

Entwicklung und Evaluierung einer Introgressionsbibliothek bei Roggen

T. MIEDANER, Z. SUŠIĆ, A. SEGGL, B. HACKAUF, V. KORZUN, J. SCHONDELMAIER, P. WILDE, H. WORTMANN, J. ROUPPE VAN DER VOORT, P. WEHLING und H.H. GEIGER

Einleitung

Jede züchterische Maßnahme mit dem Ziel der Sortenentwicklung führt zwangsläufig zu einer Einschränkung der genetischen Diversität, die einen wichtigen Faktor des Selektionserfolges darstellt (FALCONER and MACKAY 1996). Sie kann durch die gezielte Einkreuzung Genetischer Ressourcen wieder erweitert werden. Da seit Beginn einer Hybridzüchtung bei Roggen vor 35 Jahren das Ertragspotential der selbstfertilen Populationen und der daraus entstandenen Hybridsorten sich kontinuierlich erhöhte, steigt deren Leistungsabstand zu den Genetischen Ressourcen zunehmend. Letztere zeigen zudem eine mangelnde Adaptation an unsere Klima- und/oder Produktionsbedingungen und verursachen zusätzliche züchterische Probleme (MIEDANER und GEIGER 1998, MIEDANER et al. 2002). Trotzdem können Genetische Ressourcen einen Beitrag zur zukünftigen Steigerung der Kombinationsfähigkeit für Ertrag liefern (ROUX et al. 2001). Eine Lösung der mit einer solchen Introgression verbundenen Schwierigkeiten verspricht der von ZAMIR (2001) vorgeschlagene Ansatz, der erstmals von ESHED und ZAMIR (1994) bei Tomaten verwirklicht wurde. Es werden dazu Introgressionslinien (IL) aus Rückkreuzungspopulationen erstellt, die jeweils nur kleine, aber verschiedene Donorchromosomen (DC)-Segmente tragen. Die so entstandene Bibliothek an Introgressionslinien soll möglichst das gesamte Donorgenom repräsentieren. Dadurch wird es erstmals in der Roggenzüchtung möglich, die Wirkung kleiner DNA-Segmente eines nicht-adaptierten Donors im Hinblick auf komplex vererbte Merkmale zu

erforschen und diese gezielt durch Kreuzung in Elitematerial zu übertragen. Die Anwendung von DNA-Markern ist für die Erstellung einer Introgressionsbibliothek unabdingbar.

Entwicklung der Introgressionsbibliothek

Donor war eine iranische Roggenform, die in ihrer Heimat wild an Wegrändern und als Unkraut in Weizenbeständen wächst („Primitivroggen“). Drei einzelne Gameten dieser Population (Altevogt 141160) wurden mit einer Elite-Inzuchtlinie (L2053-N) als Mutter gekreuzt, bis zur BC₂-Generation rückgekreuzt und dreimal geselbstet. Die Nachkommen des ersten Gameten ergaben die Introgressionsbibliothek F, die der zwei anderen Gameten zusammengefasst die Introgressionsbibliothek G. Alle spalten den Generationen wurden mit AFLP-Markern (Keygene n.v., NL) und SSR-Markern (BAZ Groß Lüsewitz, SU-RL, LP) analysiert und brauchbare Nachkommen selektiert. Ausgangsbasis der Selektion waren zwei dichte Markerkarten, die während des Projektes in Zusammenarbeit mit der BAZ, Groß-Lüsewitz, erstellt wurden (HACKAUF and WEHLING 2002, 2003). Dabei wurde bei der Introgressionsbibliothek F mit Hilfe von 196 Markern eine durchschnittliche Auflösung von 3,48 cM und eine Kartenlänge von 683 cM erreicht, bei der Introgressionsbibliothek G eine Auflösung von 2,74 cM und mit 250 Markern eine Kartenlänge von 685 cM. Selektionskriterium war die Anzahl und chromosomale Lokalisation der DC-Segmente und der Genomanteil des Rekurrenten Elters.

So entstanden bis zur BC₂S₂ je Bibliothek 40 Introgressionslinien (Tabelle 1).

Sie decken zusammen rund 70% des Donorgenoms ab und enthalten in der Regel ein bis drei DC-Segmente mit einer durchschnittlichen Länge von 17,2 cM. In einzelnen Linien variiert diese Länge von 1,5 bis 72 cM, das Genom des Rekurrenten Elters ist zu 88-99% in den Linien enthalten. Je 26 Linien beider Bibliotheken enthalten ein bis zwei DC-Segmente. Die meisten Introgressionslinien zeigen eine Überlappung bei einem oder mehreren DC-Segmenten, was eine genauere Schätzung ihrer phänotypischen Effekte erlaubt.

Durchführung der Feldprüfungen

Die Introgressionslinien wurden mit zwei Testern gekreuzt, um die Kombinationsfähigkeit für agronomische Eigenschaften (Ährenschieben, Wuchshöhe, Lager, Kornertrag) und Qualitätsmerkmale (Tausendkornmasse, Hektolitergewicht, Fallzahl) im Vergleich zur ursprünglichen Linie (= Rekurrenter Elter) zu erfassen.

Im Jahr 2005 erfolgte eine Prüfung der Kreuzungsnachkommen von insgesamt 78 IL mit zwei Testern an fünf Orten (Stuttgart-Hohenheim, Oberer Lindenhof/Reutlingen, Eckartsweier/Kehl a. Rhein, Wulfode/Lüneburg, Bergen/Celle) auf Kombinationsfähigkeit für agronomische Merkmale. Die Qualitätsmerkmale wurden an 72 IL mit einem Tester an drei dieser Orte erfasst. Die Testkreuzungen des Rekurrenten Elters wurden in jeder Wiederholung mit zehnfacher Genauigkeit geprüft, da sie den Bezugspunkt zur Leistung der Introgressionslinien darstellen; zusätzlich wurden Testkreuzungen mit Intrapool- und Interpool-Standards angebaut. Die Anlage erfolgte im üblichen Drillverfahren auf 5m².

Autoren: Prof. Dr. Thomas MIEDANER, Dr. Z. SUŠIĆ, M.Sc. A. SEGGL und Prof. Dr. Dr. h.c. H.H. GEIGER, Universität Hohenheim, Forschungsschwerpunkt Pflanzenzüchtung und Biotechnologie, D-70593 STUTTGART; Dr. B. HACKAUF und Prof. Dr. P. WEHLING, BAZ, Institut für Landwirtschaftliche Kulturen, D-18190 GROSS LÜSEWITZ; Dr. V. KORZUN und Dr. P. WILDE, Lochow-Petkus GmbH (LP), D-29296 BERGEN; Dr. J. SCHONDELMAIER, Saaten-Union Resistenzlabor GmbH (SU-RL), D-33818 LEOPOLDSHÖHE; Dr. H. WORTMANN, Hybro GmbH & Co.KG., D-30916 ISERNHAGEN HB; Dr. J. ROUPPE VAN DER VOORT, Keygene n.v., P.O. Box 216, NL-6700 AE WAGENINGEN; miedaner@uni-hohenheim.de



Tabelle 1: Anzahl analysierter (analys.) bzw. selektierter (selekt.) Rückkreuzungs(BC)pflanzen, Mittelwerte und Spannweiten für die Anzahl Donorchromosomen (DC)-Segmente je Introgressionslinie (IL) und die Länge des einzelnen DC-Segments sowie der mittlere Genomanteil des Rekurrenten Elters (RE) in zwei Introgressionsbibliotheken während der Generationen BC₁ bis BC₂S₂ (SUŠIĆ 2005)

Generation	Anzahl Pflanzen		Anzahl DC-Segmente je IL (cM)		Länge des einzelnen DC-Segments (cM)		Mittlerer Genomanteil des RE (%)
	Analys.	Selekt.	Mittel	Spannweite	Mittel	Spannweite	
-----Introgressionsbibliothek F-----							
BC ₁	68	9	6.2	4-8	43.5	2.0-93.0	80.0
BC ₂	154	19	2.5	1-4	29.8	5.0-72.0	89.8
BC ₂ S ₁	190	17	2.3	1-4	21.6	2.0-72.0	92.9
BC ₂ S ₂	256	40	2.2	1-4	18.3	2.0-72.0	94.1
-----Introgressionsbibliothek G-----							
BC ₁	69	9	5.1	4-7	44.6	4.5-117.2	82.0
BC ₂	196	18	2.8	2-5	28.5	2.0-70.0	89.3
BC ₂ S ₁	133	22	2.6	1-5	19.9	2.0-55.0	94.2
BC ₂ S ₂	267	40	2.2	1-5	14.8	1.5-45.5	95.1

Parzellen in zwei Wiederholungen mit ortsüblicher Düngung. Um eine Beeinträchtigung des Kornertrags durch vorzeitiges Lagern zu vermeiden, erfolgte eine zweimalige Gabe von Wachstumsreglern. Wenn einzelne Introgressionslinien signifikant von der Leistung des Rekurrenten Elters abweichen, sollte dies auf das entsprechende Genomsegment des Donors zurückzuführen sein.

Ergebnisse und Diskussion

Die Testkreuzungsleistung der IL entsprach im Mittel derjenigen des Rekurrenten Elters (Tabelle 2). Dies war zu erwarten, da die Linien durchschnittlich zu über 90% dem Genom des Rekurrenten Elters entsprechen (siehe Tabelle 1). Die Testkreuzungen zeigen, dass der Donor deutlich langstrohiger und lageranfälliger ist als der Rekurrente Elter und einen um etwa 12 dt/ha geringeren Kornertrag hat. Er hat auch eine deutlich schlechtere Fallzahl, aber ein höheres Hektolitergewicht und eine höhere Tausendkornmasse. Bei allen Merkmalen, außer dem Ährenschieben, zeigten einzelne Introgressionslinien signifikante Abweichungen von der Leistung des Rekurrenten Elters. Für dieses Merkmal gab es auch keine genotypische Varianz in der Serienverrechnung. Bei den anderen Merkmalen fanden sich signifikante ($P = 0.01$) genotypische Varianzen. Der Genotyp des Testers hatte nur einen geringen Einfluss, die Genotyp x Ort-Interaktionen waren in allen Fällen signifikant ($P = 0.01$). Die Heritabilitäten lagen zwischen 0,61 (Lager/Reife) und 0,95 (Wuchshöhe). Die Qualitätseigenschaften hatten im Durchschnitt, trotz geringerer Prüfintensität, eine höhere He-

Tabelle 2: Mittelwerte, genotypische Spannweiten und Grenzdifferenzen (GD_{5%}) von vier agronomischen Eigenschaften und drei Qualitätsmerkmalen der Testkreuzungen von 78 bzw. 72 Introgressionslinien (IL)¹, ihres Donors sowie des Rekurrenten Elters gemittelt über ein bzw. zwei Tester (T) und fünf bzw. drei Orte 2005

Merkmal	T x Donor	T x RE	T x Introgressionslinien (IL)		
			Mittel	Spannweite	GD _{5%}
<u>Agronomische Eigenschaften</u>					
Wuchshöhe (cm)	145	117	119	108 - 130	2,5
Ährenschieben (1-9)	5,8	5,4	5,5	5,5 - 5,8	0,44
Lager/Reife (1-9)	5,4	2,5	2,6	1,7 - 3,5	0,78
Kornertrag (dt/ha)	60,1	71,8	71,5	59 - 77	4,0
<u>Qualitäts-Eigenschaften</u>					
Fallzahl (sec)	119	160	164	83 - 219	31
Hektolitergewicht (kg)	70,6	68,7	69,1	64 - 71	1,0
Tausendkornmasse (g)	35,5	34,3	34,9	31 - 40	1,6

¹ Die agronomischen Merkmale wurden für 78 IL über zwei Tester und fünf Orte ermittelt, die Qualitätsmerkmale für 72 IL über einen Tester und drei Orte.

ritabilität (0,78-0,87) als die agronomischen Eigenschaften.

Da bei jeder Introgressionslinie das Donorchromosomen(DC)segment mit Hilfe von DNA-Markern chromosomal lokalisiert ist, können die gefundenen phänotypischen Effekte (= Abweichung der Leistung der Introgressionslinie von derjenigen des Rekurrenten Elters) einem einzigen oder einigen wenigen DC-Segmenten zugeordnet werden. So führte beispielsweise ein DC-Segment auf Chromosom 1R zu einer signifikant größeren Wuchshöhe. Die drei Introgressionslinien 2101-2103, die im Bereich zwischen 25 und 50 cM das exotische DC-Segment auf diesem Chromosom tragen, sind im Durchschnitt 11,3 cm länger als der Rekurrente Elter und als die Introgressionslinie 2109, die dieses DC-Segment nicht besitzt. Auch für den Kornertrag wurden in drei Fällen DC-Segmente gefunden, die dieses Merkmal signifikant positiv bzw. negativ beein-

flussen. So verursacht ein kleines, klar abgegrenztes DC-Segment am Ende von Chromosom 1R einen um 4-6% geringeren Kornertrag, der aber nur in einem Fall die Signifikanzgrenze überschreitet. Bei einem zweiten Beispiel tragen zwei Introgressionslinien dieselben DC-Segmente auf den Chromosomen 3R und 5R und sind im Ertrag dem Rekurrenten Elter um 4 bzw. 7% überlegen.

Sehr klar lässt sich ein ca. 20 cM langes DC-Segment auf Chromosom 7R eingrenzen, das einen um 15% geringeren Kornertrag verursacht. Ähnliche Befunde ergeben sich für die Qualitätseigenschaften. Dabei ist zu berücksichtigen, dass beim Fremdbefruchter Roggen diese Effekte nur auf heterozygotem Niveau in Form von Testkreuzungen praxisrelevant sind und deshalb dem haploiden Genotyp des Donors entsprechen, also bei additiv vererbten Eigenschaften nur halb so hoch sind wie bei Selbstbefruchtern (z.B. von KORFF et al. 2006).

Simulationsstudien zur Optimierung der IL-Erzeugung

Durch Computersimulationen wurde auf der Basis der experimentellen Daten ein optimiertes Schema zur raschen und kosteneffizienten Erstellung von Introgressionsbibliotheken bei Roggen erarbeitet (SUŠIĆ 2005). Sechs unterschiedliche Strategien, die sich in der Anzahl der Rückkreuzungs- und Selbstungsgenerationen unterscheiden, wurden untersucht, wobei als Kriterien eine ausreichende Donorgenomabdeckung und ein maximaler Anteil des Empfängergenoms dienten. Am effizientesten war der Aufbau einer BC_3S_1 -Bibliothek. Dabei können bei einer Ausgangspopulation von 100 BC_1 -Pflanzen mit einer relativ geringen Anzahl an Nachkommen je IL ($N = 19$) und einer angemessenen Anzahl an Markerdatenpunkten (Summe 52.700) nahezu 100% des Donorgenoms abgedeckt werden. Eine länger dauernde Introgression ist etwas kostengünstiger, aber natürlich zeitaufwändiger. Verfahren mit kürzerer Dauer sind wesentlich teurer. Eine BC_2S_1 -Strategie etwa benötigt das 2,5fache an Markerdatenpunkten, um zum selben Ergebnis zu kommen, spart aber nur ein Jahr.

Ausblick

Fernziel ist die Erstellung von Nahe-isogenischen Linien (NILs), von denen jede einzelne nur noch den als vorteilhaft bestimmten QTL in einem ansonsten homogenen genetischen Hintergrund trägt. Durch sub-NILs, die jeweils nur noch einen kleinen Anteil der DC-Segmente überlappend tragen, ist eine Feinkartierung der interessanten DC-Segmente und eine Verifizierung ihrer Effekte möglich. Diese DC-Segmente können unmittelbar in Elitezuchtmaterial eingekreuzt wer-

den, ohne wesentliche Nachteile des exotischen Donorgenoms befürchten zu müssen. Weiterhin kann die Introgressionsbibliothek genutzt werden, um Gene oder QTL für beliebige Eigenschaften, die in den Populationen spalten, ohne weitere Kartierung chromosomal zu lokalisieren. Langfristig bietet eine solche Introgressionsbibliothek eine hervorragende Ausgangsbasis für die kartengestützte Klonierung interessanter Gene oder QTL sowie, aufgrund des einheitlichen genetischen Hintergrundes, ein ideales Werkzeug zur Auffindung neuer Gene durch „expression profiling“.

Zusammenfassung

Weltweit erstmalig wurden zwei Introgressionsbibliotheken für Roggen mit Hilfe von DNA-Markern systematisch aufgebaut. Sie umfassen zusammen 78 Linien, die rund 70% des Donorgenoms repräsentieren. Eine Schätzung der phänotypischen Effekte der Donorchromosomen-Segmente in Feldversuchen ergab für alle Merkmale, außer dem Ährenschieben, einzelne Linien, die signifikant besser als der Rekurrente Elter waren. Dies war besonders ausgeprägt beim Hektolitergewicht und TKM. In einer Simulationsstudie erwies sich die Erstellung einer BC_3S_1 -Bibliothek bei Roggen als optimal. Die Introgressionslinien sind ein wertvolles Instrument zum Auffinden neuer, positiv wirkender Genomsegmente, die langfristig zur Entwicklung ertragreicher Sorten beitragen können.

Literatur

- ESHED, Y. and D. ZAMIR, 1994: A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. *Euphytica* 79:175-179.
- FALCONER, D.S. and T.F.C. MACKAY, 1996: *Quantitative genetics*. 4th ed. Longman, Essex, UK.

HACKAUF, B. and P. WEHLING, 2002: Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breed.* 121: 17-25.

HACKAUF, B. and P. WEHLING, 2003: Development of microsatellite markers in rye: map construction. *Pl. Breed. Seed Sci.* 48: 143-151.

MIEDANER, T. und H.H. GEIGER, 1998: Chancen und Konzepte der Nutzung genetischer Ressourcen in der Hybridroggenzüchtung. *Arb.tag. Arb.gem. Saatzuchtleiter, Gumpenstein.* 49: 17-22.

MIEDANER, T., Z. SUŠIĆ und H.H. GEIGER, 2002: Erweiterung der Diversität von selbstfertilen Roggenpopulationen durch Introgression genetischer Ressourcen. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 54: 81-88.

ROUX, S.R., T. MIEDANER, H.H. GEIGER, E. KNOPF, P. WILDE and H. WORTMANN, 2003: Combining ability vs. population performance of genetic resources in rye. *Pl. Breed. Seed Sci.* 48: 45-48.

SUŠIĆ, Z., 2005: Experimental and simulation studies on introgressing genomic segments from exotic into elite germplasm of rye (*Secale cereale* L.) by marker-assisted backcrossing. Ph. D. thesis, Univ. Hohenheim, Germany.

VON KORFF, M., H. WANG, J. LÉON and K. PILLEN, 2006: AB-QTL analysis in spring barley: II. Detection for agronomic traits introgressed from (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*). *Theor. Appl. Genet* 112: 1221-1231.

ZAMIR, D., 2001: Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Rev. Genet* 2: 983-989.

Danksagung

Das Projekt wurde 2001-2004 im Rahmen der „Genomanalyse im biologischen System Pflanze (GABI)“ vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie von der Hybro GmbH & Co. KG und der Lochow-Petkus GmbH finanziell unterstützt. Seit 2006 erfolgt eine Förderung durch das Bundesministerium für Wirtschaft (BMW) im Rahmen des Programms „PRO INNO“ (AiF, Berlin) sowie die Hybro GmbH & Co. KG und das Saaten-Union Resistenzlabor GmbH.