et al.* 2017) due to the differences in cell wall composition of *rob1*. Despite the extraction of only liquid-associated microbes, strong effects were found on the fibrolytic genus *Fibrobacter*. As shown by Shinkai and Kobayashi (2007), *Fibrobacter succinogenes* is more metabolically active on less-digestible fibre, as found in the stems of hay, whereas *Ruminococcus flavefaciens* prefers easily digestible fibre and is rarely found on stems. These observations can explain the present results of the correlation analyses and the lower relative abundance of *Fibrobacter* in the medium incubated with the less-lignified *rob1* at stem elongation, whereas *Ruminococcus* was increased. Recent studies using metatranscriptomics confirmed that the main bacteria involved in cell wall carbohydrate digestion belong to the genera *Ruminococcus*, *Fibrobacter* and *Prevotella* (Dai *et al.* 2015; Comtet-Marre *et al.* 2017), and indeed positive correlations were found between cell wall fractions and the relative abundance of the genera *Fibrobacter* and *Ruminococcus*. *Fibrobacter* correlated with NDF and ADL content in the forages as well as with ADL degradability, whereas *Ruminococcus* was correlated with NDF content and NDF and ADF degradability. No correlation with cell wall carbohydrates and their digestibility was found for *Prevotella*; in contrast, *Prevotella* was negatively correlated with ADL degradability. However, *Prevotella* was highly abundant in all samples, supporting other studies that demonstrated its ability to use a diverse substrate range (Avguštin *et al.* 1997; Petri *et al.* 2013), and fibre-attached bacteria were not investigated in the present study.

In addition to *Prevotella*, genera with a higher abundance that were affected by the genotype of the barley incubated were *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio* and *Succiniclasticum*. The abundance of the genus *Butyrivibrio* was generally lower when barley harvested at early grain development was incubated, whereas abundance was highest with *rob1* harvested at stem elongation. The present results could be related to the CP content of the forage, because some strains of *Butyrivibrio*, belonging to the core microbiome (Henderson *et al.* 2015), are known to play an important role in protein degradation (Cotta and Hespel 1986). In this respect, strong correlations were found between *Butyrivibrio* and the CP content of the diet, CP degradability and the concentration of isobutyrate, a fermentation product originating from oxidative deamination and decarboxylation of branched-chain amino acids (Andries *et al.* 1987). Like *Butyrivibrio*, the abundance of *Pseudobutyrvibrio* was higher when barley harvested at stem elongation was incubated, and this was greater with *rob1*. Certain strains of *Pseudobutyrvibrio* are known to grow on fructan, inulin, sucrose, fructose and glucose as a sole carbon source (Van Gylswyk *et al.* 1996; Kasperowicz *et al.* 2009), and thus the results presented herein

could be related to the higher content of water-soluble carbohydrates at the early harvest stage in *rob1*. In contrast, the relative abundance of *Succiniclasticum* was generally higher when WT was incubated. *Succiniclasticum* is specialised in fermenting succinate and converting it to propionate, and it was shown to be abundantly attached to low-quality wheat and rice straw (Cheng *et al.* 2017; Jin *et al.* 2018), thus likely playing an important role in the degradation of plant fibre. However, in the present study there was no correlation between *Succiniclasticum* and the propionate concentration in the incubation medium.

In conclusion, the orange lemma (*rob1*) mutant had lower ADL content than WT 'Optic', whereas the CP content was higher in the mutant. *In vitro* ruminal degradability of the cell wall fraction NDF was improved with *rob1* when plants were harvested at stem elongation, whereas no difference was found between the genotypes at early fruit development. Changes in the fermenter liquid bacterial community were observed, with several changes being correlated with nutrient supply, which significantly depends on harvest stage. An unexpected finding of this study was the significantly lower amount of starch in *rob1* compared with WT when harvested at early grain development stage, which can be explained by a slightly delayed grain filling of the mutant line at the time of cutting. Accordingly, despite the similar fibre degradation, degradability of *rob1* total OM was significantly lower than that of WT.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The skilful assistance of Anita Dockner, Melanie Wild, Sandra Eisen, Sabine Leiner and Suchitra Sharma (Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, Vetmeduni, Vienna, Austria) with nutrient and SCFA analyses is very much appreciated. The technical assistance of Arife Sener in DNA extraction and quantification is also recognised. Original seeds of the 'Optic' and its *rob1* mutant line were kindly provided by B. Forster (Plant Breeding and Genetics Laboratory Seibersdorf, Joint FAO/IAEA Program of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the International Atomic Energy Agency (IAEA), Seibersdorf, Austria). This research was conducted under the Technical Project Barley Mutants for Fodder Production (No. 17618) within the framework of the CRP Integrated Utilisation of Cereal Mutant Varieties in Crop/Livestock Production System (D23030) managed by the Plant Breeding and Genetics Section of the FAO/IAEA Joint Division.

References

- Andries JJ, Buysse FX, De Brabander DL, Cottyn BG (1987) Isoacids in ruminant nutrition: their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances – a review. *Animal Feed Science and Technology* **18**, 169–180. doi:10.1016/0377-8401(87)90069-1
- Avguštin G, Wallace RJ, Flint HJ (1997) Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella byantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **47**, 284–288.
- Baron VS, Dick AC, McCartney D, Basarab JA, Okine EK (2006) Carrying capacity, utilization, and weathering of swathed whole plant barley. *Agronomy Journal* **98**, 714–721. doi:10.2134/agronj2005.0171

- Belanche A, Kingston-Smith AH, Griffith GW, Newbold CJ (2019) A multi-kingdom study reveals the plasticity of the rumen microbiota in response to a shift from non-grazing to grazing diets in sheep. *Frontiers in Microbiology* **10**, 122. doi:10.3389/fmicb.2019.00122
- Bell LW, Moore AD, Kirkegaard JA (2014) Evolution in crop–livestock integration systems that improve farm productivity and environmental performance in Australia. *European Journal of Agronomy* **57**, 10–20. doi:10.1016/j.eja.2013.04.007
- Bergman EN (1990) Energy contribution of VFA from the gastrointestinal tract in various species. *APS Physiological Reviews* **70**, 567–590. doi:10.1152/physrev.1990.70.2.567
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* **10**, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
- Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R (2004) A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). *The Plant Journal* **40**, 143–150. doi:10.1111/j.1365-3113X.2004.02190.x
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Chapple C, Ladisch M, Meilan R (2007) Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nature Biotechnology* **25**, 746–748. doi:10.1038/nbt0707-746
- Chen F, Dixon RA (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* **25**, 759–761. doi:10.1038/nbt1316
- Cheng Y, Wang Y, Li Y, Zhang Y, Liu T, Wang Y, Sharpton TJ, Zhu W (2017) Progressive colonization of bacteria and degradation of rice straw in the rumen by Illumina sequencing. *Frontiers in Microbiology* **8**, 2165. doi:10.3389/fmicb.2017.02165
- Collar C, Wright S, Robinson P, Putnam D (2004) Effect of harvest timing on yield and quality of small grain forage. In 'Proceedings of the 34th California Alfalfa and 2004 National Alfalfa Symposium'. 13–15 December 2004, San Diego, CA, USA. pp. 141–148. (University of California: Davis, CA, USA)
- Comtet-Marre S, Parisot N, Laperce P, Chaucheyras-Durand F, Mosoni P, Peyretailade E, Bayat AR, Shingfield KJ, Peyret P, Forano E (2017) Metatranscriptomics reveals the active bacterial and eukaryotic fibrolytic communities in the rumen of dairy cow fed a mixed diet. *Frontiers in Microbiology* **8**, 67. doi:10.3389/fmicb.2017.00067
- Cotta MA, Hespel RB (1986) Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrilvolvens*. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 51–58.
- Dai X, Tian Y, Li J, Su X, Wang X, Zhao S, Liu L, Luo Y, Liu D, Zheng H, Wang J, Dong Z, Hu S, Huang L (2015) Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in the cow rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 1375–1386. doi:10.1128/AEM.03682-14
- de Menezes AB, Lewis E, O'Donovan M, O'Neill BF, Clipson N, Doyle EM (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology* **78**, 256–265. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Entz MH, Baron VS, Carr PM, Meyer DW, Smith SR, McCaughey WP (2002) Potential of forages to diversify cropping systems in the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* **94**, 240–250. doi:10.2134/agronj2002.0240
- Eticha F, Berghofer E, Grausgruber H (2009) Utilization of barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces in the highlands of West Shewa, Ethiopia. *Plant Genetic Resources* **7**, 154–162. doi:10.1017/S1479262108123474
- Fisher LJ, Lessard JR, Lodge GA (1972) Whole crop barley as conserved forage for lactating cows. *Canadian Journal of Animal Science* **52**, 497–504. doi:10.4141/cjas72-059
- Hadjichristodoulou A (1979) Sanokrithi 74 – a hooded barley for hay. Technical Bulletin 28, Agricultural Research Institute, Nicosia, Cyprus.
- Harlan HV (1920) Smooth-awned barleys. *Journal - American Society of Agronomy* **12**, 205–208. doi:10.2134/agronj1920.00021962001206-70004x
- Hatew B, Cone JW, Pellikaan WF, Podesta SC, Bannink A, Hendriks WH, Dijkstra J (2015) Relationship between *in vitro* and *in vivo* methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology* **202**, 20–31. doi:10.1016/j.anifeeds.2015.01.012
- Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH (2015) Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports* **5**, 14567. doi:10.1038/srep14567
- Jin W, Wang Y, Li Y, Cheng Y, Zhu W (2018) Temporal changes of the bacterial community colonizing wheat straw in the cow rumen. *Anaerobe* **50**, 1–8. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.01.004
- Jung H-JG, Samac DA, Sarath G (2012) Review: modifying crops to increase cell wall digestibility. *Plant Science* **185–186**, 65–77. doi:10.1016/j.plantsci.2011.10.014
- Kasperowicz A, Stan-Glasek K, Guczyńska W, Píknova M, Pristas P, Nigutova K, Javorsky P, Michalowski T (2009) Sucrose phosphorylase of the rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain A. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 812–820. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04257.x
- Khorasani GR, Jedel PE, Helm JH, Kennelly JJ (1997) Influence of stage of maturity on yield components and chemical composition of cereal grain silages. *Canadian Journal of Animal Science* **77**, 259–267. doi:10.4141/A96-034
- Klevenhusen F, Petri RM, Kleefisch M-T, Khiaosa-ard R, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q (2017) Changes in fibre-adherent and fluid-associated microbial communities and fermentation profiles in the rumen of cattle fed diets differing in hay quality and concentrate amount. *FEMS Microbiology Ecology* **93**, doi:10.1093/femsec/fix100
- Kong Y, Teather R, Forster R (2010) Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiology Ecology* **74**, 612–622. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00977.x
- Lundqvist U, Franckowiak JD (2003) Diversity of barley mutants. In 'Diversity in barley (*Hordeum vulgare*)'. (Eds R von Bothmer, T van Hintum, H Knüpfner, K Sato) pp. 77–96. (Elsevier: Amsterdam)
- Mannerkorpi P, Taube F (1995) Feeding value of barley plants as related to stage of maturity I. Morphological and chemical composition and *in vitro* digestibility. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science* **45**, 147–152. doi:10.1080/09064709509415845
- McCartney D, Fraser J, Ohama A (2008) Annual cool season crops for grazing by beef cattle. A Canadian review. *Canadian Journal of Animal Science* **88**, 517–533. doi:10.4141/CJAS08052
- Münnich M, Khol-Parisini A, Klevenhusen F, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q (2018) Graded replacement of maize grain with molassed sugar beet pulp modulated ruminal microbial community and fermentation profile *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**, 991–997. doi:10.1002/jsfa.8547
- Nocek JE, Russell JB (1988) Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to

- microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science* **71**, 2070–2107. doi:[10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79782-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9)
- Owings D, Franckowiak J, Nudell R (2006) Forage quality of barley hay. In 'ASA-CSSA-SSSA 2006 International Meetings'. 12–16 November 2006, Indianapolis, IN, USA. Abstract 266-15. (American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America: Madison, WI, USA)
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M (2009) The NIH human microbiome project. *Genome Research* **19**, 2317–2323. doi:[10.1101/gr.096651.109](https://doi.org/10.1101/gr.096651.109)
- Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ, McAllister TA (2013) Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 3744–3755. doi:[10.1128/AEM.03983-12](https://doi.org/10.1128/AEM.03983-12)
- Pitta DW, Indugu N, Baker L, Vecchiarelli B, Attwood G (2018) Symposium review: understanding diet–microbe interactions to enhance productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **101**, 7661–7679. doi:[10.3168/jds.2017-13858](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13858)
- Poehlman JM (1985) Adaptation and distribution. In 'Barley'. (Ed. DC Rasmussen) pp. 1–17. (American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America: Madison, WI, USA)
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**, D590–D596. doi:[10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)
- Qumar M, Khiaosa-ard R, Pourazad P, Wetzels SU, Klevenhusen F, Kandler W, Aschenbach JR, Zebeli Q (2016) Evidence of *in vivo* absorption of lactate and modulation of short chain fatty acid absorption from the reticulorumen of non-lactating cattle fed high concentrate diets. *PLoS One* **11**, e0164192. doi:[10.1371/journal.pone.0164192](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164192)
- Radchuk VV, Borisjuk L, Sreenivasulu N, Merx K, Mock HP, Rolletschek H, Wobus U, Weschke W (2009) Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain. *Plant Physiology* **150**, 190–204. doi:[10.1104/pp.108.133520](https://doi.org/10.1104/pp.108.133520)
- Sattler SE, Funnell-Harris DL, Pedersen JF (2010) Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. *Plant Science* **178**, 229–238. doi:[10.1016/j.plantsci.2010.01.001](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.01.001)
- Shen H, Fu C, Xiao X, Ray T, Tang Y, Wang Z, Chen F (2009) Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency. *BioEnergy Research* **2**, 233–245. doi:[10.1007/s12155-009-9058-6](https://doi.org/10.1007/s12155-009-9058-6)
- Shinkai T, Kobayashi Y (2007) Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1646–1652. doi:[10.1128/AEM.01896-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01896-06)
- Soliva CR, Hess HD (2007) Measuring methane emission of ruminants by *in vitro* and *in vivo* techniques. In 'Measuring methane production from ruminants'. (Eds HPS Makkar, PE Vercoe) pp. 15–31. (Springer: Dordrecht, The Netherlands)
- Tashi N, Yawei T, Xingquan Z (2013) Food preparation from hulless barley in Tibet. In 'Advance in barley sciences. Proceedings of the 11th International Barley Genetics Symposium'. (Eds G Zhang, C Li, X Liu) pp. 151–158. (Springer: Dordrecht, The Netherlands) doi:[10.1007/978-94-007-4682-4_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4682-4_13)
- Todd AL, Bowman JGP, Surber LMM, Thompson MA, Kincheloe JJ, McDonnell MF, Hensleigh PF (2003) Effect of barley varieties harvested for forage on backgrounding steer performance and diet digestibility. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science* **54**, 389–392.
- Van Gylswyk NO, Hippe H, Rainey FA (1996) *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **46**, 559–563.
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten) (2012) 'Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.' (VDLUFA: Darmstadt)
- Vogel KP, Jung H-JG (2001) Genetic modification of herbaceous plants for feed and fuel. *Critical Reviews in Plant Sciences* **20**, 15–49. doi:[10.1080/20013591099173](https://doi.org/10.1080/20013591099173)
- Wallsten J, Bertilsson J, Nadeau E, Martinsson K (2010) Digestibility of whole-crop barley and oat silages in dairy heifers. *Animal* **4**, 432–438. doi:[10.1017/S1751731109991212](https://doi.org/10.1017/S1751731109991212)
- Weatherburn M (1967) Phenol–hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39**, 971–974. doi:[10.1021/ac60252a045](https://doi.org/10.1021/ac60252a045)
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal* **21**, 455–467. doi:[10.1046/j.1365-3113x.2000.00695.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00695.x)
- Wetzels SU, Eger M, Burmester M, Kreienbrock L, Abdulmawjood A, Pinior B, Wagner M, Breves G, Mann E (2018) The application of rumen simulation technique (RUSITEC) for studying dynamics of the bacterial community and metabolome in rumen fluid and the effects of a challenge with *Clostridium perfringens*. *PLoS One* **13**, e0192256. doi:[10.1371/journal.pone.0192256](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192256)
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and 'all-species living tree project (LTP)' taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* **42**, D643–D648. doi:[10.1093/nar/gkt1209](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209)
- Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, Troegeler-Meynadier A, Enjalbert F (2013) Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiology Ecology* **83**, 504–514. doi:[10.1111/1574-6941.12011](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12011)

10.1071/CP18288_AC

© CSIRO 2019

Supplementary Material: *Crop & Pasture Science*, 2019, **70**, 789-799.

Effects of the orange lemma (*rob1*) mutant line of barley cv. ‘Optic’ compared with its wild-type on the ruminal microbiome and fermentation tested with the rumen simulation technique

F. Klevenhusen^{A,C}, C. Emsenhuber^B, H. Grausgruber^B, R. M. Petri^A and Q. Zebeli^{A,C}

^AInstitute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, 1210 Vienna, Austria.

^BDepartment of Crop Sciences, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, 3430 Tulln, Austria.

^CCorresponding authors. Email: fenjaklevenhusen@aol.com; qendrim.zebeli@vetmeduni.ac.at



Figure S1. Orange discoloration of the rachis, basal lemma and culm as result of the orange lemma (*rob1*) mutation compared to its wild-type (always right to the mutation). The mutation is monofactorial recessive, located on the short arm of chromosome 6H, and alters the sequence of the gene encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD). The mutation was observed spontaneously and/or induced by both chemical and irradiation treatment in various genetic backgrounds.

References

- Franckowiak JD, Lundqvist U (2016) BGS 254, Orange lemma 1, *rob1*. *Barley Genetics Newsletter* **46**, 78-80.
- Shahla A, Shim JW, Tsuchiya T (1983) Association of the gene *o* for orange lemma with the short arm of chromosome 6 (6S) in barley. *Barley Genetics Newsletter* **13**, 83-84.
- Wolfe RI, Franckowiak JD (1991) Multiple dominant and recessive genetic marker stocks in spring barley. *Barley Genetics Newsletter* **20**, 117-121.